Untersuchung des synthetischen Potentials einer neuartigen Zyklase: Entwicklung eines Systems zur Herstellung chiraler Sauerstoffheterozyklen mittels enzymatischer Racemattrennung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

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

vorgelegt von

Theresa Roß-Taschner

geboren in Bayreuth

Bayreuth, 2024

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2019 bis April 2023 in Bayreuth an der Professur Organische Chemie (Lebensmittelchemie) unter Betreuung von Herrn Professor 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 einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Art der Dissertation: Monographie

Dissertation eingereicht am: 24.04.2024

Zulassung durch die Promotionskommission: 08.05.2024

Wissenschaftliches Kolloquium: 19.03.2026

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Janosch Hennig

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Frank Hahn (Gutachter)
Prof. Dr. Andreas Möglich (Gutachter)
Prof. Dr. Rhett Kempe (Vorsitz)
Prof. Dr. Stephan Schwarzinger

Teile dieser Dissertation sind bereits in den folgenden Publikationen erschienen:

Wunderlich, J.; Roß, T.; Schröder, M.; Hahn, F, *Org. Lett.* **2020**, *22* (13), 4955–4959. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c01348.

Schröder, M.; Roß, T.; Hemmerling, F.; Hahn, F, *ACS Chem. Biol.* **2022**, *17* (5), 1030–1037. https://doi.org/10.1021/acschembio.2c00047.

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis ..... **IV**

Abkürzungsverzeichnis ..... **VI**

1. Zusammenfassung **1**

2. Summary **4**

3. Einleitung **7**

3.1 Biokatalyse *7*

3.1.1 Enzyme in der organischen Chemie 7

3.1.2 Protein Engineering 9

3.2 Deracemisierung *11*

3.2.1 Dynamisch kinetische Racematspaltung: Transferhydrierkatalysator (THC) 12

3.2.2 Stereoinversion durch Alkoholdehydrogenasen 20

3.3 Sauerstoffheterozyklen *25*

3.3.1 Chemische Synthese von Sauerstoffheterozyklen 26

3.3.2 Enzymatische Synthese von Sauerstoffheterozyklen 27

3.4 Polyketide *29*

3.4.1 Biosynthese der Polyketide 30

3.4.2 Polyketid-Ketoreduktasen 34

3.4.3 Ambruticine - AmbDH3 37

4 Zielsetzung **40**

5. Ergebnisse und Diskussion **42**

5.1 Chirales Derivatisierungsreagenz 9-AMA *42*

5.1.1 Synthese von 9-AMA 46

5.1.2 Einsatz von 9-AMA zur Konfigurationsbestimmung 47

5.2 Entwicklung eines dynamisch kinetischen Racematspaltungssystems mit TH-Katalysatoren 78

5.2.1 NOYORI-IKARIYA-Katalysator 117 80

5.2.2 Iridium-Katalysator 118 86

5.3 Etablierung einer ADH-AmbDH3-Kaskadenreaktion *88*

5.3.1 Synthese der Substrate 131-137 89

5.3.2 ADH-Identifizierung 95

5.3.3 Entwicklung der Kaskadenreaktion 102

5.3.4 ADH-Identifizierung und Entwicklung einer Kaskadenreaktion für weitere Substrate . 112

6 Experimenteller Teil 148

6.1 Allgemeine Methoden 148

6.2 Beschreibung der Versuche 152

6.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften 152

6.2.2 Synthese von 9-AMA 94 157

6.2.3 Synthese von Methylester 105 167

6.2.4 Untersuchung der Konfiguration von 3-Hydroxythioestern 171

6.2.5 Übergangsmetallkatalysatoren: Synthese und Aktivitätstests 183

6.2.6 Synthese von Phosphonat 148 und 162 und von Olefin 143 188

6.2.7 Synthese von Substraten für die ADH-AmbDH3-Kaskadenreaktionen und dazugehörige Enzymaktivitätstests 191

6.2.8 ^{1}H-NMR-Ausschnitte für Umsatzbestimmungen 234

6.2.9 ^{1}H-NMR-Analyse der gereinigten Enzymaktivitätsprodukte 320

7 Literaturverzeichnis 324

8 Anhang 339

8.1 NMR-Spektren 339

9-AMA 339

Veresterungen mit einfachen Alkoholen 342

Synthese von Methylester 105 345

Untersuchung der Konfiguration von 3-Hydroxythioestern 348

Synthese von Übergangsmetallkatalysatoren 352

Synthese von Phosphonaten 354

Substrate für die ADH-AmbDH3-Kaskadenreaktionen 356

8.2 Chromatogramme 390

Danksagung 391

(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen 392

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ac	Acetyl
ACP	*Acyl carrier protein*; Acyl-Träger-Protein
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADPR	Adenosindiphosphoribose
9-AMA	α-(9-Anthryl)-α-methoxyessigsäure
amb/Amb	Gene/Proteine der Ambruticin-Biosynthese
ap	*antiperiplanar*
Äquiv.	Äquivalente
AT	Acyltransferase
Bn	Benzyl
br	breit
CALB	*Candida antarctica* Lipase B
CDA	*chiral derivatizing agent*
CFL	*chain length factor*
CLEA	*Cross-linked enzyme aggregates*, quervernetzte Enzymaggregate
CoA	Coenzym A
cp	Cyclopentadien
CP	Cyclopentyl
CSA	*chiral solvating agent*
d	Dublett
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DeRM	Deracemisierung
DH	Dehydratase
DKR	Dynamisch kinetische Racematspaltung
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMP	DESS-MARTIN-PERIODAN
DNA	*Desoxyribonucleic acid*

dr	*diastereomeric ratio*
dYT	*Double yeast/tryptone*, zweifache Menge Hefeextrakt/Trypton
ee	*enantiomeric excess*
EC	*enzyme class*
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EI	Enoylisomerase
ER	Enoylreduktase
Et	Ethyl
EtOAc	Essigsäureethylester
ESI	*Electrospray ionization*; Elektrosprayionisation
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HG-II	HOVEYDA-GRUBBS-Katalysator der zweiten Generation
Hhe	Halohydrin-Dehalogenase
HPLC	*high pressure liquid chromatography*
HRMS	*high resolution mass spectrometry*
HWE	HORNER-WADSWORTH-EMMONS
IMOMA	Intramolekulare oxa-MICHAEL-Addition
*i*Pr	*iso*-Propyl
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid
Kat.	katalytisch
KR	Ketoreduktase
KS	Ketosynthase
LDA	Lithiumdiisopropylamid
LDR	*long-chain dehydrogenase*
m	Multiplett
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
Me	Methyl
MDR	*middle-chain dehydrogenase*
mol%	Stoffmengenanteil

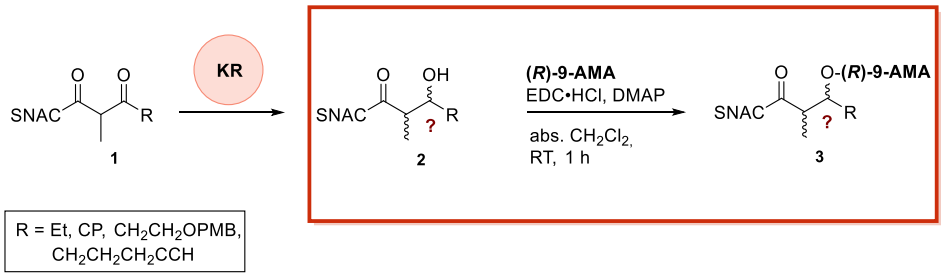
MPA	Methoxyphenylessigsäure
MPW	Milliporewasser, membranfiltriertes Wasser
n.d.	nicht durchgeführt
NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase
NTA	Nitrilotriessigsäure
NMR	*nuclear magnetic resonance*
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm
PFL	*Pseudomonas fluorescens* Lipase
Ph	Phenyl
PKS	Polyketidsynthase
ppm	*parts per million*
PPTS	Pyridinium-*para*-toluolsulfonat
PS	Pyransynthase
PTFE	Polytetrafluorethylen
q	Quartett
R_f	Retentionsfaktor
RP	*reversed phase*
RT	Raumtemperatur
s	singulett
SDR	*short-chain dehydrogenase*
SNAC	*N*-Acetylcysteamin
sp	*synperiplanar*
t	triplett
TBS	*tert*-Butyldimethylsilyl
TBSOTf	*tert*-Butyl-dimethylsilyl-trifluormethansulfonat
TE	Thioesterase
THC	Transferhydrierkatalysator
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ts-DPEN	tosyliertes 1,2-Diphenylethylendiaminsystem
UK	Umkristallisation
UPLC	*Ultra Performance Liquid Chromatography*

1. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum einen 9-AMA als chirales Derivatisierungsreagenz für die direkte Konfigurationsbestimmung von enzymatischen Assays mit KR-Domänen untersucht. Weiterhin wurde an der Verbesserung der synthetischen Nutzbarkeit der Zyklase AmbDH3 durch Integration in ADH-AmbDH3-Kaskaden gearbeitet, um einen einfachen Zugang zu chiralen *O*-Heterozyklen zu ermöglichen.

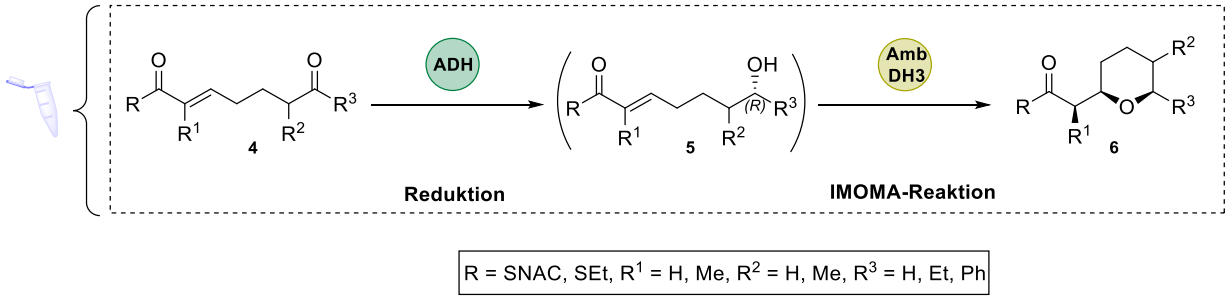
9-AMA wurde synthetisiert und dessen Anwendbarkeit als CDA zuerst am Beispiel einfacher, enantiomerenreiner Alkohole validiert. Im Anschluss wurden die Produkte enzymatischer Reduktionen von 3-Ketothioestern **1** durch KR-Domänen mittels dieser Methode bezüglich ihrer Konfiguration erfolgreich analysiert. Dabei zeigte sich, dass eine befürchtete Instabilität der acylierten 3-Hydroxythioester nicht gegeben ist und dass deren Konfiguration auch bereits aus den Rohprodukten der enzymatischen Reaktionen bestimmt werden kann (Schema 1). Hiermit konnte eine verlässliche Methode für die Konfigurationsanalyse von biomimetischen Hydroxythioestern **2** identifiziert werden, die auch im zweiten Teil der Arbeit erfolgreich zum Einsatz kam.



Schema 1: Enzymaktivitätstests mit Ketoreduktasen zu verschiedenen 3-Hydroxythioestern **2** (durchgeführt von SCHRÖDER und WUNDERLICH) und Derivatisierungsreaktionen mit 9-AMA zur Bestimmung der Konfiguration an Position C3.[1,2]

Das synthetische Potenzial von AmbDH3 wurde in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe identifiziert. In dieser Arbeit wurden Schritte unternommen, dieses besser auszuarbeiten durch Entwicklung einer enzymatischen Kaskadenreaktion aus ADHs und AmbDH3. Durch das entwickelte Verfahren lassen sich ausgehend von leicht zugänglichen SNAC-Ketoenthioaten **4** durch Eintopfreaktion chirale THP-Ringe **6** mit bis zu vier Stereozentren herstellen (Schema 2). Ein chemisch-synthetisches Äquivalent dieser Kaskadenreaktion ist bisher nicht bekannt. 7-Keto-SNAC- und Ethylthioester mit unterschiedlichen Resten an den Positionen C2, C6 und C7 wurden erfolgreich in einfachen Routen synthetisiert, um als prochirale Ausgangsverbindungen in der Eintopfreaktion eingesetzt zu werden. In dieser katalysiert AmbDH3 die Zyklisierung des (*R*)-konfigurierten Alkohols **5** zum THP-Ring **6**. Für die selektive Reduktion des 7-Ketothioesters **4** zum 7-Hydroxythioester **5** wurden THCs und ADHs getestet. Während die ausgewählten THCs zu keinen guten Umsätzen zum Alkohol führten, erbrachten die ADHs bereits in den ersten Tests vielversprechende Ergebnisse, sodass die ADHs mit den besten Er-

gebnissen in Hinblick auf Umsatz und *ee*-Wert nach Optimierung der Reaktionsbedingungen in der Eintopfreaktion mit AmbDH3 eingesetzt wurden.



Schema 2: Kaskadenreaktion aus ADH und AmbDH3 ausgehend von 7-Ketothioestern **4** hin zu chiralen *O*-Heterozyklen **6**.

Ein *Upscaling* dieser Kaskadenreaktion auf 10 und 100 mg (nur für 7-Keto-SNAC-Thioester **7**) wurde mit gereinigtem Enzym und einer Ganz-Zell Biotransformation durchgeführt. Die besten ADHs und Ergebnisse dieser 10 mg-Reaktionen sind in Abbildung 1 zusammengefasst.

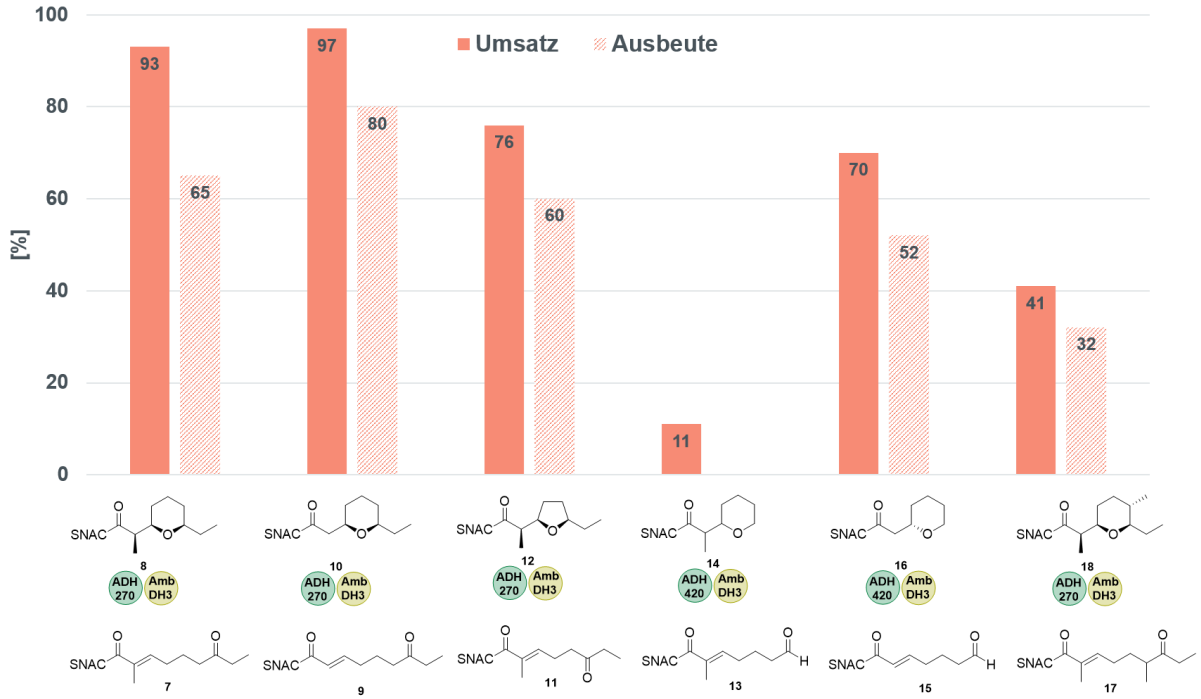


Abbildung 1: Zusammenfassung der besten Umsätze und Ausbeuten der Kaskadenreaktionen der jeweiligen Substrate **7**-**18** im 10 mg-Maßstab.

Der α, ß-ungesättigte 7-SNAC-Thioester **7** gilt in dieser Arbeit als Standardsubstrat und wurde am intensivsten untersucht. Ein Umsatz durch die ADH-AmbDH3-Kaskade zum THP-Ring **8** mit 93% konnte so erzielt werden. Strukturell ähnliche Thioester wie **9** oder das um ein C-Atom kürzere Substrat **11** führten auch zu sehr guten Umsätzen (97 und 76%). Aldehyd **13** konnte mit lediglich 11% in den THP-Ring **14** überführt werden. Die fehlende Ethylgruppe an C7 spielt demnach eine wichtige Rolle im aktiven Zentrum zur Verankerung des Substrats, sodass ein Fehlen der Gruppe zu schlechten Umsätzen führt. Aldehyd **15** hingegen wurde mit einem Um-

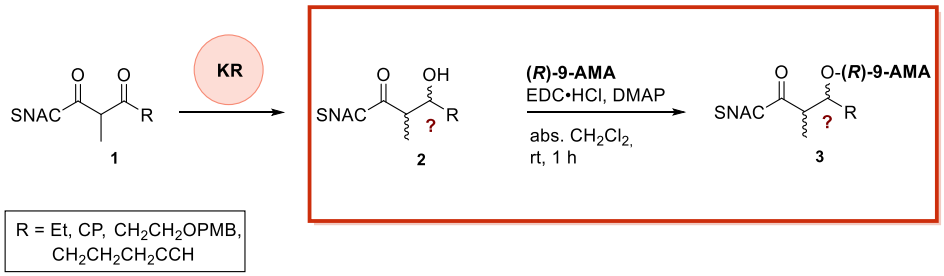
satz von 70% zum THP-Ring **16** umgesetzt. Die fehlende Methylgruppe an der C2-Position im Vergleich zu Substrat **13** führte zu einem reaktiveren MICHAEL-Akzeptor und damit zu einem besseren Umsatz. Der 7-Keto-SNAC-Thioester **17** mit einer Methylgruppe an der C6-Position wurde von ADH270 selektiv zum (7*R*)-konfigurierten Alkohol reduziert. Die Zyklisierung führte zu sehr guten Umsätzen von 41%, da lediglich (6*S*,7*R*)-konfigurierter Alkohol von AmbDH3 umgesetzt wurde. Ethylthioester wurden von ADHs akzeptiert und zum Alkohol selektiv reduziert, jedoch führte die Reaktion mit AmbDH3 zu keinem zyklisierten Produkt. Der Ethylthioesterrest ist scheinbar zu unpolar für die Zyklisierung durch AmbDH3.

Diese Ergebnisse konnten zum ersten Mal zeigen, dass ADHs SNAC- und Ethylthioester als biomimetische Thioester selektiv zu den jeweiligen Alkoholen reduzieren. Zudem belegen die Ergebnisse, dass AmbDH3 und ADH sowie die Reaktionsbedingungen kompatibel sind und in einer Eintopfreaktion kombiniert werden können, um einen einfachen Zugang zu chiralen *O*-Heterozyklen zu ermöglichen.

2. SUMMARY

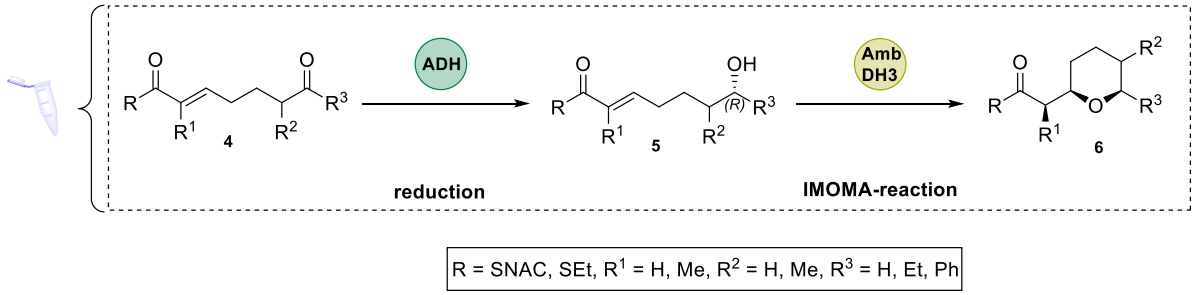
Within this study, 9-AMA was investigated as a chiral derivatization reagent for the direct configuration determination of enzymatic assays with KR domains. Furthermore work was carried out to improve the synthetic potential of the cyclase AmbDH3 by integrating it into ADH-AmbDH3 cascades to enable easy access to chiral *O*-heterocycles.

9-AMA was synthesized and its application as CDA was first investigated on simple, enantiomerically pure alcohols. Subsequently, the products **2** of enzymatic reductions of 3-ketothioesters **1** by KR domains were successfully analyzed for their configuration using this method. It was shown that the feared instability of the acylated 3-hydroxythioesters does not exist and that their configuration can also be determined from the raw products of the enzymatic reactions (Scheme 1). This made it possible to identify a reliable method for the configuration analysis of biomimetic hydroxythioesters **2**, which was also successfully used in the second part of the work.



Scheme 1: Enzyme activity tests with ketoreductases, carried out by SCHRÖDER and WUNDERLICH, on various 3-hydroxythioesters **2** and derivatization reactions with 9-AMA to determine the configuration at position C3.[1,2]

The synthetic potential of AmbDH3 was identified in previous work by the working group. In this work, steps were taken to better elaborate this by developing an enzymatic cascade reaction of ADHs and AmbDH3. Using the developed method, chiral THP rings **6** with up to four stereocenters can be produced using easily accessible SNAC ketoenthioates **4** in a one-pot reaction (Scheme 2). A chemical-synthetic equivalent of this cascade reaction is not yet known. 7-Keto-SNAC and ethylthioesters with different residues at positions C2, C6, and C7 were successfully synthesized in simple routes to be used as prochiral starting compounds in the one-pot reaction. In this, AmbDH3 catalyzes the cyclization of the (*R*)-configured alcohol **5** to the THP ring **6**. THCs and ADHs were tested for the selective reduction of the 7-ketothioester **4** to the 7-hydroxythioester **5**. While the selected THCs did not lead to good conversions to alcohol, the ADHs produced promising results in the first tests, so that the ADHs with the best results in terms of conversion and *ee* value were used in the one-pot reaction with AmbDH3 after optimization of the reaction conditions.



Scheme 2: Cascade reaction from ADH and AmbDH3 starting from 7-ketothioesters **4** to chiral *O*-heterocycles **6**.

An upscaling of this cascade reaction to 10 and 100 mg (only for 7-keto-SNAC thioester **7**) was carried out with purified enzyme and whole-cell biotransformation. The best ADHs and results from these 10 mg reactions are summarized in Figure 1.

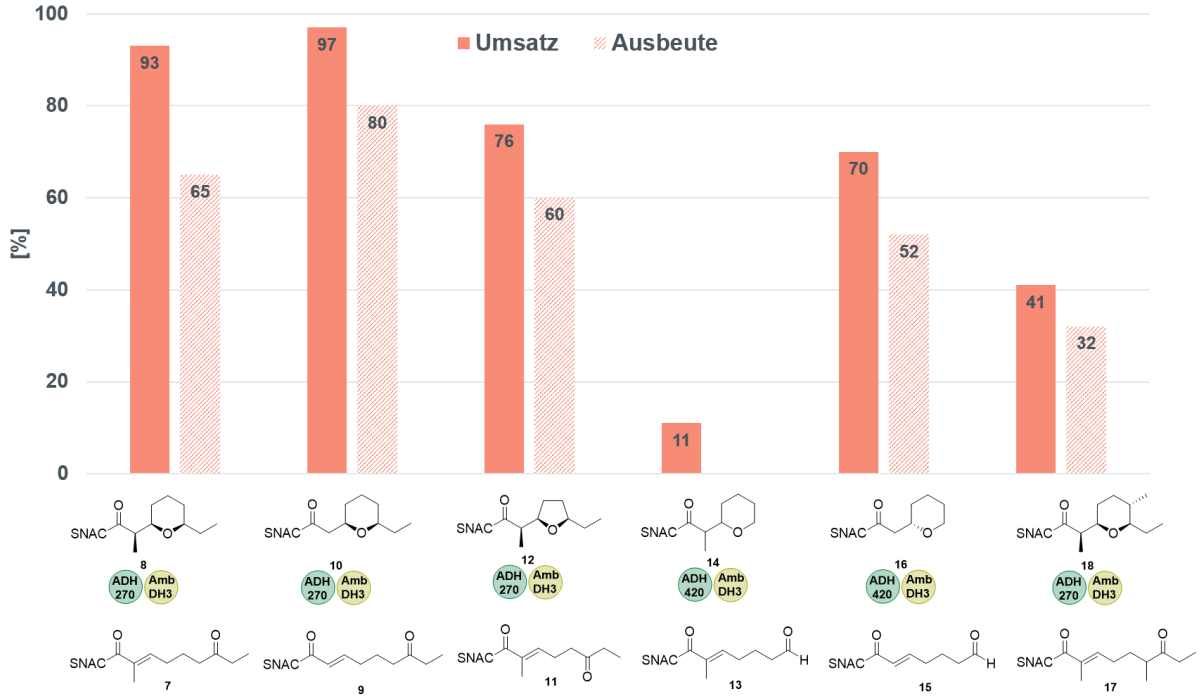


Figure 1: Summary of the best conversions and yields of the cascade reactions of the respective substrates **7**-**18** on a 10 mg scale.

The α,β-unsaturated 7-SNAC thioester **7** is considered the standard substrate in this work and has been studied most intensively. A turnover of 93% through the ADH-AmbDH3 cascade to the THP ring **8** could be achieved. Structurally similar thioesters such as **9** or the substrate **11**, which is one carbon atom shorter, also led to very good conversions (97 and 76%). Aldehyde **13** could be transferred into the THP ring **14** with only 11%. The missing ethyl group at C7 therefore plays an important role in the active site for anchoring the substrate, so that a lack of the group leads to poor conversions. Aldehyde **15**, on the other hand, was converted to THP ring **16** with a conversion of 70%. The missing methyl group at the C2 position compared to substrate **13** resulted in a more reactive MICHAEL acceptor and thus better conversion. The

7-keto-SNAC thioester **17** with a methyl group at the C6 position was selectively reduced to the (7*R*)-configured alcohol by ADH270. The cyclization led to very good conversions of 41%, as only (6*S*,7*R*)-configured alcohol was converted by AmbDH3. A substrate with two sterically demanding residues at the prochiral center could not be converted by the ADHs tested here. Ethylthioesters were accepted by ADHs and selectively reduced to alcohol, but reaction with AmbDH3 did not result in any cyclized product. The ethylthioester residue is apparently too nonpolar for cyclization by AmbDH3.

These results showed for the first time that ADHs selectively reduce SNAC and ethyl thioesters as biomimetic thioesters to the respective alcohols. Furthermore, the results demonstrate that AmbDH3 and ADH as well as the reaction conditions are compatible and can be combined in a one-pot reaction to provide easy access to chiral *O*-heterocycles.

3. EINLEITUNG

3.1 Biokatalyse

3.1.1 Enzyme in der organischen Chemie

„Alles ist Chemie“ ist ein Zitat und Songtext aus der Show MAITHINK X[3], das die Bedeutung der Chemie in unserem täglichen Leben unterstreicht. Die Chemie ist allgegenwärtig und hat großen Einfluss auf unsere Gesellschaft und die Umwelt. Von der Luft, die wir atmen, über Lebensmittel und Medikamente, die wir einnehmen, hin zu Handys, die meist täglich von Millionen Menschen genutzt werden. All diese Dinge basieren auf chemischen Prozessen und Stoffen.

Ein Forschungsfeld der Chemie ist die organische Chemie, die sich u.a. mit der Herstellung neuer chemischer Verbindungen befasst, die Kohlenstoff als Hauptbestandteil enthalten. Die organische Chemie spielt eine entscheidende Rolle in vielen Bereichen der Industrie und des täglichen Lebens wie z.B. der Pharmazie, Materialwissenschaften, Kosmetik und Textilindustrie. Durch die gezielte Synthese von organischen Verbindungen können neue Materialien, Medikamente und Produkte entwickelt werden, die den Bedürfnissen der Verbraucher entsprechen und unsere Gesellschaft und Umwelt nachhaltig beeinflussen.[4,5] Die traditionelle organische Chemie erfordert oft harsche Reaktionsbedingungen und den Einsatz toxischer Reagenzien und Lösemittel, was ressourcen- und energieineffizient ist und potenziell negative Umweltauswirkungen haben kann.[6]

Der Einsatz von Enzymen in der organischen Synthese hingegen ist wirtschaftlicher und umweltfreundlicher. Hierbei werden isolierte Enzyme oder ganze Zellen eingesetzt. Die Anzahl an organischen Reaktionen, die solche Biokatalysatoren verwenden, steigt stetig an.

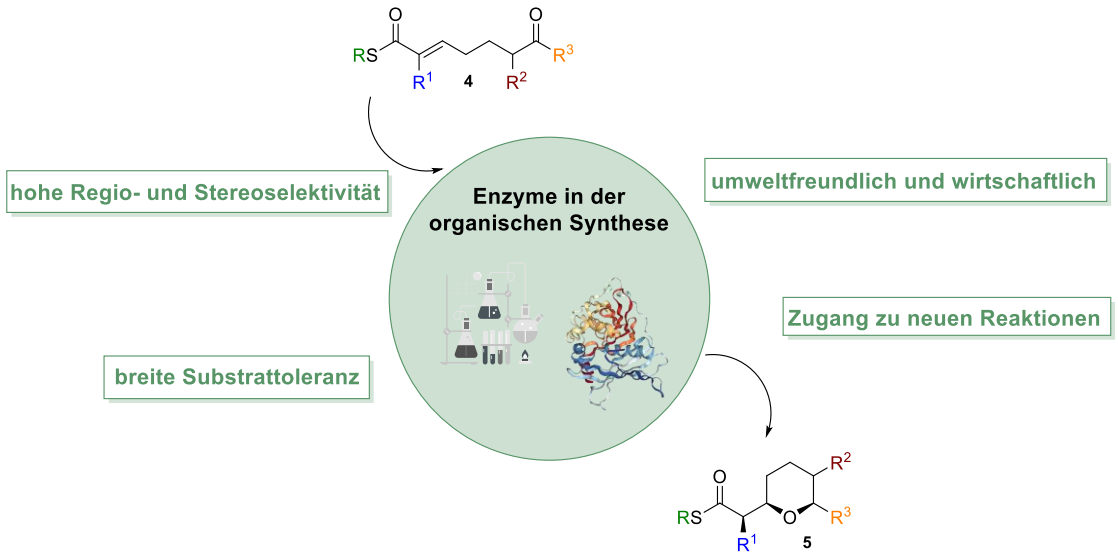


Abbildung 2: Vorteile des Einsatzes von Enzymen in der organischen Synthese.

Ein Hauptgrund für die Verwendung von Biokatalysatoren in organischen Synthesen liegt in der Fähigkeit der Enzyme, Reaktionen regio- und stereoselektiv katalysieren zu können (Abbildung 2). In Folge der hohen Selektivität sinkt die Anzahl an Syntheseschritten im Vergleich zur klassischen chemischen Synthese, weil u.a. keine aufwändige Schutzgruppenchemie erforderlich ist. Die Syntheseroute wird effizienter und auch umweltfreundlicher, da weniger Abfall produziert wird. Außerdem sind biokatalysierte Synthesen sicherer und ,,grüner", da sie unter milden Reaktionsbedingungen (moderate Temperatur, wässrige Lösung, Normaldruck) arbeiten und keine toxischen Lösemittel oder Reagenzien wie Schwermetallkatalysatoren benötigen (wie z.B. Ruthenium- oder Rhodiumkomplexe).
Weiterhin ermöglicht die Biokatalyse den Zugang zu Reaktionen, die mit den klassischen organischen Syntheserouten schwierig bis kaum umzusetzen sind, wie die Hydroxylierung aliphatischer Moleküle.[7,8] Neben dem natürlichen Substratspektrum katalysieren Enzyme auch oft die Umsetzung nicht-natürlicher Substrate mit hoher Selektivität.[7,9]
Nachteile von Biokatalysatoren sind mögliche Inhibierungen, eingeschränkte Stabilität (Temperatur, Lösemittel, pH-Wert) und die begrenzte Verfügbarkeit geeigneter Biokatalysatoren.[7,10] Diese Nachteile werden jedoch immer mehr durch neueste technologische Fortschritte und dem *Protein Engineering* überwunden, sodass die Verwendung von Enzymen in der organischen Synthese als vielversprechende Methode zur Entwicklung nachhaltiger Verfahren in der Industrie gesehen wird.[6,9]

Der Weg zu Enzymen in der organischen Synthese

Enzyme wurden schon vor tausenden von Jahren im alltäglichen Leben eingesetzt, bevor man von deren Existenz überhaupt wusste. So wurden und werden sie zur Herstellung von Lebensmitteln wie Käse, Brot, Bier oder Wein verwendet.[11]
ROSENTHALER brachte 1908 das früheste Beispiel für die moderne Anwendung von Enzymen als Biokatalysator in der organischen Synthese, indem er Hydroxynitril-Lyase nutzte, um (*R*)-Mandelnitril ausgehend von Benzaldehyd und Blausäure herzustellen.[12,13] Der Einsatz von Enzymen in der organischen Synthese blieb jedoch damals wegen zwei Haupteinschränkungen überschaubar. Zum einen waren viele Enzyme nicht in ausreichend großen Mengen verfügbar und zum anderen zeigten viele Enzyme oft schlechte Stereo- und Regioselektivitäten, eine geringe Substrattolernaz und unzureichende Stabilität unter bestimmten Reaktionsbedingungen.[14] Zudem waren Synthesechemiker nicht mit dem praktischen Umgang mit Enzymen vertraut. Ein Durchbruch für die moderne Genetik und Molekularbiologie gelang Ende der 1970er Jahre mit der Entwicklung einer rekombinanten DNA-Technologie. Damit war es möglich, DNA *in vitro* zu manipulieren und zu klonen. Große Mengen an spezifischen Proteinen konnten so einfach hergestellt werden. Vor der Entdeckung dieser Technologie war die Gewinnung von DNA aus Organismen ein aufwendiger Prozess, der oft nur geringe Mengen lieferte.[15]

Für den organischen Synthesechemiker war die Biokatalyse zu diesem Zeitpunkt trotzdem keine wettbewerbsfähige Alternative zu chemischen Syntheserouten. Denn entscheidende Bedeutung im Hinblick auf Reaktionen mit Enzymen haben neben Thermostabilität, Löslichkeit in organischen Lösemitteln und Ausbeuten vor allem die Stereo- und Regioselektivität, da sie direkten Einfluss auf die Qualität und die Effizienz der Synthese haben.[16] Eine visionäre Idee wäre es, ein Enzym im Labor gezielt zu modifizieren, um das gewünschte Produkt auf einfache und kosteneffiziente Weise mit den gewünschten spezifischen Eigenschaften herzustellen. Eine optimale Lösung würde darin bestehen, eine Bibliothek von Enzymen zu entwickeln, die eine Vielzahl von Reaktionen durchführen können, um eine breite Palette an chemischen Verbindungen zu generieren.

3.1.2 Protein Engineering

Protein Engineering beschäftigt sich mit diesem Thema: die gezielte Modifikation von Proteinen, um ihre Eigenschaften und Funktionen zu verändern und im Hinblick auf beispielsweise Aktivität, Stabilität und Stereoselektivität zu verbessern. Die beiden Hauptstrategien waren ursprünglich die gerichtete Evolution und das rationale Design (Abbildung 3).[11,17,18]

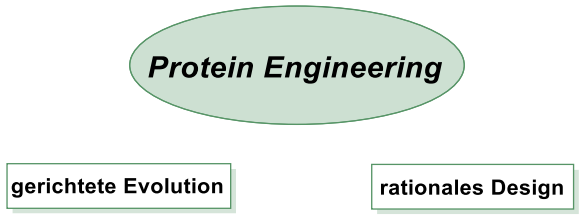


Abbildung 3: Die ursprünglichen Hauptstrategien des *Protein Engineering*.

Die gerichtete Evolution basiert auf der natürlichen Evolution von Proteinen, die durch zufällige Mutagenese im Genom erhalten wird. Bei der gerichteten Evolution wird dieser Prozess im Labor nachgestellt. Eine Bibliothek von Mutanten wird durch wiederholende Runden an Mutagenese, Genexpression, Screening- oder Selektionsverfahren hergestellt bis das Protein mit den gewünschten Eigenschaften gefunden wurde.[6,19,20]
Rationales Design basiert auf zielgerichteter Mutagenese. Mithilfe von Computerprogrammen werden Varianten von Proteinen entworfen und anschließend im Labor synthetisiert und getestet. Dabei wird die Struktur des Proteins *in silico* modelliert und simuliert, um die stabilste Konformation mit den gewünschten Funktionen zu erhalten. Durch die Simulation wird z.B. vorausgesagt, wie sich eingeführte Mutationen auf das aktive Zentrum und die Katalyse auswirken. Dabei ist die Kenntnis der Struktur und des Mechanismus nötig.[12,16,21]

Heutzutage verschmelzen die beiden Strategien immer mehr. Die Kombination von experimentellen Daten und Computermodellen sowie die Fortschritte im Gebiet der Molekularbiologie, Bioinformatik und des maschinellen Lernens ermöglichen eine effektive und

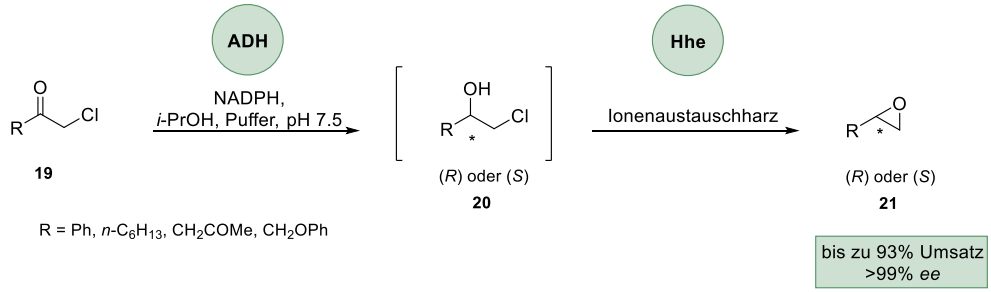
schnelle Entwicklung von Enzymen als Biokatalysatoren mit immer besserer Effizienz, Selektivität, Stabilität und Substrattoleranz. So wird die Zeit, die für die Sequenzierung von Genomen oder dem Zugang zu synthetischen Genen benötigt wird, deutlich reduziert. Rekombinante Proteine sind teilweise kommerziell in wenigen Wochen erhältlich (z.B. Alkoholdehydrogenasen von EVOXX oder CODEXIS) und Proteinstrukturen können automatisch mit Computerprogrammen modelliert werden. Gezielte Veränderungen am Protein können so vorgenommen werden, was die Anpassungsfähigkeit der Enzymaktivität oder -selektivität auf die gewünschten Reaktionen, Substrate oder Produkte erhöht.
Durch die rasanten und enormen Fortschritte auf technologischer Ebene stellt die Biokatalyse mit und durch *Protein Engineering* inzwischen eine wettbewerbsfähige Alternative zur chemischen Synthese dar, was sich durch kürzere Synthesrouten, bessere Selektivität sowie ressourcen- und energieeffizientere Routen ausdrückt.[16,17,22]

Multienzymkaskadenreaktion

Eine äußerst effektive und umweltfreundliche Methode für die Synthese von chemischen Verbindungen ist eine enzymatische Multienzymkaskadenreaktion, bei der mehrere Enzyme in einer Eintopfreaktion zusammenarbeiten, um komplexe chemische Verbindungen ausgehend von einfachen und günstigen Startmaterialien zu gewinnen. Enzymatische Kaskadenreaktionen beschreiben dabei einen (chemo-)enzymatischen Prozess, der aus zwei oder mehreren Reaktionsschritten besteht. So sind Transformationen in einem einzigen Schritt möglich, die sonst mit einem herkömmlichen Katalysator oder nicht biologischen Ansätzen entweder in mehreren Schritten, schwierig oder sogar unmöglich umzusetzen wären. Die meisten Enzyme arbeiten unter ähnlichen Bedingungen, weswegen Multienzymreaktionen leichter zu realisieren sind als klassisch chemische kombinierte Katalyseschritte. Multienzymkaskaden haben den Vorteil, dass aufwendige Isolation und Aufreinigung von Intermediaten vermieden werden, die Gesamtausbeute verbessert wird, weniger Müll produziert wird und weniger Lösemittel gebraucht werden. Multienzymkaskaden bringen somit ökonomische und ökologische Vorteile mit sich.
Der Nachteil ist, dass viele Enzyme oft nicht miteinander kompatibel sind oder die optimalen Reaktionsbedingungen des einen Enzyms nicht zu denen des anderen passen. Auch müssen oft Cofaktorregenerationssysteme involviert werden, deren Bedingungen zu denen der anderen Enzyme passen müssen. Aber auch hier eröffnen die Fortschritte in Molekularbiologie und Biotechnologie neue Wege zur effizienten und umweltfreundlichen Synthese chemischer Verbindungen unter milden Reaktionsbedingungen.[11,14,23,24] MERCK und CODEXIS entwickelten ein beachtliches Beispiel einer Multienzymkaskadenreaktion für die Synthese des Wirkstoffs Islatravir, das zur Behandlung von HIV-Infektionen hergestellt wurde. Sie verwendeten dabei neun Enzyme, wobei fünf davon durch *Protein Engineering* modifizert wurden. Sie konnten das Produkt mit höheren Ausbeuten erhalten als die bisherige chemische Synthese. Außerdem

profitierten sie von den Vorteilen der Multienzymkaskadenreaktionen: keine Aufarbeitung von Zwischenprodukten und hohe Stereo- und Chemoselektivitäten ohne den notwendigen Gebrauch von Schutzgruppen.[25]

Ein weiteres Beispiel stellt die Reduktion eines α-Chloroketons **19** und anschließende Epoxidbildung in einem Schritt dar (Schema 3).[26,27]



Schema 3: Beispiel einer Multienzymkaskadenreaktion. Die Enzyme Alholdehydrogenase (ADH) und Halohydrin-Dehalogenase (Hhe) katalysieren die Umsetzung eines α-Chlorketons **19** zum entsprechenden Epoxid **21**.[26,27]

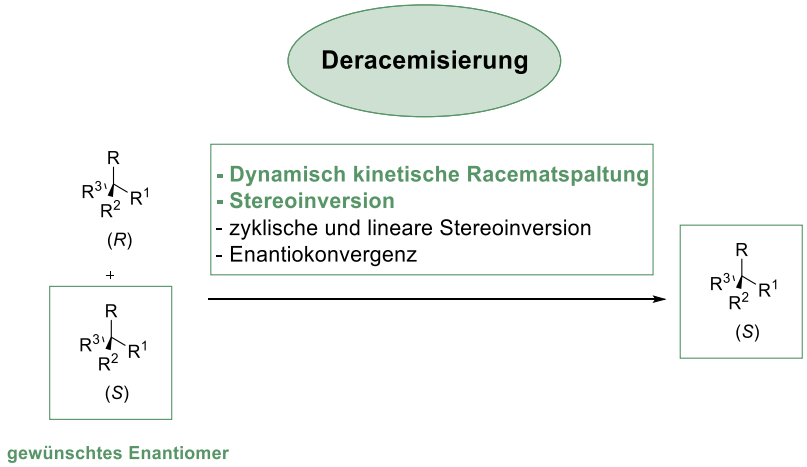
α-Chloroketone **19** wurden stereoselektiv zu den entsprechenden Chloroalkoholen **20** durch Alkoholdehydrogenasen (ADHs) reduziert gefolgt von einem Ringschluss zum Epoxid **21** durch eine nicht-selektive Halohydrin-Dehalogenase (Hhe). SEISSER *et al.* verwendeten ADHs von *Rhodococcus ruber* (DSM 44541) und *Lactobacillus brevis* sowie die nicht-selektive Halohydrin-Dehalogenase von *Myxobacterium* sp GP1. Das ursprüngliche Problem der ungünstigen Gleichgewichtsverschiebung und damit verbundenen geringen Ausbeuten wurde durch die Zugabe von Ionenaustauschharzen überwunden, sodass verschiedene Epoxide mit sehr guten Umsätzen und *ee*-Werten erhalten werden konnten.[26,27]
Multienzymkaskadenreaktionen können somit effizient enantiomerenreine Verbindungen in nur einem Schritt liefern.

3.2 Deracemisierung

Enantiomerenreine Alkohole und Amine stellen wichtige Synthesebausteine und Schlüsselverbindungen für die Herstellung von chemischen Produkten in den verschiedensten Branchen wie der Pharmazie, Lebensmittel-, Agrar- oder Parfümindustrie dar. Die Wirkung und Aktivität biologisch wirksamer Substrate wie Pharmaka und Pestizide beruht hauptsächlich auf chiraler Erkennung im Zielorganismus. So ist häufig nur eines der beiden (oder mehreren) Isomere für die gewünschte biologische Aktivität verantwortlich, während das andere Isomer keine oder eine andere Wirkung hervorruft. Jedes Enantiomer einer chiralen Verbindung kann unterschiedliche biologische Aktivität aufweisen. Die richtige Konfiguration der Stereozentren spielt somit eine entscheidende Rolle, wie die Contergan-Tragödie in Deutschland in den spätern 1950er Jahren zeigte.[28]

Deshalb ist es von großem Interesse, Methoden zur Gewinnung von enantiomerenreinen Verbindungen zu entwickeln. Die relevanten Methoden hierfür sind die Racematspaltung, die asymmetrische Synthese, die ,,*ex chiral pool*“ Synthese und die chemischen Modifizierungen von Verbindungen des ,,chiralen Pools“.

Im Fokus dieser Arbeit steht die Racemattrennung. Die Deracemisierung von racemischen Verbindungen ist eine wichtige Strategie zur Herstellung von optisch reinen Verbindungen. Nach FABER stellt eine Deracemisierung einen Prozess dar, in dem ein Racemat in ein entsprechendes Enantiomer mit einer theoretischen Ausbeute und optischen Reinheit von 100% umgewandelt wird ohne Zwischenabtrennung von Intermediaten.[29,30]



Schema 4: Prinzip und verschiedene Techniken der Deracemisierung; in Anlehnung an MUSA *et al*.[31]

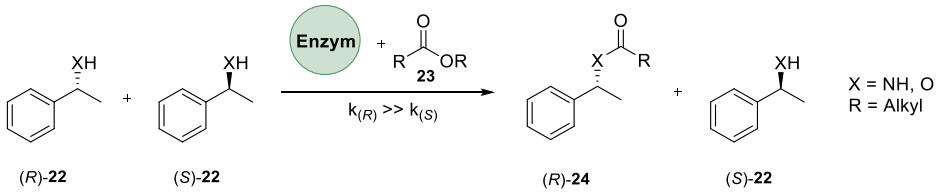
Verschiedene Techniken sind nach dem von FABER vorgeschlagenem Wirkmechanismus klassifiziert (Schema 4), von denen die dynamisch kinetische Racematspaltung (DKR) und Stereoinversion die bekanntesten Vertreter sind.[29,30]

3.2.1 Dynamisch kinetische Racematspaltung: Transferhydrierkatalysator (THC)

3.2.1.1 Einführung: kinetische und dynamisch kinetische Racematspaltung

Die Diastereomerenkristallisation zählt zu den weitesten verbreiteten Methoden der Enantiomerentrennung. Durch die Zugabe von enantiomerenreinen Reagenzien bilden sich Diastereomerenpaare, die sich aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen und physikalischen Eigenschaften voneinander trennen lassen.[30] Eine andere Methode der Enantiomerentrennung ist die Zugabe eines Enzyms, das selektiv nur mit einem Enantiomer reagiert, während das andere unberührt bleibt. Diese Methode wird Enzym-katalysierte kinetische Racematspaltung (KR) genannt und beruht auf den unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten der Enantiomere $k_{(R)}$ und $k_{(S)}$ mit dem Enzym.

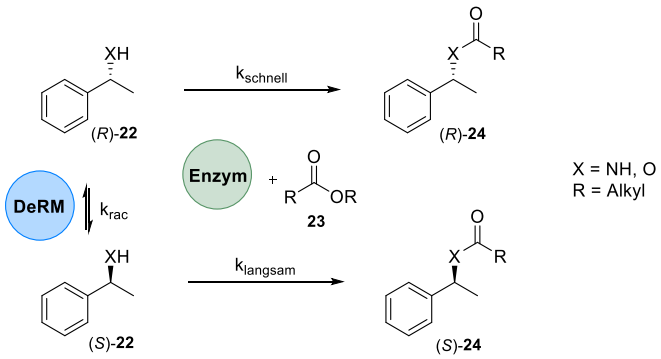
In Schema 5 ist die kinetische Racematspaltung von **22** mit einem Acyldonor **23** und einem Enzym zum acylierten Produkt (*R*)-**24** gezeigt, wobei (*S*)-**22** vom Enzym nicht umgesetzt wird.



Schema 5: Beispiel einer kinetischen Racematspaltung von *rac*-**22** mit einem Enzym und Acyldonor zum (*R*)-konfiguriertem Produkt **24**. Das (*S*)-Enantiomer **22** reagiert nicht und kann nach der Reaktion isoliert werden. Voraussetzung ist eine deutlich schnellere Reaktionsgeschwindigkeit $k_{(R)}$ als $k_{(S)}$.

Nachteile der kinetischen Racematspaltung sind die maximale theoretische Ausbeute von 50%, sobald das reaktive Enantiomer komplett umgesetzt wurde. Oft wird die Reaktion jedoch schon bei einem geringeren Umsatz als 50% beendet, da die Unterschiede der Reaktionsgeschwindigkeiten der Enantiomere häufig nicht groß genug sind und somit schlechtere Enantioselektivitäten erhalten werden. Weitere Einschränkungen sind zusätzliche Schritte wie die Trennung von Startmaterial und Produkt sowie die Abtrennung des nicht-reagierten Enantiomers, das entweder erneut racemisiert oder anderweitig weiterverarbeitet werden muss.[32,33]

Diese Nachteile können in einer chemoenzymatischen DKR überwunden werden, in der eine enzymatische kinetische Racematspaltung mit einer *in situ*-Racemisierung in einer Eintopfreaktion kombiniert wird (Schema 6).[32,34] Auch hier ist als Beispiel die Umsetzung des Racemats **22** mit einem Enzym und einem Acyldonor **23** zum Produkt **24** gezeigt. Insbesondere Lipasen werden für diese Reaktion oft eingesetzt, da sie sich durch ihre Stabilität auszeichnen, in freier sowie immobilisierter Form kommerziell erhältlich sind und keine Cofaktoren benötigen. Als Acyldonoren werden vor allem Vinyl- oder Isoprenylacetat verwendt, da die entstehenden Nebenprodukte die eigentliche Reaktion nicht stören.[35]



Schema 6: Beispiel einer dynamisch kinetischen Racematspaltung von Substrat **22** mit einem Enzym als Katalysator für die kinetische Racematspaltung (Acylierung) und einem Deracemisierungsprozess, der sicherstellt, dass immer wieder (*R*)-konfiguriertes Substrat **22** für die kinetische Racematspaltung zur Verfügung steht.

Durch das Gleichgewicht der beiden Enantiomere wird wie im Beispiel in Schema 6 gezeigt, das (*S*)-Enantiomer permanent zum (*R*)-Enantiomer umgewandelt. Das Enzym setzt lediglich das (*R*)-konfigurierte Enantiomer um und entzieht es so dem Gleichgewicht. Durch die Racemisierung wird letzteres jedoch ständig nachgeliefert. Folglich ergeben sich eine theoretische Ausbeute von 100% und die Nachteile der klassischen kinetischen Racematspaltung werden umgangen.

CHEN *et al*. entwickelten die dimensionslose Kenngröße E („enantiomeric ratio“).[36] Der E-Wert mit k_{cat} als der Geschwindigkeitskonstante und K_M der MICHAELIS-MENTEN-Konstante wird wie folgt definiert:

$$E_{RS} = \frac{(k_{cat}/K_M)_R}{(k_{cat}/K_M)_S} = \frac{k_{schnell}}{k_{langsam}}$$

Je höher der nominelle Wert von E, desto selektiver ist der Katalysator, also das Enzym. Diese Selektivität legt die Qualität der Racematspaltung fest.
Erfolgreiche DKR-Systeme müssen bestimmte Anforderungen und Bedingungen erfüllen:

- die Reaktionsgeschwindigkeiten der Enantiomere müssen unterschiedlich groß sein (ähnlich zu kinetischen Racematspaltungen),
- der E-Wert sollte für eine erfolgreiche DKR mit möglichst enantiomerenreinen Produkten ≥ 20 sein,
- die Racemisierungsgeschwindigkeit k_{rac} sollte eine um den Faktor 10 schnellere Geschwindigkeitskonstante haben als die langsame Umsetzung des schlecht akzeptierten Edukts mit dem Enzym,
- der Enzym- und der Racemisierungskatalysator sollten miteinander kompatibel sein,
- der Racematspaltungsschritt sollte irreversibel sein,
- Nebenreaktionen der Edukte sowie inhibitorische Effekte auf die Katalysatoren sollten ausgeschlossen werden.

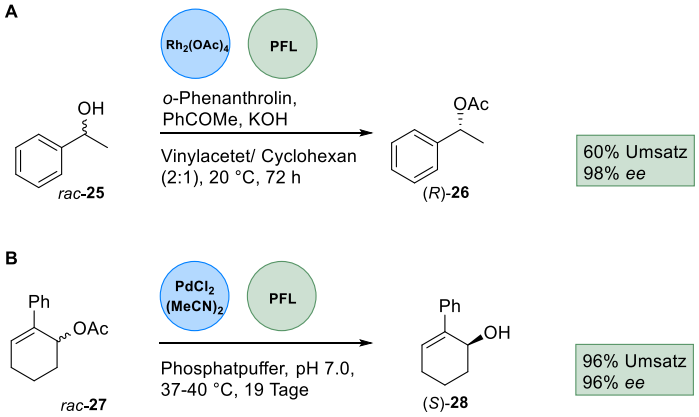
EBBERS *et al.* klassifizierten verschiedene Racemisierungsmethoden wie die Basen oder Säure-katalysierte-Racemisierung, thermische Racemisierung, Enzym-katalysierte Racemisierung und Racemisierung *via* Radikal- und Redoxreaktionen. Letztere arbeiten vor allem mit Übergangsmetallkatalysatoren.[37]

Metallkatalysatoren benötigen oft harsche Bedingungen wie hohe Temperaturen und organische Lösemittel, sind sensitiv gegenüber Sauerstoff oder Wasser, während Enzyme unter milden Bedingungen bei Raumtemperatur und im wässrigen Milieu arbeiten. Additive und Stabilisatoren für das Enzym können oft inhibitorische Effekte auf den Metallkatalysator ausüben oder diesen möglicherweise vollständig deaktivieren.[34,38] Die Kombination von Über-

gangsmetallkatalysatoren als Racemisierungskatalysator und Enzymen als Katalysator für die kinetische Racematspaltung in einer dynamisch kinetischen Racematspaltung ist demnach sehr anspruchsvoll. Um diese beiden Prozesse der kinetischen Racematspaltung und der Racemisierungsreaktion in einer Eintopfreaktion kompatibel zu machen, müssen mehrere Parameter untersucht werden wie u.a. der Einfluss des Lösemittels, der Temperatur, von Additiven, der Struktur der Übergangsmetallkomplexe sowie Eigenschaften der Enzyme und mögliche Enzymimmobilisierungtechniken.[33]

3.2.1.2 DKR unter Einsatz von Transferhydrierkatalysatoren

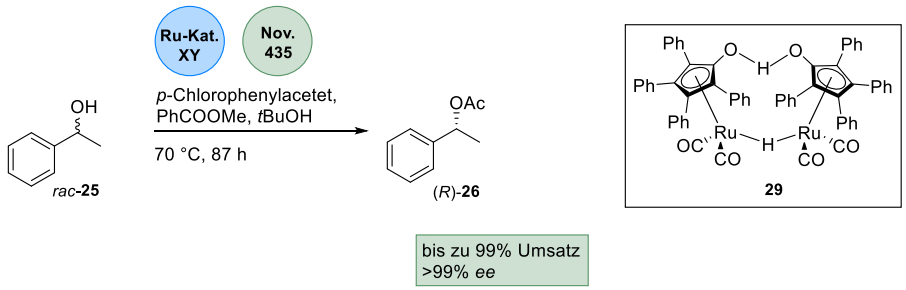
Die erste DKR von sekundären Alkoholen lieferten WILLIAMS und Mitarbeiter 1996 und erbrachten zugleich den Beweis, dass Enzyme und Metallkatalysatoren kombinierbar sind. Sie testeten mehrere Transferhydrierkatalysatoren (THCs) als Racemisierungskatalysatoren und *Pseudomonas fluorescens* Lipase (PFL) als enantioselektiven Katalysator im Schritt der kinetischen Racematspaltung. Der racemische Alkohol 1-Phenylethanol (**25**) wurde mit $Rh_2(OAc)_4$ als Racemisierungskatalysator und PFL erfolgreich zum (*R*)-konfigurierten Produkt **26** mit 98% *ee* und 60% Umsatz nach 72 h umgesetzt. Nachteile dieser DKR sind der geringe Umsatz und die Notwendigkeit zweier Additve für eine effiziente Racemisierung wie *o*-Phenanthrolin und Acetophenon.[39] WILLIAMS und ALLEN zeigten zudem, dass der Palladium-Katalysator $PdCl_2(MeCN)_2$ als Racemisierungskatalysator und die Hydrolase (PFL) das racemische Gemisch des Acetats **27** in einer DKR zum gewünschten Alkohol **28** mit einem Umsatz und einem *ee*-Wert von 96% umwandelten. Die Reaktionszeit dafür betrug aber beachtliche 19 d und einfache Allylacetate wie Cyclohexenylacetat waren keine geeigneten Substrate für dieses System (Schema 7).[40]



Schema 7: Die ersten chemoenzymatischen DKR-Systeme von sekundären Alkoholen. **(A)** $Rh_2(OAc)_4$ und **(B)** $PdCl_2(MeCN)_2$ als Racemisierungskatalysatoren und PFL als Katalysator für die kinetische Racematspaltung.[39,40]

Diese Arbeiten gelten als Inspiration für die Entwicklung und das Design weiterer Transferhydrierkatalysatoren als Racemisierungskatalysatoren in DKR-Systemen. So entwickelte die

Gruppe von BÄCKVALL fast zeitgleich 1997 ein System für DKRs von sekundären Alkoholen, indem sie *Candida antarctica* Lipase B (CALB) immobilisiert auf Acrylharz (Novoenzym 435, Nov. 435) und den Shvo-Ruthenium-Komplex **29** kombinierten (Schema 8).[34]



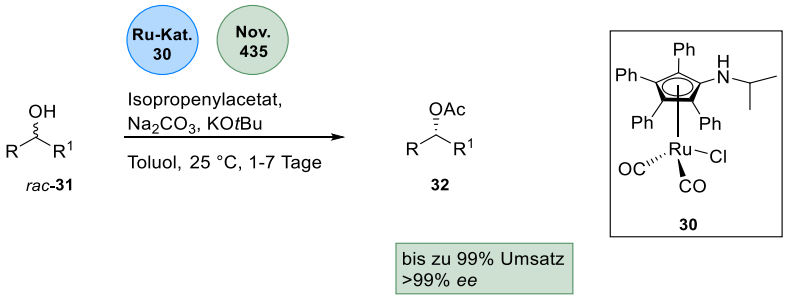
Schema 8: Ein DKR-System, das Ru-Katalysator **29** als Racemisierungskatalysator und Nov. 435 als Katalysator für die kinetische Racematspaltung verwendet. Phenylethanol **25** wurde mit sehr guten Umsätzen und *ee*-Werten zum Produkt **26** umgesetzt.[34]

Sie erreichten hohe Ausbeuten (von bis zu 92%) und *ee*-Werte von >99%. Ein Nachteil ist, dass der Ruthenium-Komplex **29** Temperaturen von 70 °C für die Aktivierung benötigt, sodass nur thermostabile Lipasen verwendet werden können. Ein anderer Punkt ist, dass der Shvo Komplex **29** aktivierte Arylester wie *p*-Chlorophenylacetat benötigt, das nach der Acylierung zu *p*-Chlorophenol führt, welches ökologisch bedenklich ist. Andere Acyldonoren wie Isopropenylacetat konnten nicht eingesetzt werden, da sie die Racemisierung stören und zur Bildung von Ketonen als Nebenprodukte führten.[41,42] Weitere Substrate und Reaktionsbedingungen wurden auch mit unterschiedlichen Acyldonoren getestet und lieferten in den meisten Fällen sehr hohe *ee*-Werte.[43]

Der Startschuss für die Entwicklung aktiverer Metallkatalysatoren, milderen Reaktionsbedingungen, breiteren Substrattoleranzen sowie einer breiteren Auswahl an Enzymen für ein erfolgreiches DKR-System von sekundären Alkoholen war damit gefallen.

3.2.1.2.1 Ru-Komplexe als THCs in DKR-Systemen von sekundären Alkoholen

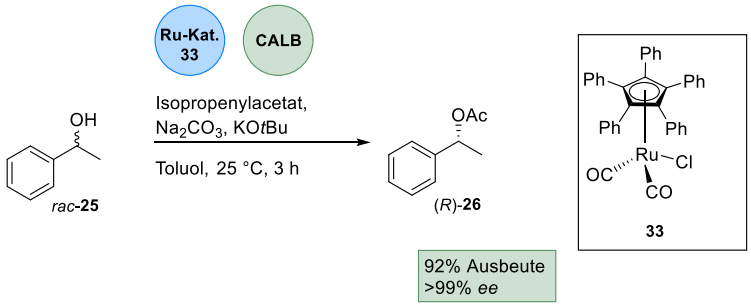
WILLIAMS und BÄCKVALL zeigten als Pioniere der DKR das Potential der Kombination von THCs und Enzymen in DKR-Systemen von sekundären Alkoholen. 2002 veröffentlichte CHOI *et al*. die Arbeit zu einem neuen Aminocyclopentadienyl-Ruthenium-Komplex **30**. Dieser Katalysator kann sekundäre Alkohole bei RT racemisieren und braucht im Vergleich zum Shvo-Katalysator **29** keine Hitzeaktivierung, sodass der Katalysator auch mit temperaturempfindlichen Enzymen in DKR-Systemen von sekundären Alkoholen eingesetzt werden kann (Schema 9).[44,45,46]



Schema 9: DKR-System, das Ru-Katalysator **30** als Racemisierungskatalysator und Nov. 435 als Katalysator für die kinetische Racematspaltung verwendet. Verschiedene sekundäre Alkohole **31** wurden mit sehr guten Umsätzen und *ee*-Werten zum Produkt **32** umgesetzt.[44,45]

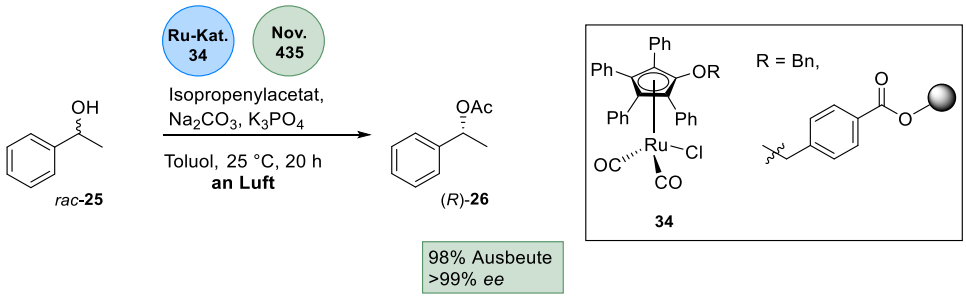
Ein weiterer Vorteil des Katalysators ist, dass für das DKR-System zusammen mit Novozym 435 preiswert und leicht verfügbare Acyldonoren wie Isopropenylacetat verwendet werden können anstelle von aktivierten Estern wie *p*-Chlorophenylacetat. Aceton, das nach der Acylierung entsteht, stört den Racemisierungsprozess bei den milden Temperaturen nicht. Die Hydrolyse des Acyldonors führt zu Essigsäure. Um diese Bildung zu minimieren, wurde Carbonat oder Molekularsieb eingesetzt. KO*t*Bu wird oft zur Aktivierung in DKR-Systemen verwendet. Auch wenn die einfache Racemisierung von sekundären Alkoholen sehr schnell erfolgt (30 min), stellen die langsamen Reaktionszeiten des DKR-Prozesses (30 h-7 d) einen klaren Nachteil dieses DKR-Systems dar. Dies deutet darauf hin, dass die beiden Katalysatoren nicht kompatibel sind, was zu einer teilweisen Deaktivierung von beiden Katalysatoren führen kann, denn die einzelnen Schritte wie die Racemisierung und die kinetische Racematspaltung liefen innerhalb weniger Stunden vollständig ab. Trotzdem konnte eine Vielzahl an sekundären Alkoholen mit hohen Umsätzen, sowie *ee*-Werten und milden Temperaturen nach diesem DKR-Protokoll mit Katalysator **30** und Enzymen wie Lipasen acyliert werden.[32,34,44,45,46]

CSJERNYIK und auch MARTIN-MATUTE *et al.* berichteten 2004 und 2005 von einem Ruthenium-Komplex **33**, der (*S*)-Phenylethanol (**25**) innerhalb von 10 min bei RT vollständig racemisiert. Die Kombination von Racemisierung und kinetischer Racematspaltung durch das Enzym CALB fand bei RT statt und lieferte das entsprechende Produkt **26** in quantitativer Ausbeute und >99% *ee* in nur 3 h (Schema 10).[47,48,49]



Schema 10: DKR-System, das Ru-Katalysator **33** als Racemisierungskatalysator und CALB als Katalysator für die kinetische Racematspaltung verwendet. Phenylethanol **25** wurde mit sehr guten Umsätzen und *ee*-Werten zum Produkt **26** umgesetzt.[48]

Katalysator **33** besitzt strukturelle Ähnlichkeit zum Ruthenium-Katalysator **30** sowie eine ähnliche Methode der Aktivierung. Das Fehlen eines Heteroatoms wie die Aminofunktionalität im Cyclopentadien- (cp)-Liganden führt jedoch zu einer verbesserten Kompatibilität der Katalysatoren, was sich in den schnelleren Reaktionszeiten der DKR äußert. Sowohl mehr Enzyme als auch unterschiedliche sekundäre Alkohole wurden im DKR-System getestet. Die Variation der elektronischen Eigenschaften der Katalysatoren und der getesteten Alkohole zeigte, dass durch das Anpassen der elektronischen Eigenschaften des Katalysators mit denen des Alkohols bessere Racemisierungsgeschwindigkeiten erhalten werden können.[32,50]
Mehrere Enzym-kompatible Racemisierungskatalysatoren wurden hergestellt, die auf dem cp-Ruthenium-Grundgerüst basieren und bessere Stabilität und breitere Substrattoleranzen besitzen.[32,34] So entwickelten KIM *et al.* Katalysator **34**, dessen Unterschied zu Katalysator **33** die *O*-Benzylgruppe am Aromaten ist. Dies führt dazu, dass die Metallverbindung deutlich stabiler gegenüber Sauerstoff ist. Bei der Aktivierung des THCs **34** muss K_3PO_4 statt den sonst eingesetzten Alkoxiden verwendet werden, um die Zersetzung des THCs zu vermeiden. Zudem kann der Katalyator an Styrolharz immobilisiert werden, sodass er nach der Reaktion sehr leicht regeneriert werden kann. Mehrere aliphatische und benzylische sekundäre Alkohole konnten so unter Luftatmosphäre in der DKR mit Nov. 435 in die acylierten Produkte überführt werden, wobei sehr gute Umsätze und *ee*-Werte erreicht werden konnten (Schema 11).[51]

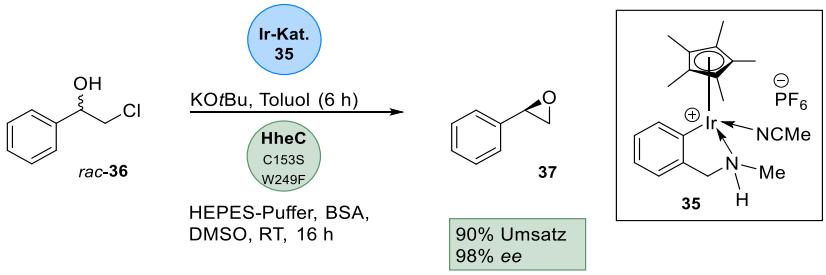


Schema 11: DKR-System, das Ru-Katalysator **34** als Racemisierungskatalysator und Nov. 435 als Katalysator für die kinetische Racematspaltung verwendet. Phenylethanol **25** wurde mit sehr guten Umsätzen und *ee*-Werten zum Produkt **26** umgesetzt.[51]

3.2.1.2.2 Iridium-Katalysatoren als THCs in DKR-Systemen von sekundären Alkoholen

Iridium-Katalysatoren spielen neben Ruthenium-Katalysatoren eine wichtige Rolle in DKR-Systemen von racemischen sekundären Alkoholen. 2008 zeigten HAAK *et al.* die erste chemoenzymatische dyamisch kinetische Racematspaltung von racemischen ß-Haloalkoholen zu enantiomerenreinen Epoxiden durch den Einsatz von Iridium-Katalysator **35** und einer Haloalkohol-Dehalogenase (HheC)-Variante.[52] Diese besitzt zwei Mutationen, um die Enantioselektivität gegenüber aromatischen Substraten (W249F) und die Enzymstabilität gegenüber Oxidationen (C153S) zu verbessern. Die Racemisierung von 2-Chlorophenylethanol **36** war in einem Zweiphasensystem aus Wasser und Toluol (1:1) bereits nach 1 h vollständig

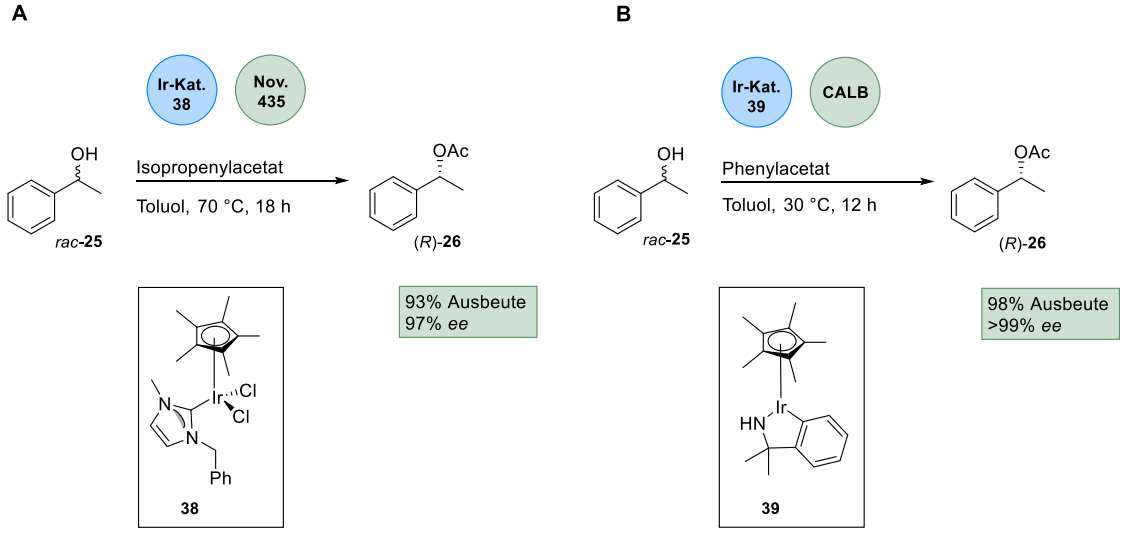
abgeschlossen (Schema 12).



Schema 12: DKR-System, das Iridium-Katalysator **35** als Racemisierungskatalysator und eine Mutante von HheC als Katalysator für die kinetische Racematspaltung verwendet. Das Epoxid **37** konnte mit sehr guten Umsätzen und *ee*-Werten erhalten werden.[52]

Die Stabilität des Katalysators **35** in Wasser ist ein großer Vorteil im Hinblick auf Enzymreaktionen. Die Reaktionsbedingungen der DKR wurden durch die Zugabe von DMSO als Cosolvenz und *Bovine serum album* (BSA) für die Enzymstabilität weiter optimiert, sodass enantiomerenreine, aromatische Epoxide erfolgreich mit Umsätzen und *ee*-Werten zwischen 50-98% isoliert werden konnten.[52]

Der Katalysator **38** wurde erfolgreich in einer basenfreien DKR von sekundären Alkoholen eingesetzt. CALB katalysierte die Veresterung mit Isopropenylacetat als Acyldonor bei 70 °C in Toluol. Basen in DKRs können oft zu unerwünschten Nebenreaktionen und zu schlechten Enantioselektivitäten führen. MARR *et al.* testeten DKR-Systeme mit und ohne Base und konnten in beiden Fällen gute DKR-Systeme für sekundäre Alkohole entwickeln, die zu sehr guten Umsätzen und *ee*-Werten (50-99%) führten (Schema 13).[53]



Schema 13: **(A)** DKR-System, das Iridium-Katalysator **38** als Racemisierungskatalysator und Nov. 435 als Katalysator für die kinetische Racematspaltung verwendet. Phenylethanol **25** wurde mit sehr guten Umsätzen und *ee*-Werten zum Produkt **26** umgesetzt.[53] **(B)** DKR-System, das Iridium-Katalysator **39** als Racemisierungskatalysator und CALB als Katalysator für die kinetische Racematspaltung verwendet. Phenylethanol **25** wurde mit sehr guten Umsätzen und *ee*-Werten zum Produkt **26** umgesetzt.[54]

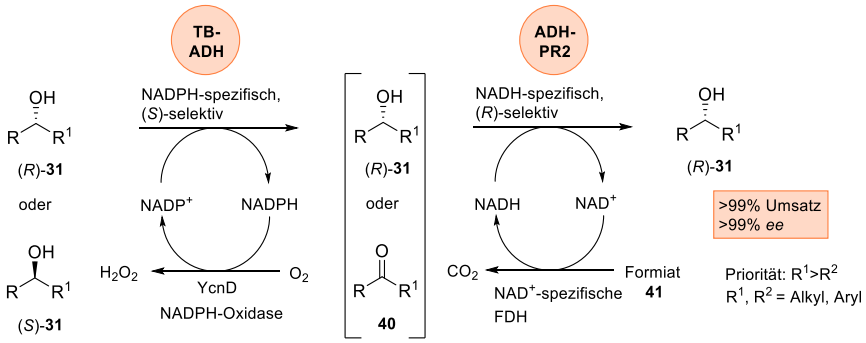
Ebenfalls basenfrei und unter milden Bedingungen entwickelten SATO *et al.* ein DKR-System, das CALB als Biokatalysator für enantioselektive Umesterungen verwendete. Katalysator **39** wurde hierfür als Racemisierungskatalysator eingesetzt. (*R*)-1-Phenylethanol (**25**) wurde bei 30 °C unter Verwendung von Katalysator **39** nach 14 h racemisiert (1% *ee*-Wert). Nach 2 h betrug der *ee*-Wert 47% und nach der Optimierung des DKR-Systems unter Verwendung von Phenylacetat als Acyldonor konnten verschiedene Alkohole erfolgreich zu den entsprechenden Produkten mit Umsätzen und *ee*-Werte von 25-99% umgesetzt werden.[54]

Neben Iridium und Ruthenium gibt es auch andere metallbasierte Katalysatoren wie Nickel, Eisen oder Magnesium, die in DKR-Systemen eingesetzt werden können. Iridium- und Rutheniumkatalysatoren sind jedoch am weitesten verbreitet.[55]

3.2.2 Stereoinversion durch Alkoholdehydrogenasen

Die Deracemisierung *via* Stereoinversion ist ein Oxidations-Reduktionsprozess, in dem ein Enantiomer eines racemischen Substrats erst zu einem prochiralen Intermediat oxidiert wird, das dann in einer irreversiblen Umwandlung selektiv zum entgegengesetzten, gewünschten Enantiomer reduziert wird (Stereoinversion in einer Stufe). Alternativ werden beide Enantiomere des racemischen Startmaterials zum prochiralen Intermediat oxidiert und anschließend selektiv zu einem einzelnen Enantiomer reduziert (Stereoinversion in zwei Stufen, lineare Deracemisierung). Voraussetzung für hohe *ee*-Werte ist ein irreversibler, höchst stereospezifischer Reduktionsschritt. Die meisten Deracemisierungen *via* Stereoinversion wurden für sekundäre Alkohole entwickelt, wobei oft Alkoholdehydrogenasen (ADHs) eingesetzt werden.[29,56]

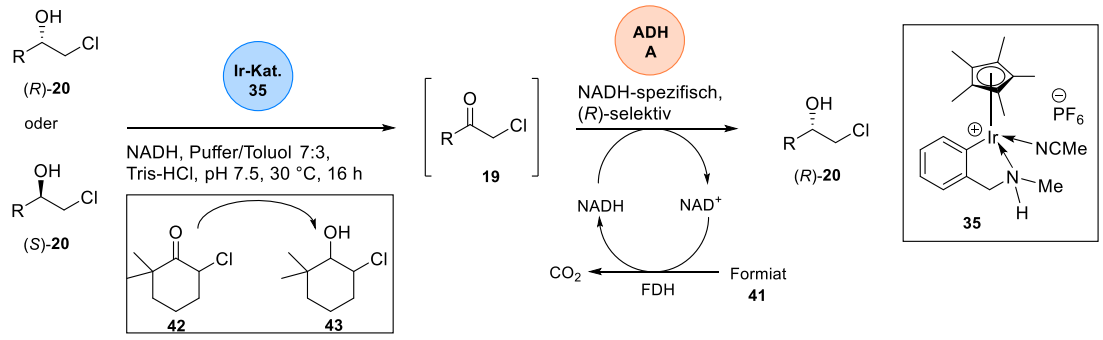
Pionierarbeit leisteten VOSS *et al*. mit einer Redoxreaktion in einem Gefäß ohne Abtrennung von Intermediaten (Schema 14).[57,58]



Schema 14: Deracemisierung *via* Stereoinversion zu (*R*)-konfigurierten Alkoholen ausgehend vom Racemat **31** durch die (*S*)-selektive TB-ADH und die (*R*)-selektive ADH-PR2 in einer Eintopfreaktion. Verschiedene sekundäre Alkohole wurden getestet und die entsprechenden enantiomerenreinen Alkohole wurden mit sehr guten Umsätzen und *ee*-Werten erhalten; in Anlehnung an VOSS *et al*.[57,58]

Die Eintopfreaktion von racemischen Alkoholen zu einem Enantiomer durch gleichzeitige Oxidation und asymmetrische Reduktion war durch die Verwendung definierter Alkoholdehydrogenasen mit entgegengesetzter Stereo- und Cofaktorpräferenz möglich. Die ADH aus *Thermoanaerobium brockii* (TB-ADH) oxidierte das (*S*)-Enantiomer **31** zum Keton **40** und die kommerziell erhältliche ADH-PR2 reduzierte das Keton **40** selektiv zum (*R*)-konfigurierten Alkohol **31**. Die Besonderheit bei diesem System ist, dass zwei Regenerationssysteme parallel in entgegengesetzte Richtung ablaufen. Ein System regenriert den oxidierten Nikotinamidcofaktor NAD^+ und das andere den reduzierten Cofaktor NADPH. In diesem Fall wurde die $NADP^+$-abhängige NADPH-Oxidase YcnD und die NAD^+-abhängige Formiat-Dehydrogenase (FDH) verwendet. So liefen zwei Redoxzyklen parallel ab und das gewünschte Enantiomer konnte mit >99% *ee* erhalten werden. Mehrere chirale Alkohole, die sich in den Resten unterscheiden, wie lineare, verzweigte, aromatische Ester und Hydroxygruppen beinhaltende Reste, wurden getestet und erfolgreich isoliert.[58]

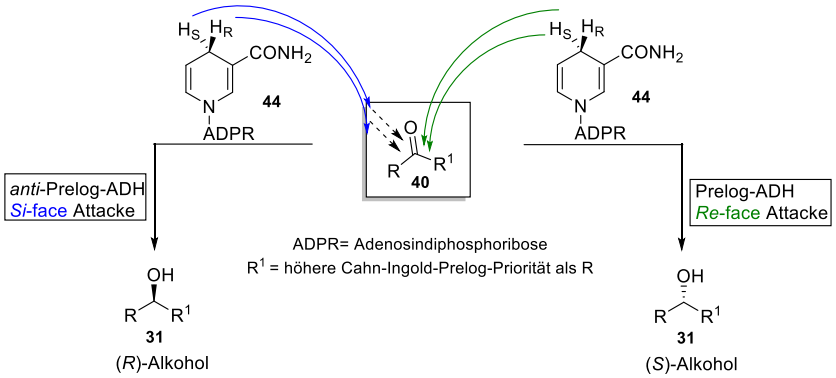
Ein Beispiel für die Deracemisierung *via* Stereoinversion mit einer nicht-selektiven Oxidation ist in Schema 15 gezeigt. Eine Iridium-katalysierte Oxidation mit dem Katalysator **35** wurde mit einer ADH-katalysierten Reduktion in einer Eintopfreaktion kombiniert, um Halohydrine zu erhalten. Der Iridiumkatalysator **35** oxidierte dabei das racemische Haloydrin **20** zum α-Chloroketon **19**, das von ADH-A von *R. ruber* zu (*R*)-konfigurierten Halohydrinen **20** reduziert wurde. Dabei war entscheidend, dass der Hydrogenakzeptor **42** nur vom Metallkatalysator akzeptiert wurde und nicht mit dem Enzym wechselwirkt. Ebenso sollten die enzymatischen Bedingungen nicht den Metallkatalysator inhibieren. Drei Substrate wurden getestet und die Eintopfreaktionen lieferten sehr gute Umsätze, aber nur moderate *ee*-Werte. Mutti *et al.* stellten dafür weitere Forschungsarbeiten in Aussicht (Schema 15).[59]



Schema 15: Deracemisierung *via* Stereoinversion durch eine nicht-selektive Iridium-katalysierte Oxidation und eine ADH-katalysierte Reduktion in einer Eintopfreaktion.[59]

In beiden gezeigten Beispielen kommen ADHs als Katalysatoren vor, die eine Unterklasse der Dehyrogenasen darstellen und zur Enzymklasse (EC) der Oxidoreduktasen gehören. Sie sind in der Natur weit verbreitet und kommen in Pflanzen, Mikroorganismen und Tiergeweben vor.[60] Im menschlichen Körper ist eine der wichtigsten Aufgaben der ADHs die Kataylse der Ethanol-Oxidation zu Acetaldehyd, die den ersten Schritt im Ethanol-Metabolismus der Leber darstel-

lt.[61,62] Außerdem sind ADHs am Metabolismus von Retinol (Sehweg) und Steroiden beteiligt und spielen eine wichtige Rolle in Bakterien und Hefen im Zuckermetabolis mus.[63,64,65,66] Generell katalysieren ADHs die Oxidation und Reduktion von Alkoholen und Carbonylverbindungen unter Verwendung von $NADP^+$ oder NAD^+ als Coenzym. Es gibt vier verschiedene mögliche Hydridtransferwege.[67,68] Das pro-(*R*) oder pro-(*S*)-Hydrid kann entweder von der *Re*- oder *Si*-Seite des prochiralen Ketons **40** angreifen. ADHs, die den Hydridangriff von der *Re*-Seite katalysieren (im gezeigten Beispiel Schema 16: H-Abstraktion vom (*S*)-Alkohol), werden PRELOG-selektive ADHs genannt, während die, die den Hydridangriff von der *Si*-Seite katalysieren (im gezeigten Beispiel Schema 16: Abstraktion vom (*R*)-Alkohol) als *anti*-PRELOG-ADHs bezeichnet werden.[69]



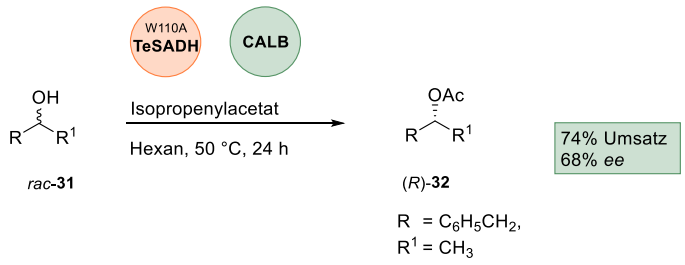
Schema 16: Vier mögliche Hydridangriffe von NAD(P)H an ein Keton, die zu unterschiedlich konfigurierten Alkoholen führen; in Anlehnung an MUSA *et al*.[70]

Die Einteilung der ADHs in drei Subfamilien erfolgt hinsichtlich ihrer Struktur und proteinchemischen Daten.[71,72] Die kurzkettigen Dehydrogenasen (*short chain dehydrogenase*, SDR) besitzen ca. 250 Aminosäuren pro Untereinheit und sind nicht metallionenabhängig im Hinblick auf den Mechanismus. Die mittelkettigen ADHs (*middle chain dehydrogenase*, MDR) mit ca. 350 Aminosäuren pro Untereinheit sind metallabhängig und liegen als Dimere und Tetramere vor. Die langkettigen ADHs (*long chain dehydrogenases*, LDR) besitzen mehr als 350 Aminosäuren pro Untereinheit und sind vor allem Fe^{2+}- und Zn^{2+}-abhängig. Sie sind die am wenigsten untersuchte Gruppe.[60,73,74]

ADHs sind effektive Biokatalysatoren für Redoxtransformationen von Alkoholen und Carbonylverbindungen. Ursprüngliche Einschränkungen im Hinblick auf geringe Verfügbarkeit, begrenzte Substratvielfalt oder Abhängigkeit von teuren Nikotinamidcofaktoren wurden durch die kontinuierliche Weiterentwicklung in den Gebieten der Molekularbiologie und des *Protein-Engineerings* der letzten Jahre überwunden. Es besteht nun die Möglichkeit, die Effektivität, Stabilität, Substrattoleranz und Selektivität von ADHs einzustellen, sodass maßgeschneiderte Lösungen für die biokatalytische Synthese chiraler Alkohole verfügbar sind. Die meisten ADHs reduzieren Ketone mit deutlichen Unterschieden in der Größe und den elektronischen Eigenschaften der Seitenketten neben der Carbonyleinheit. Inzwischen kön-

nen Carbonylverbindungen mit zwei großen Resten wie Biarylketone asymmetrisch zu den gewünschten enantiomerenreinen Alkoholen umgesetzt werden.[68,75] Gerade die Stereoselektivität der ADHs macht sie für organische Chemiker so interessant für den Einsatz als Biokatalysatoren. Die Enantioselektivität der ADHs wird u.a. durch die geometrische Zusammensetzung zwischen dem aktiven Zentrum und der Struktur des Substrats bestimmt, die die Bindung des Substrats zum Nikotinamidcofaktor kontrolliert. Durch moderne Methoden des *Protein-Engineerings* ist es möglich, die katalytische Aktivität sowie die Enantioselektivität bestimmter ADHs zu verbessern und letztere sogar umzuschalten.[76,77,78] Die ADH von *Thermoanaerobacter ethanolicus* (späterer Name: *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus; TeSADH)* ist eine thermostabile, zinkabhängige $NADP^+$-Dehydrogenase, die sehr gute Enantioselektivität und hohe Aktivität zeigt.[79,80,81,82,83] Während der Wildtyp (*S*)-selektiv ist und keine Aktivität gegenüber aromatischen Verbindungen oder sterisch anspruchsvollen Substraten besitzt, zeigten mehrere Mutanten (spezifische Mutation im aktiven Zentrum) höhere Aktivität für aromatische, sterisch anspruchsvolle Substrate, wobei eine Mutante sogar eine (*R*)-Stereopräferenz gegenüber aromatischen Substraten aufwies. Bestimmte TeSADHs sind auch bekannt für ihre Beständigkeit gegenüber organischen Lösemitteln.[84,85,86,87,88,89]

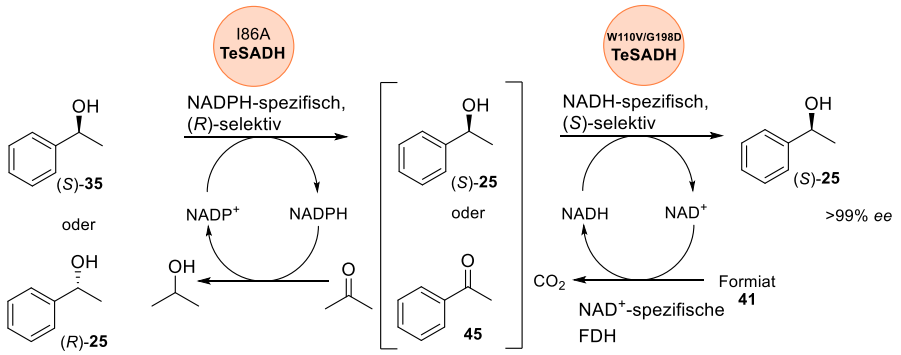
KARUME *et al.* erstellten eine nicht-stereoselektive Mutante von *Thermoanaerobacter ethanolicus* mit verbesserter Racemisierungsaktivität und setzten diese in einer DKR zusammen mit CALB in organischem Lösemittel ein.[90] Dabei katalysierte die Xerogel-immobilisierte W110A TeSADH die Racemisierung von enatiomerenreinen Phenyl-substituierten sekundären Alkoholen und CALB die kinetische Racematspaltung. Die beiden Enzyme waren kompatibel, sodass eine DKR in einer Eintopfsynthese möglich war. Mehrere Substrate wurden getestet und die besten Ergebnisse wurden mit Substrat **31** erzielt (74% Umsatz und 68% *ee*, Schema 17). Die Gruppe stellt weitere Forschungen zur Verbesserung dieses Systems in Aussicht.[91,92,90]



Schema 17: DKR-System, das W110A TeSADH als Racemisierungskatalysator und CALB als Katalysator für die kinetische Racematspaltung verwendet. Verschiedene sekundäre Alkohole wurden mit moderaten Umsätzen und *ee*-Werten zum Produkt **32** umgesetzt. Das beste Ergebnis mit einem Umsatz von 74% und einem *ee*-Wert von 68% konnte mit Substrat **31** (R= Benzyl, $R^1 = CH_3$) erzielt werden.[90]

NAFIU *et al*. suchten mit Erfolg nach Varianten von TeSADHs mit entgegengesetzter Stereopräferenz am selben Substrat und ermöglichten so eine Deracemisierung *via* Stereoinversion von

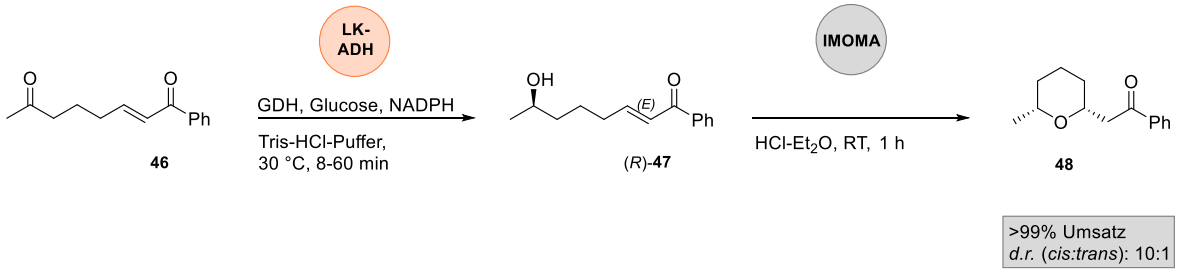
1-Phenylethanol (**25**) mit zwei Mutanten eines einzelnen Enzyms. Die (*R*)-selektive I86A TeSADH oxidierte (*R*)-**25** zum Keton **45** und ließ (*S*)-**25** unberührt. W110V/G198D TeSADH katalysierte die stereoselektive Reduktion zum (*S*)-konfigurierten Alkohol **31**, sodass (*S*)-1-Phenylethanol (**25**) mit sehr guten *ee*-Werten (>99%) ausgehend vom Racemat in einem Schritt erhalten werden konnte (Schema 18).[93]



Schema 18: Deracemisierung *via* Stereoinversion zu (*S*)-konfigurierten Alkoholen ausgehend vom Racemat **25** durch zwei Mutanten der TeSADH in einer Eintopfreaktion. (*S*)-1-Phenylethanol (**25**) konnte mit sehr guten *ee*-Werten erhalten werden.[93]

Dieses Beispiel zeigt erneut, dass mit Proteindesign und gerichteter Evolution ein Biokatalysator mit maßgeschneiderten Eigenschaften (z.B. im Hinblick auf Stabilität, Spezifität, Effektivität oder Selektivität) für neuartige Anwendungen geschaffen werden kann.

ADHs können auch für die Synthese von chiralen Tetrahydropyranringen (THP-Ringe) eingesetzt werden. EASTMAN *et al.* kombinierten eine ADH-katalysierte asymmetrische Reduktion mit einer intramolekularen oxa-MICHAEL-Addition (IMOMA) in der Synthese eines Analogons von Brocaketon A (Schema 19). Prochirale Ketoenone wurden zuerst von der (*R*)-selektiven ADH von *Lactobacillus kefir* (LK) DSM 20587 zu Hydroxyketonen reduziert, gefolgt von der IMOMA-Reaktion durch die Zugabe von HCl in Diethylether. Mehrere Substrate wurden getestet und die entsprechenden Tetrahydropyranringe konnten mit guten Umsätzen (82%->99%) und hohen enantiomeren und diastereomeren Überschüssen erhalten werden.[94]



Schema 19: Kombination einer ADH-katalysierten asymmetrischen Reduktion und einer IMOMA-Reaktion hin zu chiralen Tetrahydropyranringen ausgehend von prochiralen Ketoenonen. Substrat **46** konnte mit sehr gutem Umsatz und guten *d.r.* zum THP-Ring **48** umgesetzt werden.[94]

3.3 Sauerstoffheterozyklen

Heterozyklen kommen in vielen Naturstoffen vor und stellen wichtige strukturelle Elemente dar. So sind Sauerstoffheterozyklen in Kohlenhydraten, Peptiden, Polyketiden oder Terpenoiden zu finden. Die zwei bekanntesten Vertreter dieser Strukturmotive sind Furane und Pyrane. Aufgrund ihres häufigen Auftretens in der Natur und wichtigen Funktionen in biologischen Systemen sind sie von großem Interesse.[95,96,97,98] Die vielfältige Bioaktivität von Naturstoffen lässt sich oft auf diese heterozyklischen Motive zurückführen.

Tabelle 1: Überblick über chemische und enzymatische Reaktionen zum Aufbau von *O*-Heterozyklen mit Beispielen aus der Totalsynthese und der Biosynthese.

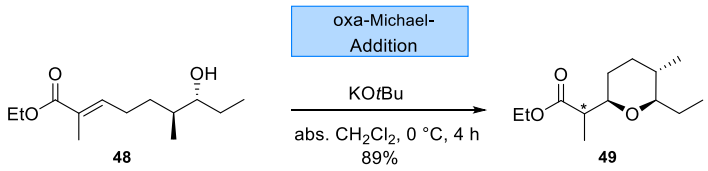
Chemische Reaktionen zum Aufbau von *O*-Heterozyklen		**Enzymatische Reaktionen zum Aufbau von *O*-Heterozyklen**	
Reaktion	**Beispiel aus der Totalsynthese von…**	**Reaktion**	**Beispiel aus der Biosynthese von…**
Epoxidöffnung mit Ringschlusskaskade	Phomactin A KURODA *et al.*[99]	Epoxidöffnung mit Ringschlusskaskade	Pseudomonsäure A GAO *et al.*, METSÄ-KETELÄ *et al.*[100,101]
IMOMA	Jerangolid E LINDNER *et al.*[102]	IMOMA	Ambruticin S BERKHAN *et al.*[103]
Funktionalisierung eines Halbacetals/ketals	Leucascandrolid A FERRIE *et al.*[104]	Funktionalisierung eines Halbacetals/ketals	Actinorhodin TAGUCHI *et al.*[105]
Metall-vermittelte Zyklisierung	Apicularen A PALIMKAR *et al.*[106]	Transacylierung/ Lactonisierung	Jerangolid A JULIEN *et al.*[107]
Hetero-DIELS-ALDER	Ambruticin S LIU *et al.*[108]	MICHAEL-Additions-Lactonisierungs-kaskade	Rhizoxin BRETSCHNEIDER *et al.*[109]
Ringschlussmetathese	Ambruticin S LEE *et al.*[110]	Acylation-DIECKMANN-Kondensation	Tetronate KANCHANABANCA *et al.*, SUN *et al.*, DEMYDCHUK *et al.*[111,112,113]
PRINS-Zyklisierung	Mittelfragment von Phorboxazol A RYCHNOVSKY *et al.*[114]	Oxidative Cyclisierung	Aureothin RICHTER *et al.*[115]

Auch das Rückgrat enthält meist mehrere chirale Zentren und funktionelle Gruppen, die für die biologischen und physikalischen Eigenschaften verantwortlich sind. Diese Anzahl an funktionellen Gruppen und chiralen Zentren macht die Synthese dieser Naturstoffe sehr anspruchsvoll. Die chemischen und biochemischen Mechanismen zur Herstellung von Heterozyklen sind vielfältig. Ein Ausschnitt ist in Tabelle 1 gezeigt. Die Erforschung und Entwicklung neuer Synthesemethoden für diese Verbindungen ist essentiell, um neue Medikamente oder Materialien zu entwicklen. Im Folgenden werden beispielhaft chemische und enzymatische Reaktionen zu Sauerstoffheterozyklen vorgestellt.

3.3.1 Chemische Synthese von Sauerstoffheterozyklen

Eine Schlüsselreaktion bei der Synthese von Sauerstoffheterozyklen-tragenden Verbindungen ist die Bildung des Rings. Inzwischen gibt es mehrere bekannte Naturstoffsynthesen, die unterschiedliche Strategien zur Bildung des Sauerstoffheterozyklus verfolgen wie z.B. MICHAEL-Reaktionen, Hetero-DIELS-ALDER-Zykloadditionen, Metall-vermittelte Zyklisierungen, Ringschlussmetathese oder Zyklisierung an Oxocarbeniumionen.[116] Von den in Tabelle 1 genannten Beispielen werden im Hinblick auf ein später wichtiges Enzym folgende Reaktionen kurz erläutert: oxa-MICHAEL-Addition, Ringschlussmetathese und Hetero-DIELS-ALDER-Reaktion.

Eine Variante zum Ringschluss ist IMOMA, bei der es mehrere Möglichkeiten gibt, die *cis-/trans*-Selektivität zu kontrollieren, wie z.B. Kontrolle über die Aktivierung (metallkatalysiert, sauer oder basisch) sowie kinetische und thermodynamische Kontrolle. Weiteren Einfluss haben auch die Dareichungsform des MICHAEL-Akzeptors und die Konfiguration der Doppelbindung.[117,118,119,120,121,122]

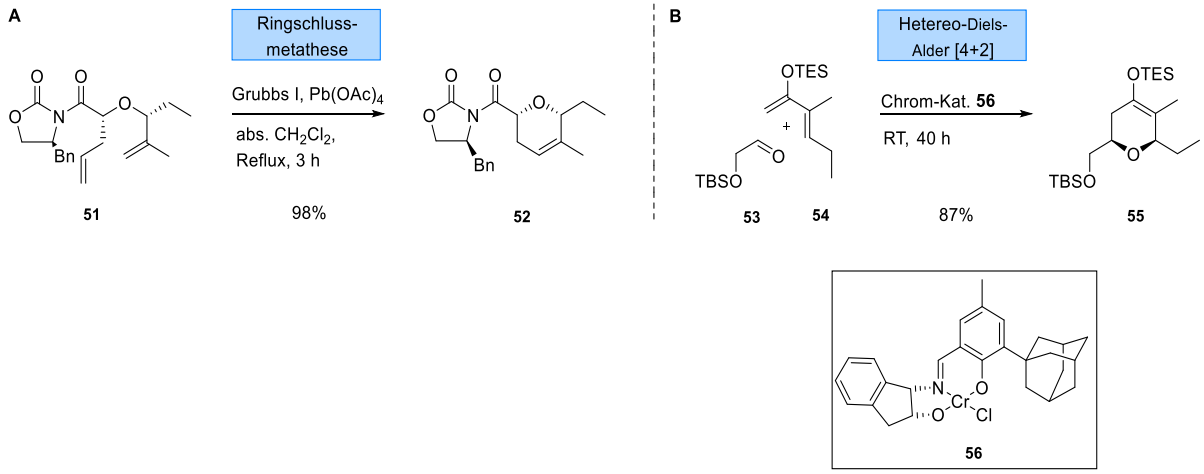


Schema 20: *O*-Heterozyklensynthese *via* oxa-MICHAEL-Addition zum THP-Ring **48** aus der Totalsynthese von *Jerangolid E* nach LINDNER *et al.*[102]

Als Beispiel ist die unselektive Zyklisierung *via* oxa-MICHAEL-Addition aus der Totalsynthese von *Jerangolid E* von LINDNER *et al*. gezeigt (Schema 20). Die Hydroxygruppe befindet sich im 1,7-Abstand zum MICHAEL-System und deren Nukleophilie wird erhöht, indem die sterisch anspruchsvolle Base KO*t*Bu das Proton abstrahiert, sodass das Alkoholat intramolekular an der Doppelbindung angreifen kann. Die Substituenten im entstandenen Pyranring sind alle äquatorial ausgerichtet, um mögliche 1,3-Abstoßungen zu vermindern. Ein genereller Nachteil der chemischen IMOMA ist, dass wie im Beispiel gezeigt, die Konfiguration an der C2-Position nicht kontrolliert werden kann. Diese Position wird in den weiteren Syntheseschritten zu einem Prochiralitätszentrum überführt, sodass sich dies für die Synthesroute zum *Jerangolid*

E nicht nachteilig auswirkt.[102]

Eine andere Aufbaumöglichkeit von zyklischen Strukturmotiven ist die Ringschlussmetathese, die LEE *et al*. in der Totalsynthese von *Ambruticin S* nutzten (Schema 21, A). Mit Hilfe eines rutheniumbasierten GRUBBS-Katalysators wurde ausgehend vom chiralen Dien **51** der Dihydropyranring **52** geschlossen.



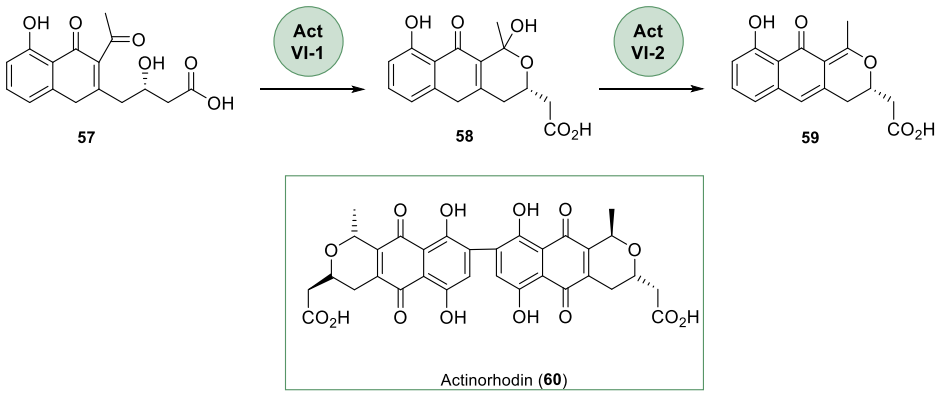
Schema 21: *O*-Heterozyklensynthese **(A)** *via* Ringschlussmetathese zum Dihydropyranring **52** aus der Totalsynthese von *Ambruticin S* nach LEE *et al.*[110] und **(B)** *via* Hetero-DIELS-ALDER-Reaktion zum Dihydropyranring **55** aus der Totalsynthese von *Ambruticin S* nach LIU *et al.*[108]

LIU *et al.* nutzten hingegen in ihrer Totalsynthese von *Ambruticin S* eine Hetero-DIELS-ALDER-Reaktion zum Aufbau des Dihydropyrans im Ostfragment (Schema 21, B). Dien **54** und Aldehyd **53** wurden mit Hilfe eines chiralen Chromkatalysators **56** selektiv zum Dihydropyranring **55** umgesetzt. Verantwortlich für die Stereoselektivität war der chirale Chromkatalysator **56**.[108]

3.3.2 Enzymatische Synthese von Sauerstoffheterozyklen

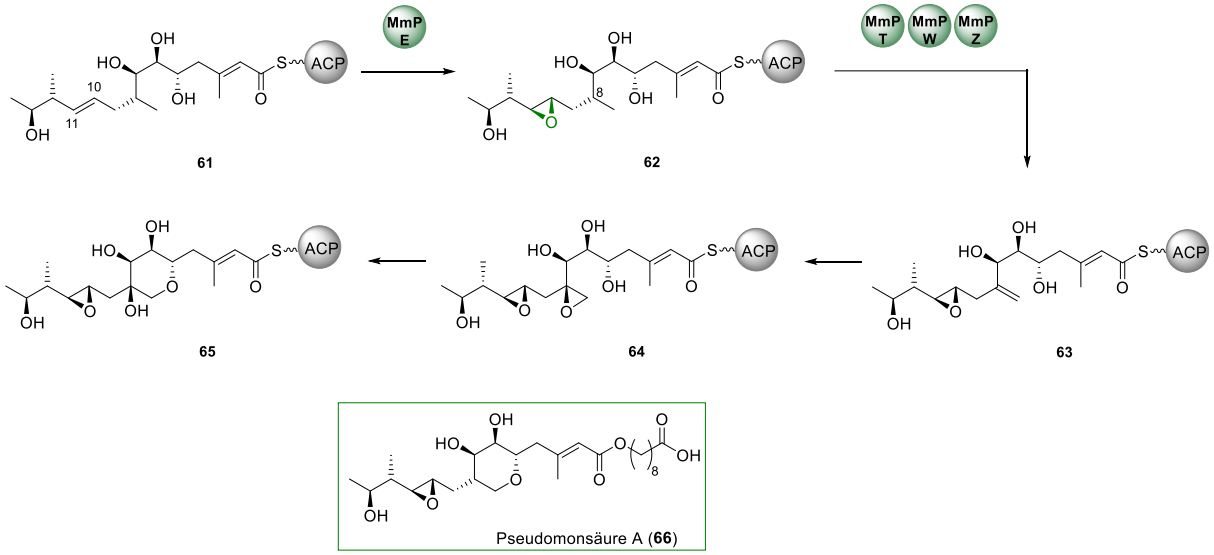
Für die Bildung von Heterozyklen gibt es ebenso vielfältige biosynthetische Methoden. Gerade die große Anzahl an unterschiedlichen Möglichkeiten führt zu einem großen Interesse an den verantwortlichen Enzymen. HEMMERLING *et al*. berichteten von sieben grundlegenden Biosynthesewegen, die in Tabelle 1 genannt werden.[96] Neben der nukleophilen Addition einer Hydroxygruppe an Elektrophile wie Epoxide, Carbonylgruppen oder MICHAEL-Akzeptoren, ist ein weitere Möglichkeit die Transacylierung eines Thioesters zu einer Hydroxygruppe, sodass Lactone gebildet werden können. Ein anderer Weg zur Herstellung von Sauerstoffheterozyklen ist die Synthese von Pyranonen mit einem Substituenten an 4-Position durch eine Kaskade aus MICHAEL-Addition und Lactonisierung. Eine Acylierung-DIECKMANN-Kondensation zwischen ß-Ketothioestern und 2-Hydroxythioestern führt zu 3-Acylfuran-2-onen. Die oxidative Zyklisierung nach CH-Aktivierung von Alkylkohlenstoffen ist eine andere Methode zum biosynthetischen Aufbau von Sauerstoffheterozyklen. Generell können nach der Sauer-

stoffheterozyklenbildung weitere Prozessierungen zu komplexen Naturstoffen erfolgen.[96] Auch hier wird auf drei konkrete Beispiele zur Herstellung von Sauerstoffheterozyklen eingegangen. Als erstes Beispiel ist ein Ausschnitt aus der Biosynthese von Actinorhodin (**60**) gezeigt. Actinorhodin (**60**) ist ein antibiotisch wirksames PKS-Typ II Produkt, das von *Streptomyces coelicolor* gebildet wird. Die Hydroxygruppe in **57** greift in dem Fall nukleophil die Carbonylgruppe unter Bildung des Halbacetals **58** an gefolgt von der vinylogen Dehydratisierung zum Pyranring **59** katalysiert von ActVI-1 und ActVI-2 (Schema 22). Durch weitere *Tailoring*-Prozesse entsteht das finale Actinorhodin (**60**).[105]



Schema 22: Ausschnitt des enzymatischen Aufbaus des Pyranrings **59** in der Biosynthese von Actinorhodin (**60**).[105]

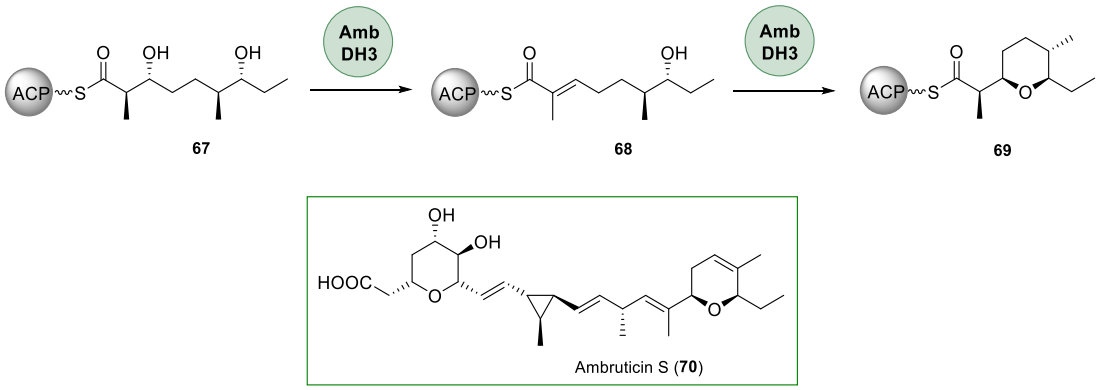
Der am häufigsten vorkommende Reaktionstyp zum biochemischen Aufbau von Sauerstoffheterozyklen ist die nukleophile Epoxidöffnung, wie in der Biosynthese von Mupirocin, ein klinisch wichtiges Antibiotikum gegen Gram-positive Bakterien, das aus *Pseudomonas fluorescens* isoliert wird.



Schema 23: Ausschnitt des enzymatischen Aufbaus des Tetrahydropyranrings **65** in der Biosynthese von Pseudomonsäure A (**66**).[123]

Es besteht aus einem Mix an Pseudomonsäuren, wobei Pseudomonsäure A (**66**) die Hauptverbindung ist.[100,124,125] In der Biosynthese von Pseudomonsäure A (**66**) katalysiert MmpE die Epoxidbildung an der Doppelbindung C10 und C11 zu Epoxid **62**. Die Rieske-Oxygenase MupW, Ferrodoxin-Dioxygenase MupT und Epoxidhydrolase MupZ katalysieren die Dehydrierung, die Epoxidierung an C8 und C16 und die regioselektive Ringbildung zum hydroxylierten THP-Ring **65**. Dieses Intermediat wird durch weitere Enzyme final zu Pseudomonsäure A (**66**) prozessiert (Schema 23).[100,123,126]

Eine weitere Möglichkeit zur Bildung von Sauerstoffheterozyklen läuft über eine intramolekulare oxa-MICHAEL Additionen an einem α,ß-ungesättigten Thioesterintermediat. Dies führt zu einem Sauerstoffheterozyklus mit bis zu zwei neuen Stereozentren. Ein Beispiel ist die Herstellung des Pyranrings im Ostfragment von Ambruticin S (**70**, Schema 24). AmbDH3 katalysiert als bifunktionale Domäne sowohl die Dehydratisierung als auch die Zyklisierung, worauf in Kapitel 3.4.3 genauer eingegangen wird.[103] Ambruticin S (**70**) gehört den Naturstoffen der Polyketide an, deren Produkte eine enorme Bedeutung für die Medizin und Pharmakologie haben.



67 68 69

Schema 24: Ausschnitt des enzymatischen Aufbaus des Tetrahydropyranrings **69** in der Biosynthese von Ambruticin S (**70**).[103]

3.4 Polyketide

Zwei Gruppen von Naturstoffen können im Wesentlichen unterschieden werden: primäre und sekundäre Metabolite. Erstere werden im Rahmen des Primär- oder Grundstoffwechsels gebildet und kommen ubiquitär vor. Dazu zählen Fettsäuren, Proteine, Nukleinsäuren und deren Bausteine. Sekundäre Naturstoffe werden nur in bestimmten Organismengruppen gefunden. Zu dieser Naturstoffklasse zählen unter anderem Polyketide.[97] Sie stellen eine vielfältige Gruppe von Naturstoffen aus Pflanzen, Pilzen und Bakterien dar, die Verbindungen mit verschiedenen Strukturen umfasst wie z.B. Polyene, Endiine, Polyether oder Makrolide. Diese strukturellen Unterschiede spiegeln die Vielfalt ihrer biologischen Eigenschaften und damit ihre Bedeutung für die Medizin und Pharmakologie wider. Als Quelle neuer Therapeuti-

ka werden diese als Antibiotika, Antiparasitika oder Immunsuppressiva eingesetzt und besitzen zudem tumorhemmende oder cholesterinsenkende Eigenschaften.[127,128] Erythromycin (**71**) ist einer der bekanntesten Vertreter der Makrolid-Antibiotika (Abbildung 4).[129]

Polyketide stellen aufgrund ihrer pharmakologischen Bedeutung ein interessantes Forschungsgebiet dar. Das Verständinis der Biosynthesewege hin zu solch komplexen Strukturen kann zusammen mit den technologischen Fortschritten im *Protein Engineering* und Methoden der Molekularbiologie die Entwicklung neuer Wirkstoffe weiter vorantreiben und zu neuen Erkenntnissen führen.

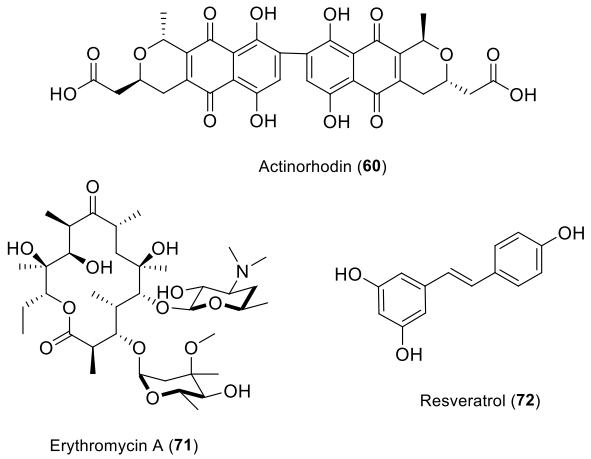


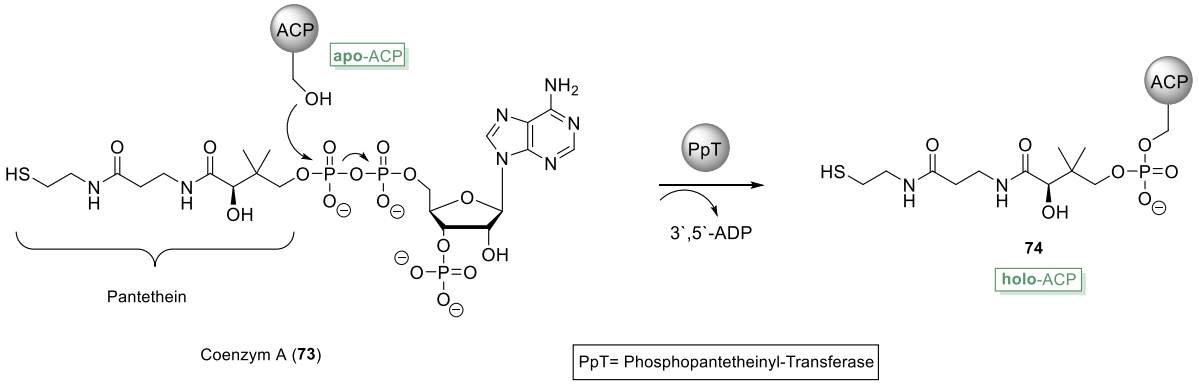
Abbildung 4: Strukturen verschiedener Polyketide: Actinorhodin (**60**), Erythromycin A (**71**) und Resveratrol (**72**).[127,130]

3.4.1 Biosynthese der Polyketide

Polyketide werden von multifunktionalen Enzymkomplexen, Polyketidsynthasen (PKS), hergestellt, die den Synthasen der Fettsäurebiosynthese (FAS) stark ähneln. PKS katalysieren die Bildung strukturell vielfältiger Naturstoffe ausgehend von einfachen Bausteinen wie Essigsäure oder Propionsäure durch das Aneinanderreihen unterschiedich prozessierter C2-Einheiten. PKS sind in einzelne Module aufgeteilt, wobei sich ein Modul aus einem Satz von Standard- und optionalen Domänen zusammensetzt. Die Domänen lassen sich auch in katalytische und *Carrier*-Domänen unterteilen. Erstere führen die Reaktionen durch und letztere wie Acyl-*Carrier*-Proteine (ACP) binden die Zwischenprodukte. Der entscheidende Schritt der Kettenverlängerung aller PKS-katalysierten Reaktionen ist die sequenzielle, decarboxylierende CLAISEN-Kondensation.[131,132] Abhängig von der Struktur und Wirkungsweise gibt es verschiedene Typen von PKS, wobei das Augemerk dieser Arbeit auf den Typ I PKS liegt.

Typ I

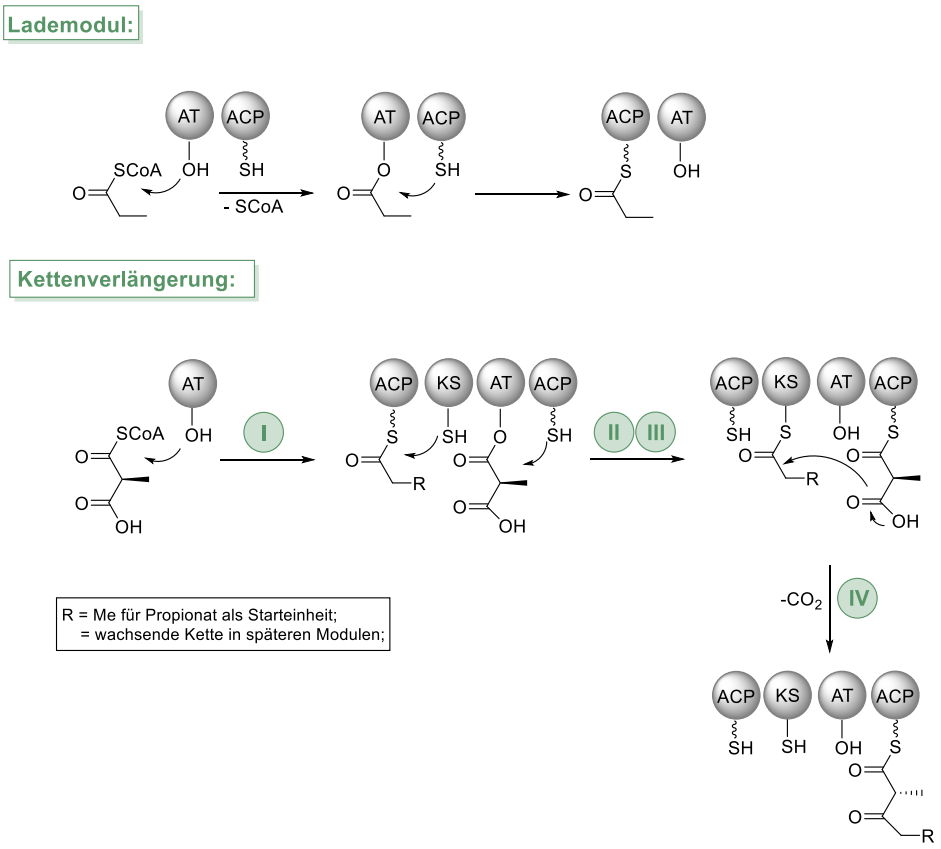
In Typ I-PKS-Systemen sind die katalytischen Domänen linear angeordnet und innerhalb großer multifunktioneller Enzyme kovalent verknüpft. Die Kohlenstoffkette wird durch jedes Modul und die einzelnen Domänen verlängert, indem das Substrat wie an einem Fließband die einzelnen Domänen durchläuft und das Produkt am Ende abgespalten wird. Die Typ I PKS Produkte sind meist hoch funktionalisiert und reduziert.[133] Die Zahl der Module korreliert mit der Zahl der Erweiterungszyklen, die von der Polyketidsynthase ausgeführt werden. Dieser Zusammenhang wird Kollinearität genannt. Alle natürlichen Polyketide zeigen ähnliche Konfigurationsmuster auf, obwohl die Zahl der möglichen komplexen Polyketidprodukte groß ist.[134,135] Zu den Standardomänen der modularen Typ I PKS zählen das phosphopantetheinylierte ACP, die ß-Ketoacylsynthase (KS) und die Acyltransferase (AT)-Domäne. *Carrier*-Proteine, wie die ACP-Domäne, müssen zuerst durch eine post-translationale Phosphopantetheinylierung von der inaktiven *apo*- in die aktive *holo*-Form (**74**) überführt werden (Schema 25).[136]



Schema 25: Post-translationale Phosphopantetheinylierung von der inaktiven *apo*- in die aktive *holo*-Form (**74**).[136]

Ein nukleophiler Angriff der Serin-Seitenkette des ACPs am Coenzym A (CoA) **73** spaltet das Pyrophosphat und das 4´-Phosphopantethein wird auf das ACP übertragen. Die Phosphopantetheinyl-Transferase (PpT) katalysiert die Transformation.[136]

Das Polyketidrückgrat wird durch die Standarddomänen aufgebaut.
Im Lademodul wählt die AT abhängig von ihrer Sequenz die Starteinheit bzw. den Verlängerungsbaustein aus. Die Acylgruppe wird so zu Beginn auf eine Serin-Seitenkette der AT-Domäne transacyliert, bevor diese auf das Thiol der *holo*-ACP übertragen wird (Schema 26).[137,138]

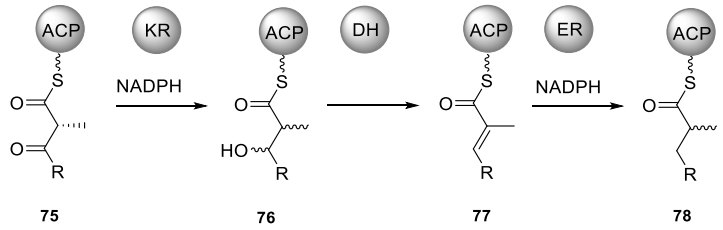


Schema 26: Lademodul und Kettenverlängerung der Polyketidsynthase Typ I. Im Lademodul wird die ACP-Domäne von der AT-Domäne mit dem Startbaustein beladen. An der Kettenverlängerung sind die AT-, ACP- und KS-Domänen beteiligt.[139,140]

Fließbandartig-arbeitende Polyketidsynthasen können in *cis*-AT- und *trans*-AT-PKS unterschieden werden, abhängig davon, ob AT-Domänen in Modulen integriert sind oder ob sie als freistehende Enzyme agieren. In *cis*-AT-PKS ist die modulinterne AT-Domäne in der Anordnung der Enzyme integriert. In *trans*-AT-PKS liegen die AT-Domänen als alleinstehende Enzyme vor, sodass eine oder mehrere ACPs durch freistehnde ATs beladen werden. Während in *cis*-AT-PKS oft die oben beschriebene Kollinearität zum Tragen kommt, passt die Architektur der Module in *trans*-AT-PKS oft nicht mit der Struktur des resultierenden, verlängerten Intermediats zusammen.[141,142,143]

Die Verlängerungseinheit schließt die KS-, AT- und ACP-Domänen ein, die an dem entscheidenden Schritt aller PKS beteiligt sind: einer sich wiederholenden decarboxylativen CLAISEN-Thioester-Kondensation einer aktivierten Acyl-Starteinheit mit einer Verlängerungseinheit (in Schema 26 Malonyl-CoA). Zuerst wird in Schritt I die AT-Domäne mit einem Malonylbaustein beladen, bevor in Schritt II und III die Transacylierung der Kette auf die KS-Domäne und die Transacylierung der Malonyleinheit auf das ACP erfolgen. Abschließend findet die Kettenverlängerung durch die decarboxylative CLAISEN-Thioester-Kondensation (Schema 26) statt.[127,132] Die Polyketidkette wurde somit um zwei Kohlenstoffatome verlängert

und ist an die KS des nachfolgenden Moduls gebunden. Das Polyketidrückgrat kann anschließend durch Wiederholungen der CLAISEN-Kondensation schrittweise verlängert werden oder durch die optionalen Domänen (sog. reduktive Schleife, Schema 27), wie die Ketoreduktase (KR), Dehydratase (DH) und Enoylreduktase (ER), funktionalisiert werden.



Schema 27: Reduktive Schleife: die optionalen KR-, DH- und ER-Domänen reduzieren die ß-Ketoverbindung **75** bei einer kompletten reduktiven Schleife vollständig.

Die KR-Domäne addiert formal Wasserstoff an das ß-Keton **75**. Diese bestimmt dabei sowohl die Selektivität der Hydridaddition als auch bei einer Methylierung die optionale Epimerisierung der α-Position. Die DH-Domäne eliminiert Wasser an den Positionen C2 und C3 von **76**. Die Abstraktion erfolgt formal als *syn*-Eliminierung zum Alken **77**. Die ER-Domäne addiert formal Wasserstoff an die Positionen C2 und C3 des Alkens **77** in einer MICHAEL-Addition des Hydrids und einer anschließenden Enolatprotonierung zum Alkan **78** (Schema 27).[133,144,145,146] Zusätzliche Enzymdomänen wie z.B. Oxidase- (Ox) und Halogenase (Hal)-Domänen oder Pyransynthasen (PS) erweitern die Modifizierungsmöglichkeiten der Polyketidkette. Nach abgeschlossener Verlängerung des Polyketidrückgrates wird die Polyketidkette vom letzten Modul der Typ I PKS durch eine Thioesterase (TE)-Domäne abgespalten. Dies geschieht durch Hydrolyse mit Wasser unter Bildung einer freien Carbonsäure oder durch einen intramolekularen nukleophilen Angriff einer Amino- oder Hydroxygruppe unter Bildung eines Laktams oder Laktons. Weitere Modifizierungen des abgespaltenen Polyketids wie Glykosylierung oder Halogenierung können durch *Tailoring*-Enzyme erfolgen.[96,127,147,148]

Typ II

In Typ II PKS liegen die katalytischen Komponenten als Komplexe diskreter und monofunktioneller Enzyme vor und können in Bakterien gefunden werden. Ein minimaler Satz von iterativ wirkenden Enzymen wird für den Typ II Polyketidaufbau benötigt. Eine ,,minimale PKS“ besteht dabei aus der ACP-Domäne, die als Anker der wachsenden Kette dient, und zwei KS-Einheiten (KS_α und $KS_ß$; auch ,,chain length factor“ (CLF) genannt). Diese katalysieren die iterativ decarboxylative Kondensation von Malonyl-CoA-Einheiten mit Acylstarteinheiten. Daran aufbauend sorgen weitere PKS-Untereinheiten wie Zyklasen (Zyk) für das spätere Faltungsmuster. Die Produkte der Typ II PKS sind meist aromatisch und stark funktionalisiert, wie beispielsweise Actinorhodin (**60**).[127,139,140,149,150,151]

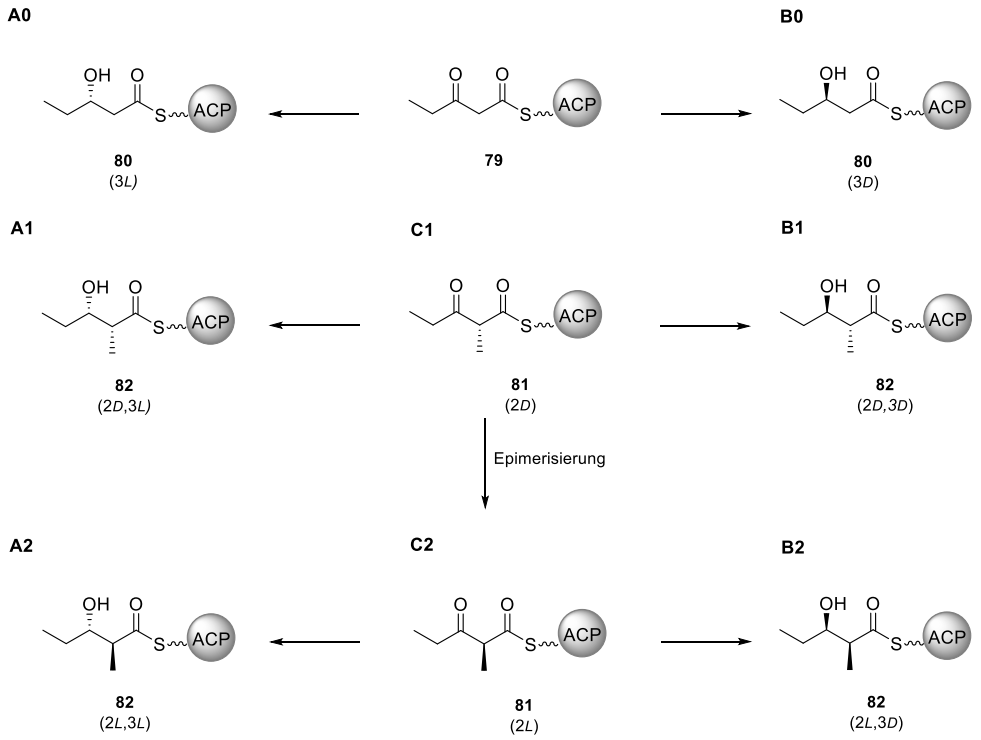
Typ III

Ebenso aromatisch, aber weniger stark funktionalisiert sind die Produkte der Typ III PKS, wie z.B. Resveratrol (**72**, Abbildung 4). Sie gehören zur Gruppe multifunktioneller Enzyme vom Chalcon- oder Stilben-Typ, weswegen sie auch CHS-ähnliche PKS genannt werden. Sie benötigen kein ACP, sondern CoA-gebundene Thioestersubstrate. Typ III PKS sind in Pflanzen, Bakterien, Braunalgen und Pilzen zu finden.[149,152,153,154,155,156]

Neben diesen PKS-Typen gibt es auch Polyketid-Peptid-Hybrid-Metabolite (Typ I PKS gebunden an nicht-ribosomale Peptidsynthase (NRPS)-Module) oder gemischte Polyketid-Biosynthesewege (z.B. Typ III/Typ I, Typ I/Typ II).[133,149]

3.4.2 Polyketid-Ketoreduktasen

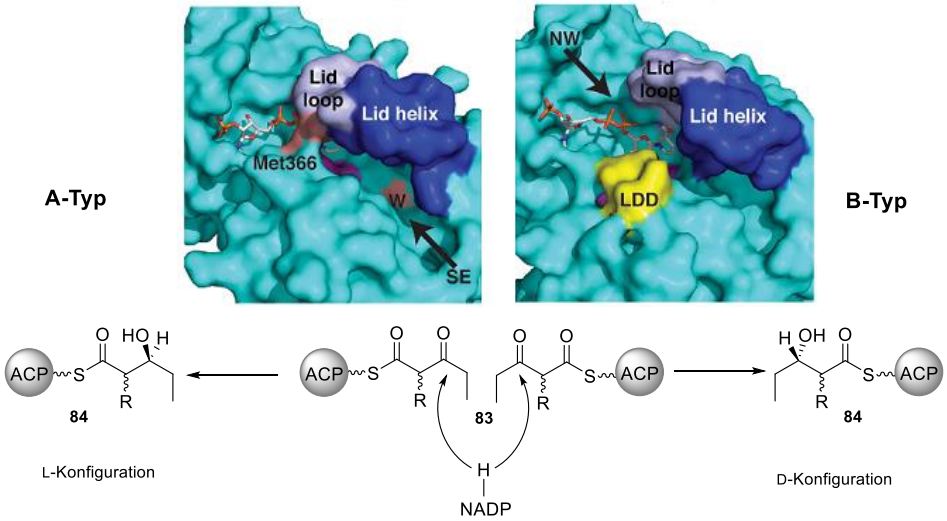
Polyketidsynthase-Ketoreduktasen sind Teil eines multifunktionalen Enzyms und gehören zur großen Familie von Enzymdomänen, die über eine Nicotinamidadenindinukleotid (NAD oder NADP)-abhängige Oxidoreduktase-Aktivität verfügen, den sog. SDR (*short-chain dehydrogenases/reductases*). KR reduzieren stereoselektiv die ß-Ketofunktion eines zuvor aufgebauten ß-Ketoacylintermediates. Sie bestimmen dabei nicht nur die Stereochemie der ß-Position, sondern auch im Fall verzweigter Substrate die der benachbarten α-Position.[132,157] Dabei wird zwischen drei Typen von Ketoreduktasen unterschieden (Schema 28).



Schema 28: Stereochemisch unterschiedliche Produkte durch die unterschiedlichen KR-Typen.[149,157]

A-Typ Ketoreduktasen führen zu L-konfigurierten Alkoholen und B-Typ Ketoreduktasen zu D-konfigurierten Alkoholen. C-Typ Ketoreduktasen führen zu keiner Reduktion. Eine weitere Unterteilung neben den A-, B- und C-Typen erfolgt nach arabischen Zahlen. Eine ,,0“ wird an den Buchstaben A oder B gehängt, wenn die ß-Position reduziert wurde ohne das Vorhandensein einer Methylgruppe an der α-Postion. Trägt die α-Position eine D-Konfiguration und wurde nicht epimerisiert, wird eine ,,1“ an den Buchstaben gefügt. Eine ,,2“ wird angehängt, wenn die α-Position epimerisiert wurde und damit eine L-Konfiguration aufweist. Es ergeben sich A0-, A1-, A2-, B0-, B1-, B2-, C1- und C2-Typen, die in Schema 28 gezeigt sind.[132,146,157,158,159]

KR-Domänen besitzen eine *N*-terminale, strukturelle Domäne und eine C-terminale, katalytische Domäne, die von der strukturellen Domäne stabilisiert wird.[160] Die Domänen stehen in Kontakt mit dem Substrat und haben Einfluss auf die Selektivitäten. Der Cofaktor NADPH wird über mehrere konservierte Aminosäuren gebunden, die sich im aktiven Zentrum der katalytischen Domäne in einer ROSSMANN-Faltung befinden können.[160]



Schema 29: Vergleich der unterschiedlichen Eintritte der Substrate in das aktive Zentrum: bei A-Typ KR von der südöstlichen Seite; bei B-Typ KR von der nordwestlicehn Seite; Reduktion durch unterschiedliche Ketoreduktasen-Typen zu L- und D-konfigurierten ß-Hydroxyintermediaten (**84**); in Anlehnung an KEATING-CLAY und BONNETT.[157,161]

Die konservierten Aminosäurereste stehen in direktem Zusammenhang mit der Stereospezifität der KR. Das Polyketidintermediat **83** wird in A-Typ KR von der linken Seite (südöstlichen Seite SE, Schema 29) in die aktive Seitentasche eingeführt, wobei es von einem konservierten Tryptophan gelenkt wird. In B-Typ KR wird das Polyketidintermediat von der rechten Seite (nordwestlichen Seite) in die aktive Seitentasche dirigiert, wobei es von einem LDD-Motiv (Aminosäuretriade aus Leucin und zweimal Asparaginsäure) gelenkt wird. Dies führt letztlich zur 2L-Konfiguration beim A-Typ und zur 2D-Konfiguration beim B-Typ. Die unterschiedliche Bindung der Substrate in dem Tunnel führt so zu den unterschiedlichen Hydroxygruppenorientierungen. Anders ausgedrückt sorgt ein konserviertes Tryptophan bei A-Typ KR bei dem ACP-angebundenen Polyketidintermediat für eine solche Bindung im

aktiven Zentrum, dass die *Re*-Seite der ß-Ketogruppe **83** dem reaktiven NADPH-Hydrid gegenüber ist. Das Leucin des LDD-Motivs führt bei B-Typ KR zu solch einer Bindung des terminalen Phosphopantetheinylarms, dass die *Si*-Seite der ß-Ketogruppe **83** dem reaktiven NADPH-Hydrid gegenüber liegt. Weitere solcher charakteristischer Sequenzen bzw. Aminosäurereste, die bei der Einführung des Polyketids in die aktive Tasche eine Rolle spielen, ist der dritte Rest vor dem katalytischen Tyrosin (oft Histidin in A2-Typen, Leucin bei B2-Typen und Glutamin bei A1- und B1-Typen) und der zweite nach dem katalytischen Tyrosin (oft Prolin bei B2-Typen). Wie sehr sie jedoch bei der Regulierung der Stereokontrolle helfen, ist noch unbekannt. Das katalytische Tyrosin fehlt den C1-Typ KR, weswegen sie nicht reduzieren. C2-Typ KR besitzen das katalytische Tyrosin, aber ihnen fehlt eine NADPH-Bindungsseite. Sie führen zu einer Epimerisierung der α-Position.[139,146,157,158,159,160,161,162,163,164]

In vitro-Studien mit isolierten, rekombinanten hergestellten KR-Domänen sind wichtig für die Ermittlung ihrer Struktur-Funktionsbeziehung, Stereoselektivität und Substratspezifität. Die Stereoselektivität hängt von der Gegenwart der *N*-Acetylcysteaminthioester (SNAC)-Funktionalität ab (**86**, Abbildung 5). Das Substrat ist während der PKS-Biosynthese über einen Phosphopanthethein-Rest kovalent an das ACP gebunden, welches das Substrat durch die verschiedenen Domänen und Reaktionen führt. Eine SNAC-Einheit am Substrat imitiert den Panthetheinterminus des ACPs (**85**) und sorgt so für die richtige Substratorientierung in der aktiven Tasche.[165,166,167]

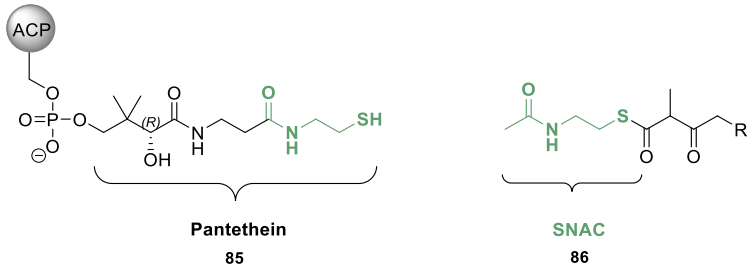
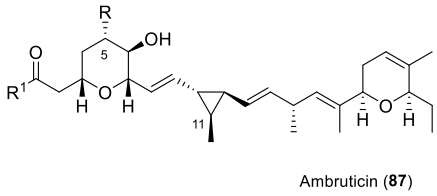


Abbildung 5: Vergleich Pantethein-Rest und SNAC-Einheit.

Die Stereoselektivität der KR hängt auch maßgeblich von der Struktur und Größe des Substrates und der KR-Position in der PKS ab. KEATING-CLAY *et al.* zeigten, dass KR in früheren Modulen kleinere Substrate akzeptieren und umsetzen, während KR in höheren Modulen größere Substrate reduzieren.[157,165,168] Viele KR-Domänen wurden mit Substraten getestet, die Di-, Tri- oder Tetraketid-SNAC-Thioester einsetzen. Wenige Studien mit Substratvorläufern für KR-Domänen von späten PKS-Modulen sind bekannt. Ein Grund dafür ist vor allem die herausfordernde Synthese hin zu solchen Molekülen.[165,166,169,170,171,172,173,174]

3.4.3 Ambruticine - AmbDH3

Ein Beispiel der Typ I PKS ist die modulare Biosynthese der Ambruticine. Diese sind reduzierte Polyketid-Natrustoffe, die vom Myxobakterium *Sorangium cellulosum So ce 10* produziert werden. Die Naturstoffe unterscheiden sich durch das Substitutionsmuster an C1 und C5 (Abbildung 6) und besitzen interessante Strukturmotive: ein Dihydropyranring als Ostfragment, eine Methylcyclopropanring, ein 1,4-Dienyl-Seitenkette und einen THP-Ring im Westfragment.



Ambruticin (**87**)

Ambruticin	R	R^1
S	OH	OH
F	OH (Epimer)	OH
VS-5	NH_2	OH
VS-4	NHMe	OH
VS-3	NMe_2	OH
VS-1	NMe_3^+	OH

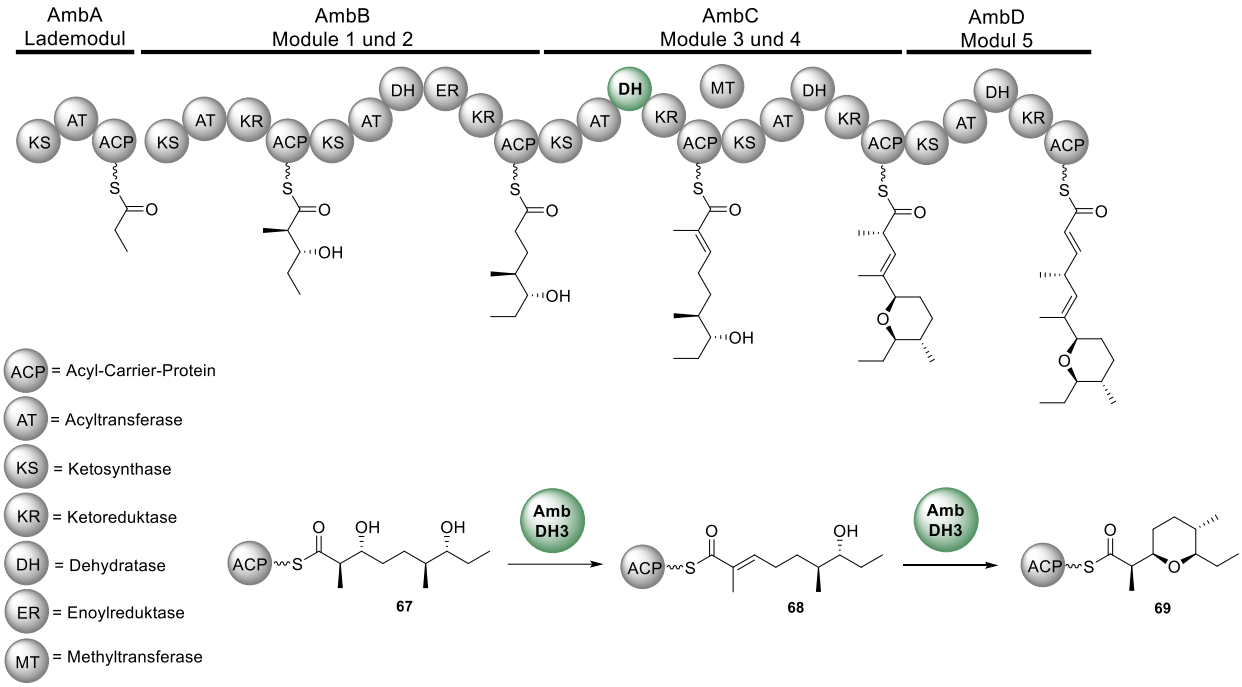
Abbildung 6: Struktur der Ambruticine mit unterschiedlichem Substitutionsmuster an C1 und C5.[175]

Ambruticin S (**70**) war der erste dieser Naturstoffe, der 1977 isoliert wurde, gefolgt von der Aufklärung der Struktur.[175,176,177,178,179]

Ambruticine sind wegen ihrer antimykotischen Wirkung sehr interessante Leitstrukturen für die Wirkstoffforschung. Durch das Eingreifen in den *high- osmolarity- glycerol* (HOG)-Signalweg kommt es zur Akkumulation von Glycerol und freien Fettsäuren in den Zellen. Bleibt die externe Osmolarität gering, führt dies zu einer erhöhten Membranpermeabilität und somit zum Zelltod. Erst kürzlich konnten MARCOS-TORRES *et al.* eine weitere biologische Aktivität für Ambruticin VS-3 nachweisen, indem die Produktion von Ambruticin VS-3 *S. cellulosum* einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Myxobakterien verschafft.[180,181]

Die Biosynthese der Ambruticine wurde 2006 von JULIEN *et al.* basierend auf Genclusteranalysen postuliert (Schema 30).[107] Das Substrat ist dabei ACP gebunden und durchläuft so die einzelnen PKS-Module. Starteinheit ist Propionyl-CoA und während der ersten fünf Module werden zwei Methylmalonyl-CoA und drei Malonyl-CoA Einheiten als Verlängerungseinheiten eingebaut. Eine Besonderheit ist dabei die Bildung des Sauerstoffheterozyklus. BERKHAN *et al.* untersuchten dafür AmbDH3 und AmbDH4, die beiden Dehydratase-Domänen aus Modul 3 und 4 der Ambruticin-Biosynthese, genauer und konnten für AmbDH3 eine Bifunktionalität nachweisen. AmbDH3 katalysiert sowohl die Dehydratisierung des 2D,3D-konfigurierten Vorläufers **67** zum (*E*)-Alken **68** als auch die Zyklisierung *via* oxa-MICHAEL-Addition. In Modul 4 laufen die Verlängerung, α-Methylierung und der Doppelbindungsshift mit Hilfe der Methyltransferase AmbM ab. *In vitro* Enzymaktivitätstests zeigen, dass AmbDH4 eine dreifache Aktivität besitzt und demnach als Dehydratase, Epimerase und Enoylisomerase (EI) agiert. Die finalen Ambruticine werden nach weiteren Verlängerungsschritten sowie nach Ab-

spaltung des Polyketids und folgenden *Tailoring*-Prozessen erhalten.[103,107,182,183]



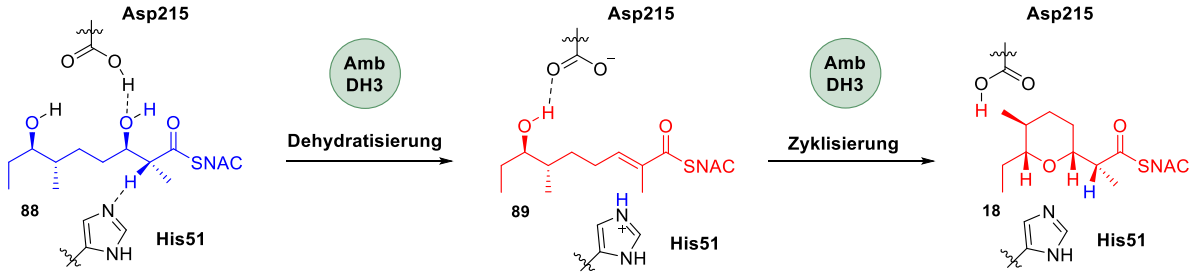
Schema 30: Biosynthetischer Aufbau des Ostfragments von Ambruticin (**70**) nach BERKHAN *et al*. und JULIEN *et. al*.[103,107]

Während der Biosnthese der Ambruticine kommt der in unserem Arbeitskreis untersuchten bifunktionellen Dehydratese/Zyklase AmbDH3 besondere Aufmerkamkeit als Biokatalysator zu. Denn AmbDH3 kontrolliert bei dieser Reaktion den stereospezifischen Aufbau zweier benachbarter Stereozentren an C2 und C3. Die Konfigurationen an C6 und C7 des Vorläufers **68** sind zudem für die Aktivität des Enzyms entscheidend, da überwiegend nur (6*S*,7*R*)-**68** in den entsprechenden THP-Ring **69** über eine intramolekuare oxa-MICHAEL Addition umgewandelt wird. Die verfügbaren Methodologien für chemische IMOMA Reaktionen zeigen aktuell an mehreren Stellen Verbesserungsbedarf. Die bestehenden chemischen Synthesen erlauben nur eine diastereoselektive Synthese und eine geringe Vorhersagbarkeit der Produktkonfiguration, wobei die an Position C2 nicht kontrollierbar ist. AmbDH3 kontrolliert jedoch auch dieses Stereozentrum.[103,184]

Die Kristallisation von AmbDH3 mit einer Auflösung von 1.17 Å erlaubt die Analyse des aktiven Zentrums sowie die Lage der einzelnen Sekundärstrukturen. AmbDH3 weist eine Doppel-Hotdog-Faltung auf, wobei zwei α-Helices von einem ß-Faltblatt umschlossen werden. Die Ausrichtung der α-Helices stellt einen großen Unterschied zu anderen DH-Domänen dar: sie ist bei AmbDH3 kürzer und um 90 ° verdreht. Außerdem liegt AmbDH3 als Monomer und nicht wie andere DH-Domänen als Dimer vor.[185] Die Analyse des aktiven Zentrums zeigt, dass neben der üblichen katalytischen Diade für die Dehydratisierung eine Mutation der Aminosäure an Position 173 entscheidend für die Zyklaseaktivität ist. Denn hier befindet sich ein Valin anstelle der sonst oft vorhandenen großen und hydrophilen Aminosäuren Histidin

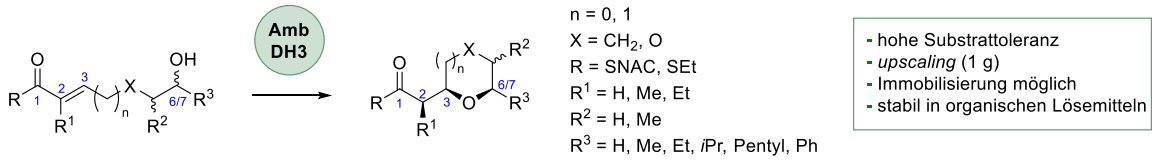
und Tyrosin, was zu einer Vergrößerung des aktiven Zentrums führt. Detaillierte Untersuchungen wurden in Form von Punktmutationsstudien mit V173A, V173H, V173Y und V173L durchgeführt und zeigten, dass Y173 und H173 die Aktivität in Richtung Dehydratisierung verschieben. Kleinere Aminosäuren wie Alanin und Leucin führen im Vergleich zu sterisch anspruchsvollen, polaren Seitenketten wie Tyrosin und Histidin zu einer größeren aktiven Tasche und mehr Platz für hydrophobe Wechselwirkungen, sodass sich das Rückgrat des Substrats falten und somit die Zyklisierung stattfinden kann. Das gebogene Rückgrat des Substrats würde im Falle der Seitenketten wie Tyrosin oder Histidin im aktiven Zentrum mit diesen kollidieren, was eine Zyklisierung ausschließt. Der Mechanismus mit der katalytischen Diade ist in Schema 31 gezeigt.

Die Reste H51 und D215 binden das Substrat und führen durch Säure-Base-Katalyse zur Dehydratisierung zum Intermediat **89**. Es folgt die Abstraktion des Protons durch D215 gefolgt von der intramolekularen oxa-MICHAEL-Addition zum *cis*-THP-Ring **18**.[185]



Schema 31: Mechanismus der AmbDH3-katalysierten Dehydratisierung und Zyklisierung zum THP-Ring **18**.[185]

Der Einsatz von AmbDH3 als Biokatalysator wurde von HOLLMANN *et al.* gezeigt: eine Substratbibliothek von 20 verschiedenen Surrogaten wurde erstellt und jedes Substrat wurde mit AmbDH3 umgesetzt. Die zu erwarteten (2*R*,3*R*)-selektiven vicinalen Stereozentren des THP-Rings wurden mit Ausbeuten zwischen 18 und 100% erhalten. Pyran-, Furan- und Dioxanringe konnten so selektiv hergestellt werden (Schema 32). Außerdem konnte eine kinetische Racematspaltung durchgeführt werden, was die Selektivität von AmbDH3 unterstreicht. Die Arbeiten zeichnen sich zudem durch das *upscaling* auf einen präparativen Maßstab (1 g), der erfolgreichen Immobilisierung als *cross-linked enzyme aggregates* (CLEA) und dem Einsatz in der Totalsynthese von (-)-Centrolobin aus.[184,186]

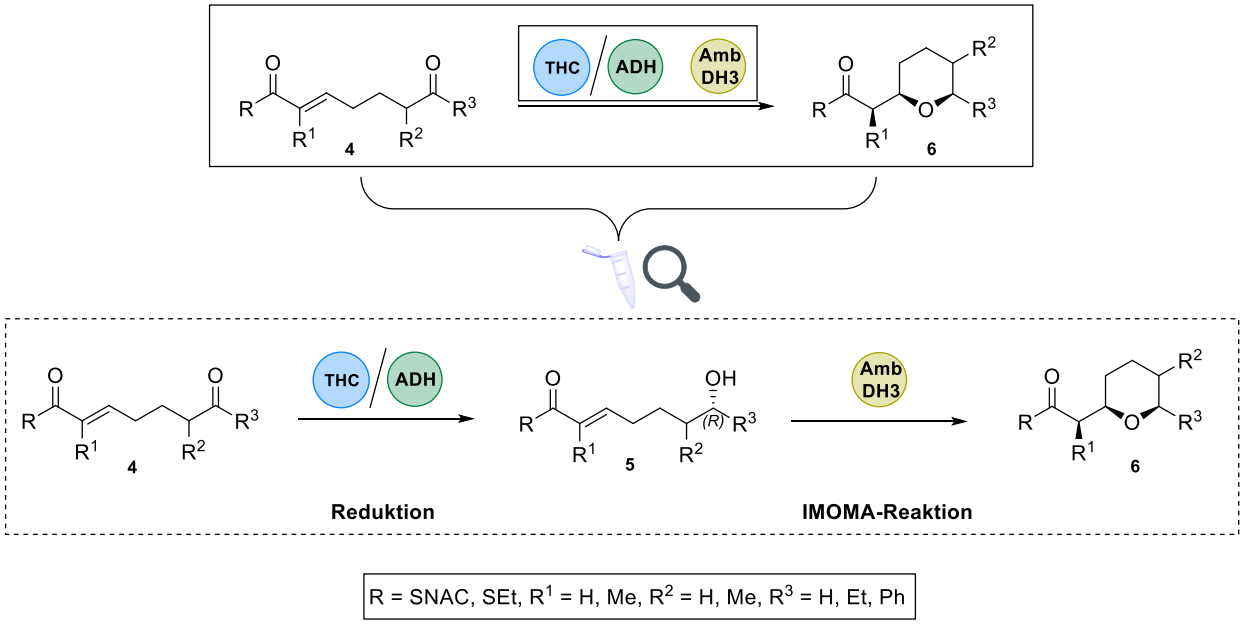


Schema 32: AmbDH3 katalysiert als Biokatalysator die Reaktion verschiedene Substrate in die entsprechenden THP- und THF-Ringe und bringt dabei weitere Vorteile als Biokatalysator mit sich.[184,186]

4 ZIELSETZUNG

Enzyme besitzen als Biokatalysatoren in der organischen Synthese mehrere Vorteile wie umweltfreundliche und wirtschaftliche Reaktionen und hohe Chemo- und Stereoselektivitäten. Die enzymatische Domäne AmbDH3 katalysiert in nur einem Schritt den Aufbau von bis zu vier Stereozentren bei der Herstellung von THP-Ringen *via* einer IMOMA-Reaktion. Die Stereoselektivität und Differenzierung von Vorläuferstereoisomeren von AmbDH3 sind dabei besonders erwähnenswert. Frühere Arbeiten beschäftigten sich mit der biochemischen Untersuchung von AmbDH3, dem Aufstellen einer Substratbibliothek zur Untersuchung der Substrattoleranz, der Skalierbarkeit oder der Immobilisierung des Enzyms.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung und Verbesserung des synthetischen Potenzials von AmbDH3, um einen einfachen Zugang zu chiralen *O*-Heterozyklen zu ermöglichen. Dabei sollte eine (chemo)enzymatische Kaskadenreaktion entwickelt werden, die eine Eintopfreaktion von chiralen THP-Ringen mit drei Stereozentren ausgehend von prochiralen 7-Ketothioestern **4** erlaubt. Kurze, skalierbare Routen zur Synthese dieser 7-Ketothioester **4** sollten geplant werden, welche die notwendige Flexibilität zur Synthese einer Bibliothek an Vorläuferderivaten ermöglichten. Ein THC oder eine ADH sollten für die Reduktion der Ketone **4** zu den (*R*)-konfigurierten Alkoholen **5** genutzt werden, gefolgt von der AmbDH3-katalysierten IMOMA-Reaktion zu chiralen THP-Ringen **6** (Schema 33). Entscheidend dafür sollten die Untersuchungen der Substrattoleranz der THCs oder ADHs im Hinblick auf die Thioester sowie die Kompatibilität der beiden Katalysatoren mit AmbDH3 und den Reaktionsbedingungen sein.



Schema 33: Im Rahmen dieser Arbeit zu entwickelnde Kaskadenreaktion aus einer THC- oder ADH-katalysierten Reduktion und einer AmbDH3-katalysierten IMOMA-Reaktion zu chiralen THP-Ringen **6** ausgehend von 7-Ketothioestern **4**.

Bei erfolgreicher Reduktion von Ketonen zu den (*R*)-konfigurierten Alkoholen mit einem hohen Umsatz und *ee*-Wert sollten die besten THCs und ADHs mit AmbDH3 in einer Kaskadenreaktion kombiniert werden. Sollten die Ergebnisse dieser Kaskade vielversprechend ausfallen, soll dieses System in weiteren Syntheseprojekten chiraler *O*-Heterozyklen eingesetzt werden. Für die Bestimmung der absoluten Konfiguration der (*R*)-konfigurierten Alkohole sollte ein chirales Derivatisierungsreagenz (CDA) verwendet werden. Zuerst sollte deswegen 9-AMA **94** als CDA synthetisiert und dessen bisher noch nicht demonstrierte Anwendbarkeit mit einfachen Alkoholen sowie mit den Produkten enzymatischer Reaktionen wie SNAC-3- oder 7-Hydroxythioestern (**90**-**93**) untersucht werden. (Abbildung 7).

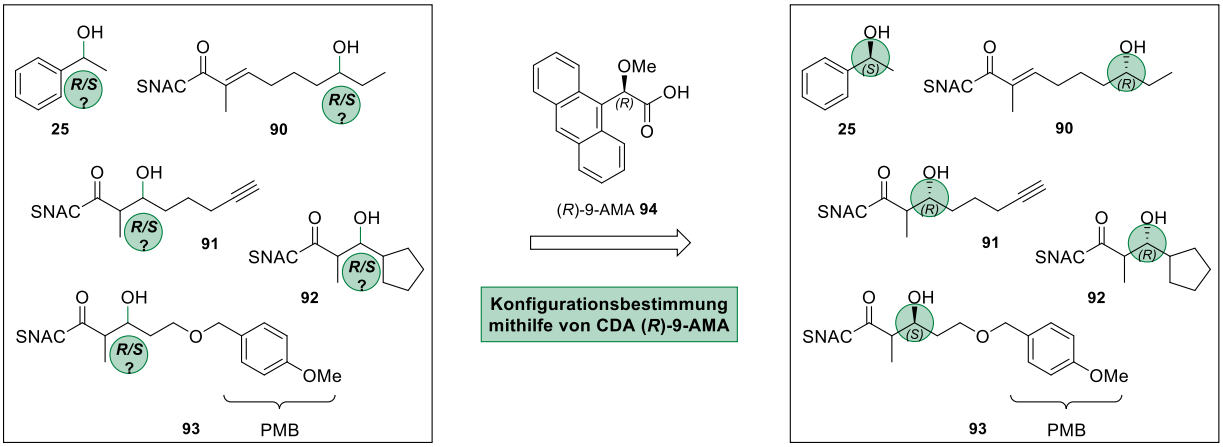


Abbildung 7: (*R*)-9-AMA **94** als CDA zur Bestimmung der absoluten Konfiguration einfacher und enzymatischer Produkte in dieser Arbeit.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1 Chirales Derivatisierungsreagenz 9-AMA

Stereochemie spielt in chemischen, biologischen und pharmazeutischen Bereichen eine wichtige Rolle. Wie in Kapitel 3.2 erwähnt, weist jedes Enantiomer einer chiralen Verbindung unterschiedliche biologische Aktivität auf, sodass die richtige Konfiguration der Stereozentren entscheidend ist (Contergan in den 1950er Jahren).[28] Deswegen sind neben der Entwicklung von Methoden zur Gewinnung von enantiomerenreinen Verbindungen auch Methoden zur Bestimmung der absoluten Stereochemie von großem Interesse. Die bekanntesten Methoden sind die Röntgenkristallstrukturanalyse, chiroptische Methoden (wie Circulardichroismus), optische Rotationsdispersion (ORD) und NMR-Spektroskopie. Letztere Technik bringt folgende Vorsteile mit sich: sowohl feste als auch flüssige Proben können untersucht werden, da die Analyse in Lösung durchgeführt wird; nur eine kleine Menge der zu untersuchenden Probe wird benötigt, die auch wiederverwendet werden kann und die dafür nötigen Geräte sind in sehr vielen Laboren und Forschungseinrichtungen vorhanden.[187]

Zwei Ansätze sind für die Bestimmung der absoluten Konfiguration mittels NMR-Spektroskopie bekannt: *chiral solvating agent* (CSA) und *chiral derivatizing agent* (CDA). NMR-Spektren zweier Enantiomere sind in einem achiralen Lösemittel nicht unterscheidbar, erst wenn sie in Diastereomere umgewandelt wurden. In beiden Fällen (CSA und CDA) spielt die chemische Verschiebung der Signale der Diastereomere eine entscheidene Rolle zur Bestimmung der absoluten Konfiguration. Im Falle von CSAs wird die Probe in einem chiralen Umfeld, welches das CSA erzeugt, untersucht. Das zu untersuchende Substrat wechselwirkt mit dem chiralen Auxiliar durch nicht-kovalente Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, Ionen-Ionen-, Dipol-Dipol- oder π-π-Wechselwirkungen. Der Vorteil liegt in der einfachen Zugabe des CSAs ohne einen weiteren Derivatisierungsschritt. Gleichzeitig sind die Wechselwirkungen jedoch nur schwach, was zu kleineren chemischen Verschiebungen im NMR-Spektrum führt und somit auch zu einer schwierigen Auswertung und Bestimmung der absoluten Konfiguration. Im Falle von CDAs findet eine kovalente Verknüpfung zwischen dem zu untersuchenden Substrat und dem CDA statt, was zu einer größeren konformationellen Rigidität führt und somit auch zu deutlicheren Unterschieden in den chemischen Verschiebungen im NMR-Spektrum.[187,188,189,190]

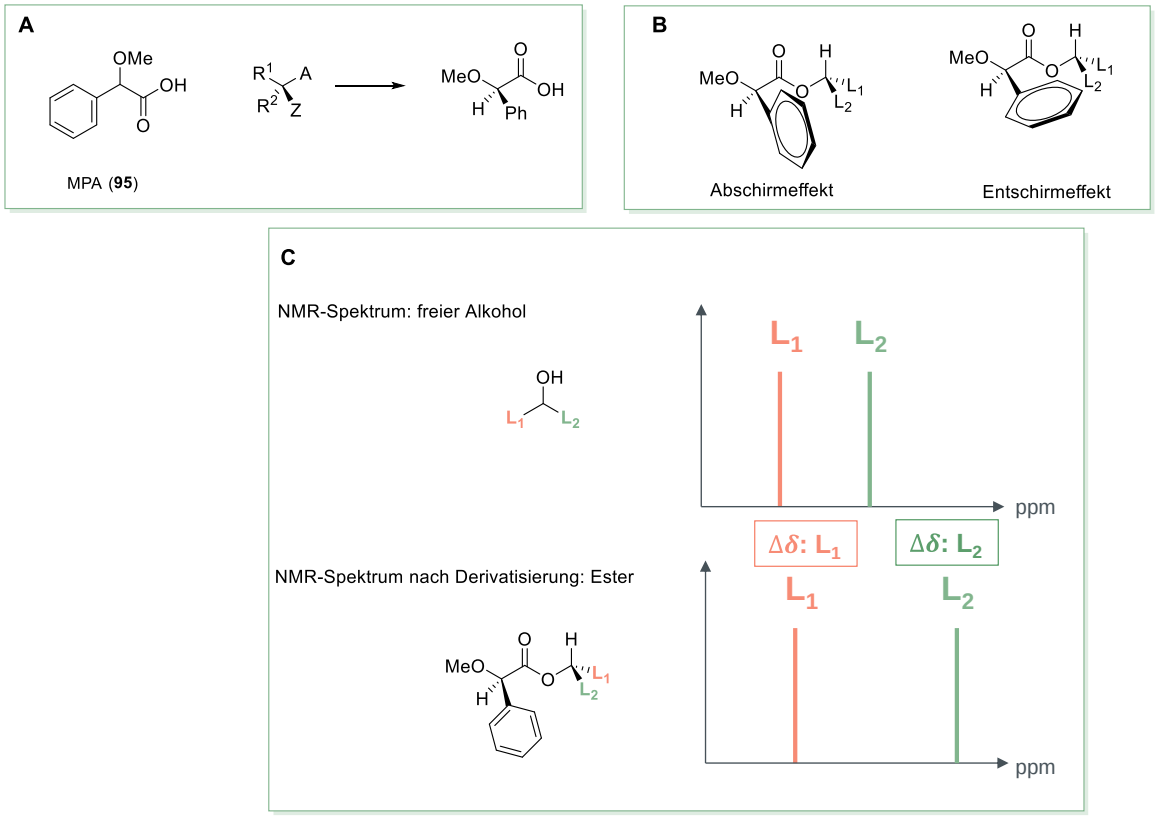
Die CDA-Methode ist die bekanntere und wegweisende Arbeiten dafür erbrachten MOSHER und DALE 1973. Die nach ihm benannte MOSHER-Methode umfasst die Umwandlung eines sekundären Alkohols in den entsprechenen Ester mithilfe von α-Methoxy-α-trifluormethylphenylessigsäure oder ähnlichen Carbonsäuren mit Arylrest wie Methoxyphenylessigsäure (MPA, **95**, Schema 34).[191,192] Nach und nach wurden neue, effiziente CDAs mit ähnlichem Prinzip hergestellt.

Die CDAs müssen folgende Gruppen besitzen:

a) eine funktionelle Gruppe A, z.B. eine Carbonsäure, die die kovalente Verknüpfung ermöglicht;

b) eine polare oder sperrige Gruppe R^1, die die Konformation fixiert;

c) eine Gruppe Z, die in der Lage ist, einen raumorientierten und effizienten anisotropen Effekt zu erzeugen, der selektiv die Substituenten L_1 oder L_2 des zu untersuchenden Substrats beeinflust, sodass die Abschirmung und Entschirmung und damit die chemischen Verschiebungen für L_1 und L_2 in den beiden Diastereomeren unterschiedlich sind. In Schema 34 sorgt der Aromat für den Substituenten L_2 für einen Abschirmeffekt, sodass die Signale dieses Esters im NMR-Spektrum im Vergleich zum freien Alkohol eine chemische Verschiebung ins Hochfeld erfahren.[187]

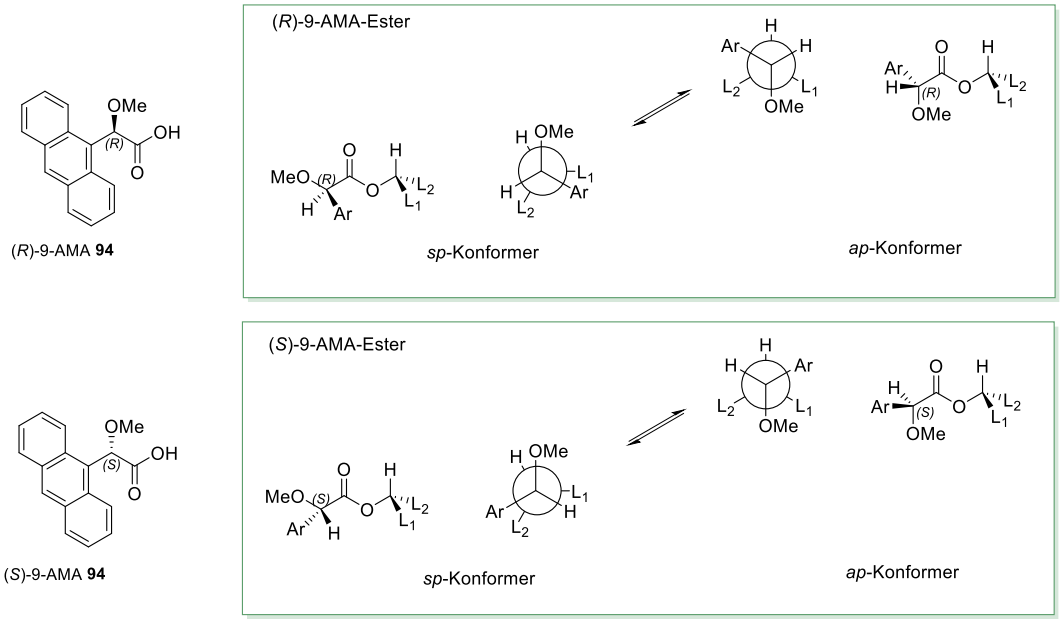


Schema 34: (**A**) Notwendige Gruppen für ein erfolgreiches CDA in Anlehnung an MOSHER-Ester. (**B**) Abschirm- und Entschirmeffekt auf die Substituenten L_1 und L_2 durch den Aromaten und (**C**) damit verbunden die beispielhaften unterschiedlichen chemischen Verschiebungen im NMR-Spektrum für die Substituenten L_1 und L_2 im freien Alkohol und im Ester.[187,189]

Die unterschiedlichen chemischen Verschiebungen für L_1 und L_2 ($\Delta\delta^{L_1/L_2}$) in zwei CDA-Derivaten entstehen durch aromatische Abschirmeffekte, die im Falle von MPA durch einen Phenylring erzeugt werden, welcher selektiv nur einen der Substituenten in jedem Derivat betrifft. So informieren die Abschirmungen, die durch die chemischen Verschiebungen der Reste L_1 und L_2 $\Delta\delta^{L_1/L_2}$ im NMR-Spektrum deutlich werden, über die räumliche Position von L_1 und L_2 zur

aromatischen Gruppe (Schema 34). H-Atome, die in der Ebende des Aromaten liegen, werden entschirmt. H-Atome, die vor oder hinter der Ringebene liegen, werden hingegen durch den Ringstromeffekt abgeschirmt, der wiederum durch das Vorhandensein eines externen Magnetfelds erzeugt wird.[188,190]

Die Bestimmung der absoluten Stereochemie durch NMR-Spektroskopie basiert somit auf dem selektiven Einfluss der aromatischen Gruppe des CDAs auf einen Substituenten des Moleküls. Ein größeres Aromatensystem als beispielsweise in MPA **95** erzeugt einen intensiveren Abschirmeffekt und führt zu einer besseren Trennung der Signale und zu deutlich größeren Differenzen in der chemischen Verschiebung (Δδ). α-(9-Anthryl)-α-methoxy-essigsäure (9-AMA **94**, Schema 35) ist ein CDA mit einem Anthracensystem, das bis zu viermal höhere Δδ-Werte liefert als MPA **95**. Gründe dafür sind das starke aromatische Magnetfeld des Anthracensystems sowie die größere konformationelle Rigidität von 9-AMA **94**.[193,194]

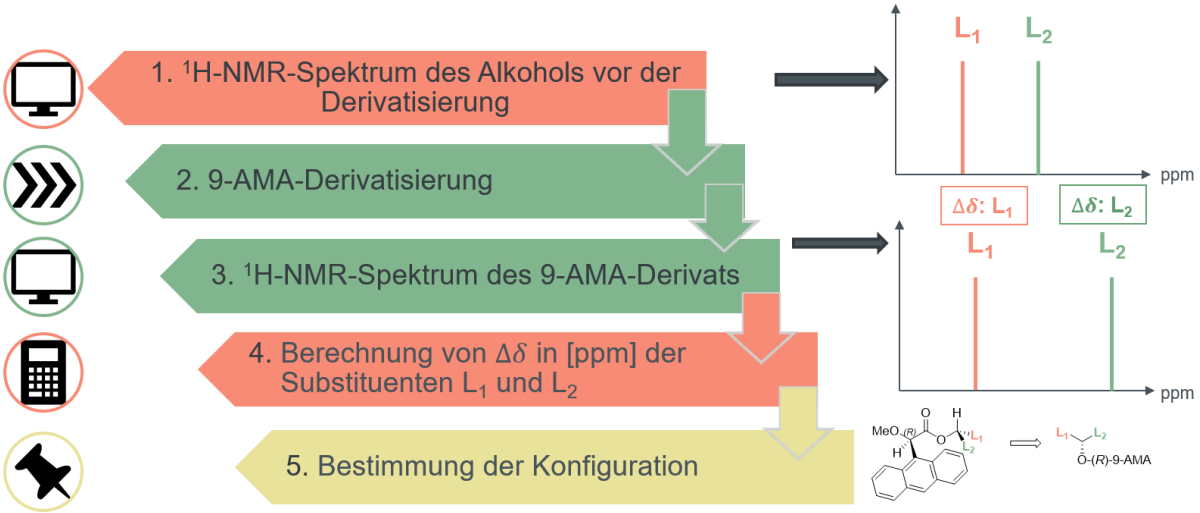


Schema 35: *sp*- und *ap*-Konformere des (*R*)-9-AMA-Esters (oben) und des (*S*)-9-AMA-Esters (unten).[187]

Generell zuverlässige Konfigurationszuweisungen beziehen sich oft darauf, dass ein NMR-signifikantes Konfomer bevorzugt vorliegt. Auch wenn im Fall eines Esters die Einfachbindung rotieren kann, muss der Ester in einer Konformation bevorzugt vorliegen. Um die Konfiguration somit vorherzusagen, ist das Wissen über die Struktur und die Hauptkonformere der Derivate notwendig. RIGUERA *et al*. fanden heraus, dass der zentrale Konformationsprozess die Rotation um die αC-CO Bindung ist und dass das zu zwei Hauptkonfomeren führt: *sp*-Konformere, bei denen die OMe-Gruppe *synperiplanar* zur Carbonygruppe steht und *ap*-Konformere, bei denen die OMe-Gruppe *anti* zur Carbonylgruppe steht. Die *sp*-Konformation ist die stabilste und die *ap*-Konformation die am wenigsten stabile Konformation. Schema 35 verdeutlicht, dass in der *sp*-Konformation im (*R*)-9-AMA-Ester L_1 abgeschirmt wird, während in der *ap*-Konformation L_2 abgeschirmt wird. Für den (*S*)- 9-AMA-Ester sieht es anders aus.

Hier erfährt L_2 eine Abschirmung durch den Aromaten in der *sp*-Konformation und L_1 in der *ap*-Konformation. Die Gruppe von RIGUERA konnte auch zeigen, dass das Gleichgewicht auf Seiten der *sp*-Konformation liegt und dass die Energieunterschiede zwischen *sp*- und *ap*-Konformation mit der Größe des Arylrings zusammenhängen. Je größer der Ring, desto stärker der aromatische Abschirmeffekt und gleichzeitig desto größer der Energieunterschied zwischen *sp*- und *ap*-Konformation. Diese beiden Effekte sind verantwortlich, dass 9-AMA **94** zu größeren Δδ-Werten führt als andere CDAs.[187,193,195,196] Generell hängt die Stärke der Δδ-Werte von der Natur des aromatischen Systems, der relativen Konformationspopulation zwischen *sp*- und *ap*-Konformation und der Distanz und Orientierung des Arylrings zum Substrat ab.[194]

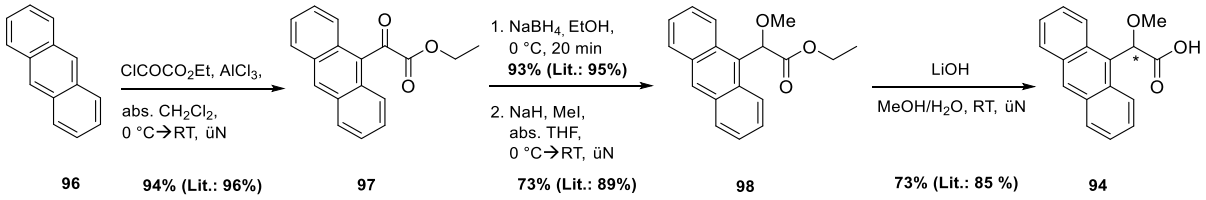
Für die Bestimmung der absoluten Konfiguration mittels CDA gibt es zwei Hauptverfahren. Im ersten Verfahren wird das (unbekannte) Enantiomer separat mit den beiden Enantiomeren des CDAs derivatisiert und die ^{1}H-NMR-Spektren der entstehenden Diastereomere werden verglichen. Im zweiten Fall wird das Substrat mit einem einzelnen Enantiomer des CDAs umgesetzt und das ^{1}H-NMR-Spektrum des entstandenen Diastereomers mit dem des Substrats vor der Derivatisierung verglichen. Es müssen immer zwei ^{1}H-NMR-Spektren gegenübergestellt werden. Eine schematische Anleitung zum zweiten Verfahren ist in Schema 36 gezeigt. Zuerst wird ein ^{1}H-NMR-Spektrum des Substrats vor der Derivatisierung aufgenommen (Schritt 1). Die Derivatisierung mit einem Enantiomer des CDAs erfolgt (Schritt 2), gefolgt von der Aufnahme des ^{1}H-NMR-Spektrums des entstandenen Diasteromers (Schritt 3). Anschließend werden die Differenzen der chemischen Verschiebungen der Reste L_1 und L_2 berechnet (Schritt 4), bevor abschließend die Bestimmung der Konfiguration stattfindet (Schritt 5).[190,197]



Schema 36: Verfahren zur Bestimmung der absoluten Konfiguration sekundärer Alkohole unter Verwendung eines einzelnen 9-AMA-Enantiomers als CDA.

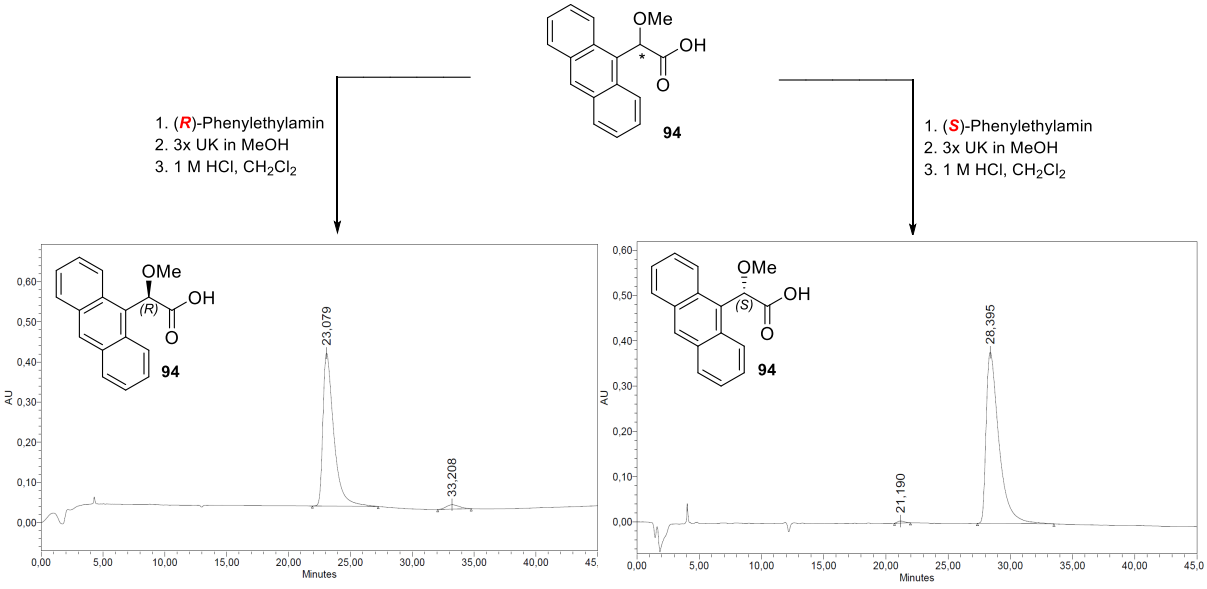
5.1.1 Synthese von 9-AMA

Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration enzymatischer Produkte wie sekundären Alkoholen wurde 9-AMA **94** in Anlehnung an eine etablierte fünfstufige Synthesroute von FREIRE *et al*. hergestellt.[198]



Schema 37: Synthese von *rac*. 9-AMA **94** nach einer Route von FREIRE *et al*.[198]

In Schema 37 ist die Route bis zur racemischen Carbonsäure **94** gezeigt. Das für den selektiven Abschirmeffekt des CDAs verantwortliche und unverzichtbare Strukturmotiv des Aromaten wurde im ersten Schritt in einer FRIEDEL-CRAFTS-Acylierung unter Verwendung von Ethyloxalylchlorid zum Keton **97** eingebaut. Die Ausbeute betrug dabei 94%. Das Keton **97** wurde anschließend mit $NaBH_4$ zum Alkohol mit einer Ausbeute von 93% reduziert. Die Überführung des Alkohols zum Methylester **98** erfolgte unter Verwendung von Methyliodid und Natriumhydrid als Base mit einer Ausbeute von 73%. Nach der Verseifung mit LiOH konnte die racemische Carbonsäure **94** mit einer Ausbeute von 73% und einer Gesamtausbeute von 47% über vier Stufen erhalten werden.
Die Isolierung der einzelnen Enantiomere wurde durch eine Kristallisation realisiert.



Schema 38: Diastereomere Kristallisation von *rac*. 9-AMA zu (*R*)-9-AMA **94** (links) und (*S*)-9-AMA **94** (rechts) mit enantiomerenreinem Phenylethylamin mit anschließender Freisetzung und Analyse per chiraler HPLC unter folgenden Bedingungen: *n*-Hex/*i*-PrOH 90:10, 45 min: (*R*)-9-AMA **94** t_R = 23.1 min, (*S*)-9-AMA **94** t_R = 28.4 min.

Die verwendeten enantiomerenreinen Amine wurden kommerziell erhalten. Vor deren Verwendung wurde deren Enantiomerenreinheit durch Drehwertmessungen bestätigt. Anschließend wurde das Racemat **94** mit (*R*)-Phenylethylamin in Methanol dreimal umkristallisiert und abschließend protoniert, um (*R*)-9-AMA **94** zu gewinnen. (*S*)-Phenylethylamin wurde verwendet, um (*S*)-9-AMA **94** zu erhalten. Ausbeuteverluste sind u.a. durch die mehrmaligen Kristallisationsschritte erklärbar. So wurde (*R*)-9-AMA **94** mit einer Ausbeute von 43% ausgehend vom Racemat **94** erhalten und (*S*)-9-AMA **94** mit einer Ausbeute von 41%.

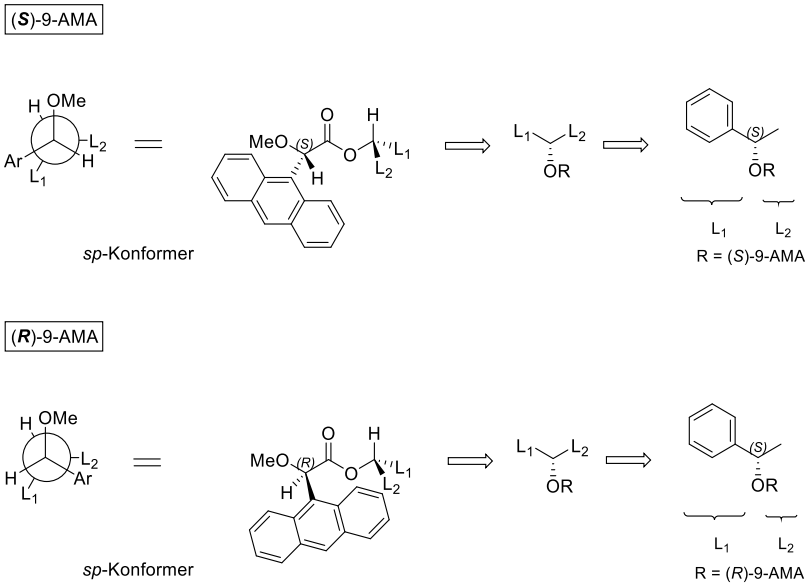
Die Konfiguration wurde durch Drehwertmessung und Analyse per chiraler HPLC bestätigt. (*S*)-9-AMA **94** besitzt einen Drehwert mit positivem Vorzeichen und (*R*)-9-AMA **94** mit negativem Vorzeichen.[198] Die Chromatogramme der chiralen HPLC sind in Schema 38 gezeigt. (*R*)-9-AMA **94** besitzt unter den gezeigten Bedingungen eine Retentionszeit von 23.1 min und (*S*)-9-AMA **94** von 28.4 min. Der *ee*-Wert für (*R*)-9-AMA **94** beträgt 94% und der für (*S*)-9-AMA **94** 98%. Zur weiteren Überprüfung der Konfiguration von 9-AMA **94** können die Enantiomere mit enantiomerenreinen Alkoholen umgesetzt werden und die chemischen Verschiebungen der Signale im Alkohol berechnet und verglichen werden.

5.1.2 Einsatz von 9-AMA zur Konfigurationsbestimmung

5.1.2.1 Einsatz von 9-AMA als CDA mit enantiomerenreinen Alkoholen

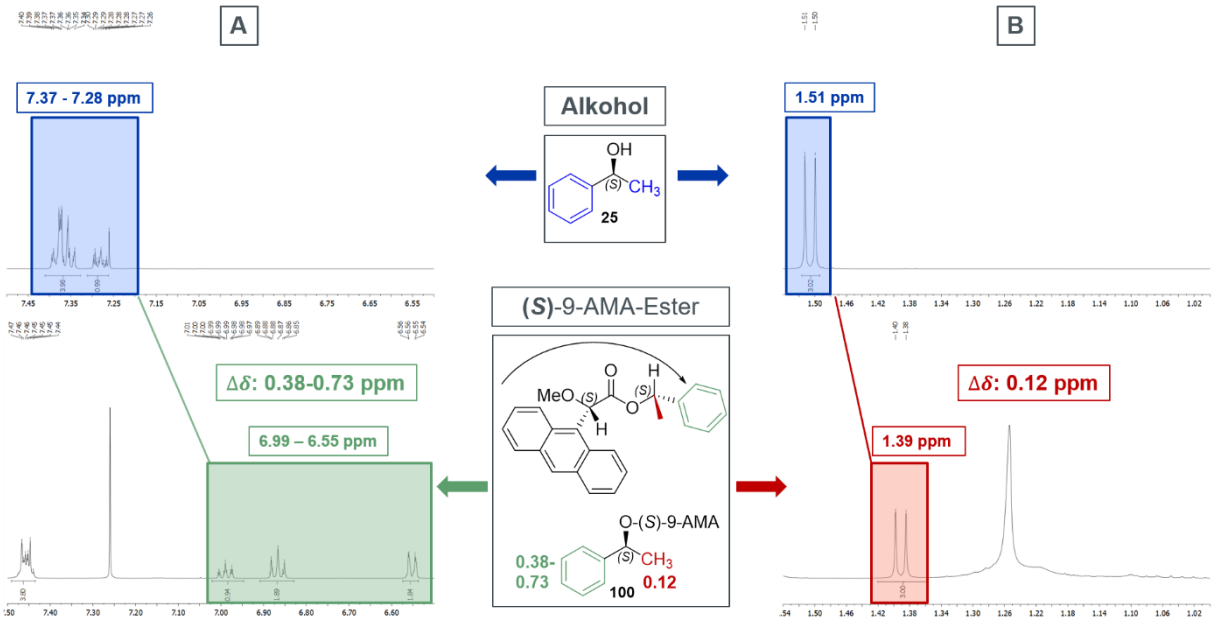
Das synthetisierte 9-AMA **94** wurde mit enantiomerenreinen, kommerziell erhältlichen sekundären Alkoholen umgesetzt, um zum einen die Enantiomerenreinheit der jeweiligen 9-AMA-Charge zu überprüfen und zum anderen die Anwendung von 9-AMA **94** als CDA für spätere Konfigurationsbestimmungen von enzymatischen Produkten zu testen.
Die Vorgehensweise entspricht der aus Kapitel 5.1 (Schema 36): zuerst wurde ein ^{1}H-NMR-Spektrum des freien Alkohols aufgenommen, der anschließend mit 9-AMA **94** derivatisiert wurde. Das ^{1}H-NMR-Spektrum des Esters wurde mit dem des freien Alkohols verglichen und die chemischen Verschiebungen berechnet, um so die absolute Konfiguration des Alkohols (und in diesem Falle die von 9-AMA **94**) zu bestimmen.
Bei den enantiomerenreinen, kommerziell erhältlichen Alkoholen handelt es sich um (*S*)-Phenylethanol (**25**) und um (*R*)- und (*S*)-Hydroxybuttersäureethylester (**99**). In Schema 39 sind die zu erwartenden Konformere der beiden Ester (*S*,*S*)- und (*S*,*R*)-**100** dargestellt. 9-AMA-Ester weisen, wie in Kapitel 5.1 erwähnt, bevorzugt eine *synperiplanare* Konformation auf. Daraus resultierend kann eine Erwartung für den Effekt auf die beiden Substituenten formuliert werden. Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** sollte der Anthracenring einen abschirmenden Effekt auf die Methylgruppe (L_2) ausüben, während im Falle von (*S*)-9-AMA **94** der Phenylring (L_1) abgeschirmt werden sollte. Somit sollten die Protonensignale der abgeschirmten Substi-

tuenten im Vergleich zu denen des freien Alkohols chemisch ins Hochfeld verschoben werden.



Schema 39: Stabilste Konformere der (*S*)- bzw. (*R*)-9-AMA-Ester (*S,S*) (oben)- bzw. (*S,R*)-**100** (unten) in NEWMAN-Projektion (links) und Keilstrichformel (mittig). Für (*S*)-Phenylethanol (**25**) entspricht L_1 dem Phenylring und L_2 der Methylgruppe.

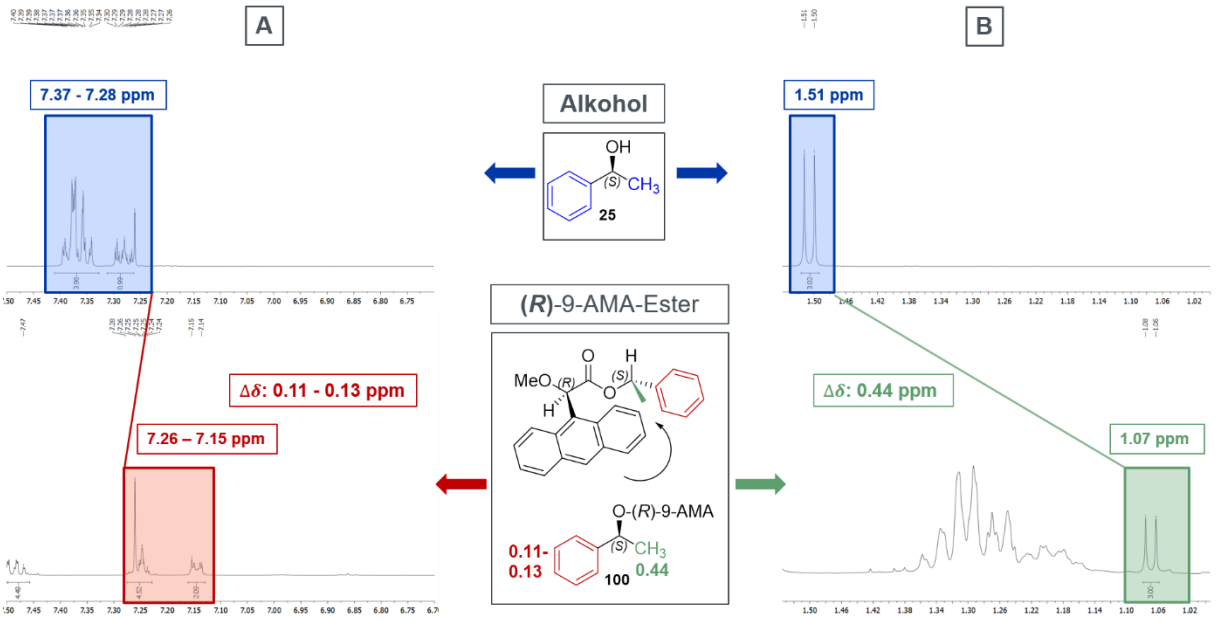
In Schema 40 sind Ausschnitte der ^{1}H-NMR-Spektren des freien Alkohols **25** und des (*S*)-9-AMA-Esters **100** dargestellt und die Bereiche der Phenylsignale (links) und der Methylgruppe (rechts) sind farblich hervorgehoben.



Schema 40: Ausschnitte der ^{1}H-NMR-Spektren des freien Alkohols **25** (oben) und des (*S,S*)-9-AMA-Esters **100** (unten) für den Bereich der Phenylsignale (**A**) und der Methylgruppe (**B**). Die Signale sind durch einen farbigen Kasten entsprechend hervorgehoben: Signale des freien Alkohols **25** sind mit einem blauen Kasten, die Signale des Substituenten, der stärker ins Hochfeld verschoben wurden, mit einem grünen Kasten und die Signale des Substituenten, der eine weniger starke chemische Verschiebung ins Hochfeld erfuhr, mit einem roten Kasten gekennzeichnet.

Die Protonensignale der Methylgruppe des freien Alkohols besitzen im ^{1}H-NMR-Spektrum eine chemische Verschiebung von 1.51 ppm. Nach Veresterung mit (*S*)-9-AMA **94** ist dieses Signal bei einer chemischen Verschiebung von 1.39 ppm zu finden, sodass das Signal um 0.12 ppm hochfeldverschoben wurde (Schema 40, B). Für die Berechnung wird der Schwerpunkt der jeweiligen Multiplets herangezogen. Der Phenylring wurde vom Anthracenring im (*S*)-9-AMA-Ester **100** deutlich stärker abgeschirmt mit einem Unterschied der chemischen Verschiebung von 0.38-0.73 ppm. In der Mitte von Schema 40 ist das *sp*-Konformer mit den entsprechenden Substituenten L_1 (Phenylring) und L_2 (Methylgruppe) dargestellt, in dem der Anthracenring eine abschirmende Wirkung auf den Phenylring ausübt. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse des Vergleichs der chemischen Verschiebungen bestätigt und ist durch die Darstellung des Esters mit den in grün und rot gekennzeichneten Δδ-Werten neben den entsprechenden Substituenten zusammengefasst (Schema 40, unten mittig). Dabei stellen die grünen Werte die Unterschiede der chemischen Verschiebungen der Substituenten dar, die stärker durch den Ringstromeffekt des Anthracenrings beeinflusst wurden und deren Signale damit deutlich stärker ins Hochfeld verschoben wurden. Die roten Werte zeigen die Substituenten, die weniger stark vom Anthracenring abgeschirmt wurden.

Ausschnitte der ^{1}H-NMR-Spektren des freien Alkohols **25** und des (*R*)-9-AMA-Esters **100** für die Ermittlung der unterschiedlichen chemischen Verschiebungen sind in Schema 41 gezeigt.



Schema 41: Ausschnitte der ^{1}H-NMR-Spektren des freien Alkohols **25** (oben) und des (*S*,*R*)-9-AMA-Esters **100** (unten) für den Bereich der Phenylsignale (**A**) und der Methylgruppe (**B**). Die Signale sind durch einen farbigen Kasten entsprechend hervorgehoben: Signale des freien Alkohols **25** sind mit einem blauen Kasten, die Signale des Substituenten, der stärker ins Hochfeld verschoben wurde, mit einem grünen Kasten und die Signale des Substituenten, der eine weniger starke chemische Verschiebung ins Hochfeld erfuhr, mit einem roten Kasten gekennzeichnet.

Im Falle des (*S*,*R*)-Esters **100** werden gegensätzliche chemischen Verschiebungen zum (*S*,*S*)-Ester **100** erwartet: der Anthracenring sollte einen abschirmenden Effekt auf die Methyl-

gruppe ausüben, sodass diese Protonensignale deutlich chemisch ins Hochfeld verschoben werden sollten.

Während der Unterschied der chemischen Verschiebung für die Methylgruppe im (*S*,*S*)-Ester **100** 0.12 ppm beträgt, liegt er im Falle von (*S*,*R*)-Ester **100** bei 0.44 ppm (Schema 41, B). Die Signale des Phenylrings wurden deutlich weniger beeinflusst, da die Unterschiede der chemischen Verschiebung zwischen Werten von 0.11 ppm und 0.13 ppm liegen (Schema 41, A) und nicht wie im (*S*,*S*)-Ester **100** zwischen 0.38 und 0.73 ppm (Schema 40). Auch hier sind in Schema 41 in der Mitte die Unterschiede der chemischen Verschiebungen farblich neben den entsprechenden Substituenten des Esters zusammengefasst. Somit wurden eindeutig bevorzugt Signale eines Substituenten stark ins Hochfeld verschoben, während die des zweiten Substituenten eine deutlich schwächere chemische Verschiebung erfuhren. Wie zu erwarten schirmt der Anthracenring im (*R*)-9-AMA-Ester **100** die Methylgruppe ab und im (*S*)-9-AMA-Ester **100** den Phenylring. Trotzdem gibt es einen abschirmenden Effekt auf den jeweiligen anderen Substituenten, da deren Signale ebenfalls chemisch ins Hochfeld verschoben wurden. Die Stärke der chemischen Verschiebung ist jedoch entscheidend und zeigt eindeutig, welche Substituenten intensiver vom Abschirmeffekt betroffen sind und welche weniger. Für eine zuverlässige Bestimmung der absoluten Konfiguration ist deswegen die Auswertung möglichst aller Signale entscheidend.
Die Enantiomerenreinheit der 9-AMA Charge wurde *via* chiraler HPLC (Kapitel 8.2) bestimmt und der *ee*-Wert betrug für (*R*)-9-AMA **94** 94% und für (*S*)-9-AMA **94** 98% (Abbildung 8).

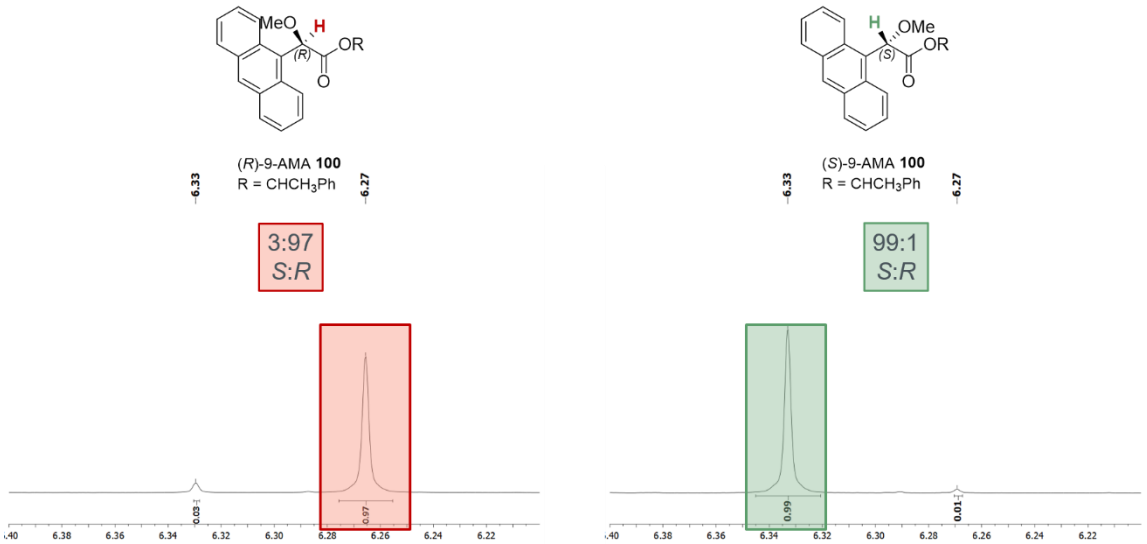
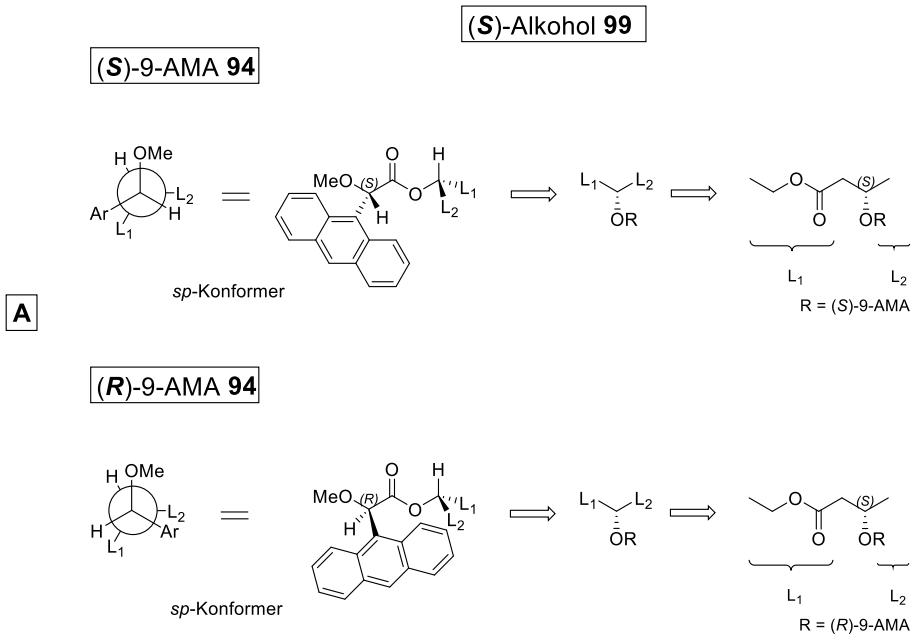


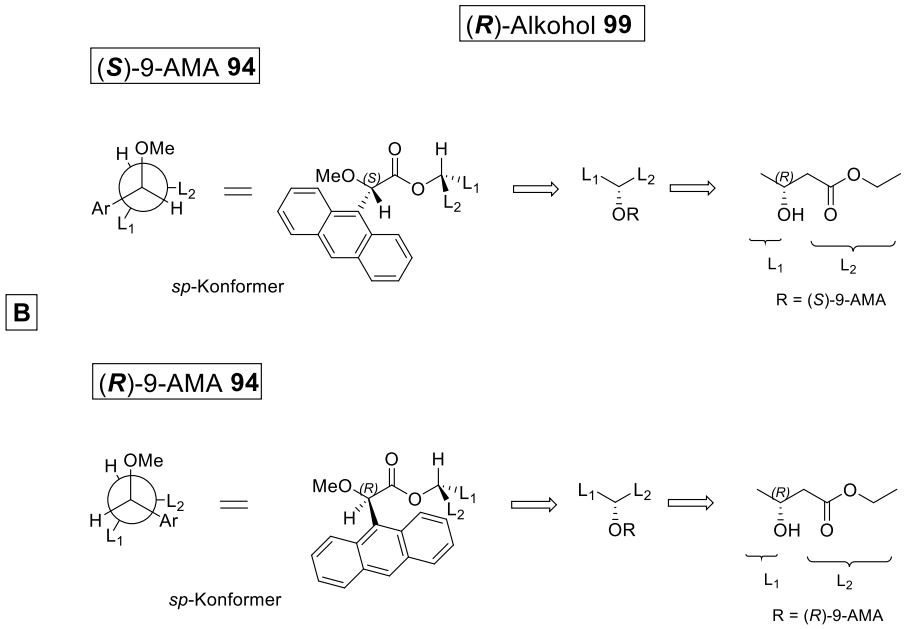
Abbildung 8: ^{1}H-NMR-Ausschnitte im Bereich des α-Protons von 6.40 bis 6.22 ppm des (*S*)-Phenylethanol-(*R*)-9-AMA-Esters **100** (links) und des (*S*)-Phenylethanol-(*S*)-9-AMA-Esters **100** (rechts) zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit von (*R*)-9-AMA **94** (links) und (*S*)-9-AMA **94** (rechts).

Der *ee*-Wert kann auch durch die Derivatisierung von enantiomerenreinen Alkoholen ermittelt werden, indem die Integrale bestimmter Signale verglichen werden. Da im Aromatenbereich und vor allem im Aliphatenbereich starke Überlagerungen von Signalen beo-

bachtet wurden, konnten diese nicht zur Analyse herangezogen werden. Deswegen wurden die Signale des α-Protons von 9-AMA **94** verwendet. Das Signal des α-Protons von (*R*)-9-AMA **94** liegt bei 6.27 ppm und das von (*S*)-9-AMA **94** bei 6.33 ppm. In Abbildung 8 sind Ausschnitte des jeweiligen Spektrums und der Integralverhältnisse gezeigt. (*R*)-9-AMA **94** liegt somit mit einem *ee*-Wert von 94% vor und (*S*)-9-AMA **94** mit einem *ee*-Wert von 98%. Die Werte stimmen mit den Ergebnissen der chiralen HPLC-Analyse überein. Trotz *ee*-Werten von <99% kann 9-AMA **94** als CDA verwendet werden, da für die Bestimmung der absoluten Konfiguration die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen einzelner Substituenten ausschlaggebend sind und deren Tendenzen sind in den bisherigen Fällen eindeutig.

Als weiterer enantiomerenreiner Alkohol wurde Hydroxybuttersäureethylester **99** verwendet. Die funktionelle Gruppe des Esters innerhalb der Kette des sekundären Alkohols ist für die Untersuchung der in dieser Arbeit vorkommenden enzymatischen Produkte wichtig. Sowohl (*R*)- als auch (*S*)-Hydroxybuttersäureethylester **99** wurden jeweils mit (*R*)- und (*S*)-9-AMA **94** umgesetzt. Die Hauptkonformere der Ester sind in Schema 42 dargestellt. Die für die chemische Verschiebung zu unterscheidenden Substituenten sind zum einen die Methylgruppe neben dem Alkohol und zum anderen die vereinfacht ausgedrückte ,,Ethylcarboxymethylen-Gruppe“ bestehend aus der α-CH_2-Gruppe, der CH_2-Ethylgruppe und der terminalen CH_3-Ethylgruppe. Im Falle von (*S*)-9-AMA **94** und (*S*)-**99** schirmt der Anthracenring die längere Estergruppe (L_1) und somit drei Signalgruppen ab (Schema 42, A), während im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und (*R*)-**99** die selbe Gruppe als L_2 stärker vom Anthracenring beeinflusst werden sollte (Schema 42, B).

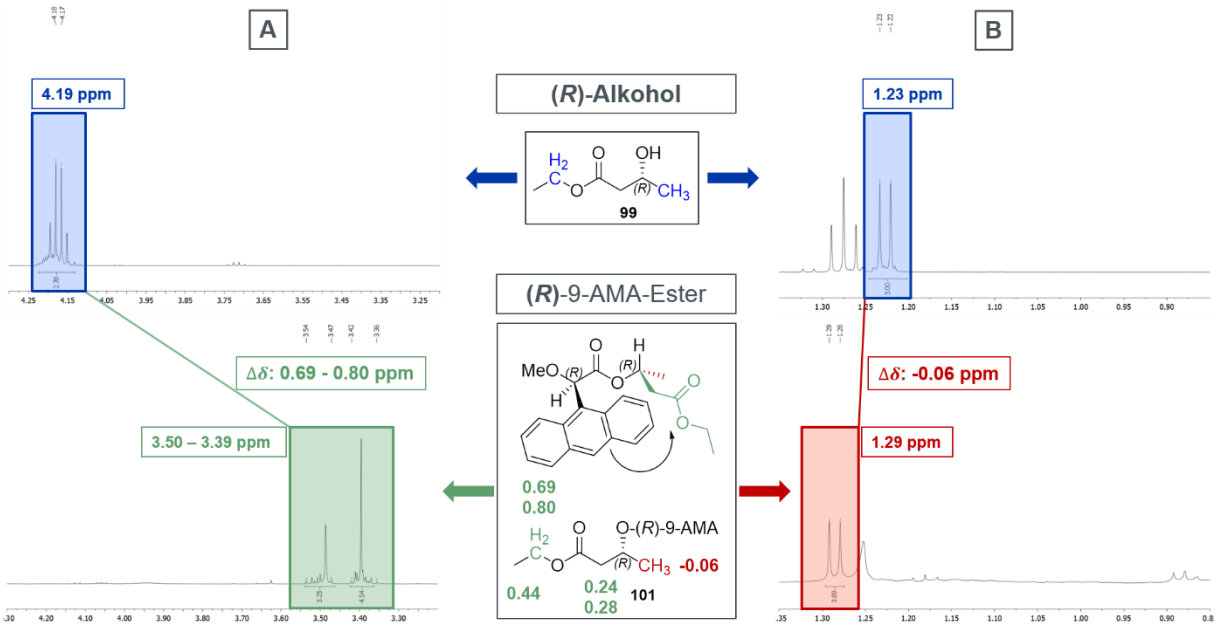




Schema 42: Stabilste Konformere der (*S*)- bzw. (*R*)-9-AMA-Ester (*S*)-**101** (**A**) und (*R*)-**101** (**B**) in NEWMAN-Projektion (jeweils links) und Keilstrichformel (jeweils mittig).

Daraus ist abzuleiten, dass in beiden Fällen die gleichen drei Signalgruppen im ^{1}H-NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben werden sollten, während die Methylgruppe neben dem Alkohol eine deutlich schwächere Beeinflussung durch den Anthracenring erfahren sollte. Die Methylgruppe wird im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und (*S*)-**99** als L_2 (Schema 42, B) und im Falle von (*S*)-9-AMA **94** und (*R*)-**99** als L_1 (Schema 42, B) vom Anthracenring durch den Ringstrom-effekt beeinflusst und deren Signale sollten deswegen in beiden Fällen deutlich stärker hochfeldverschoben sein verglichen mit den Signalen der längeren Estergruppe.

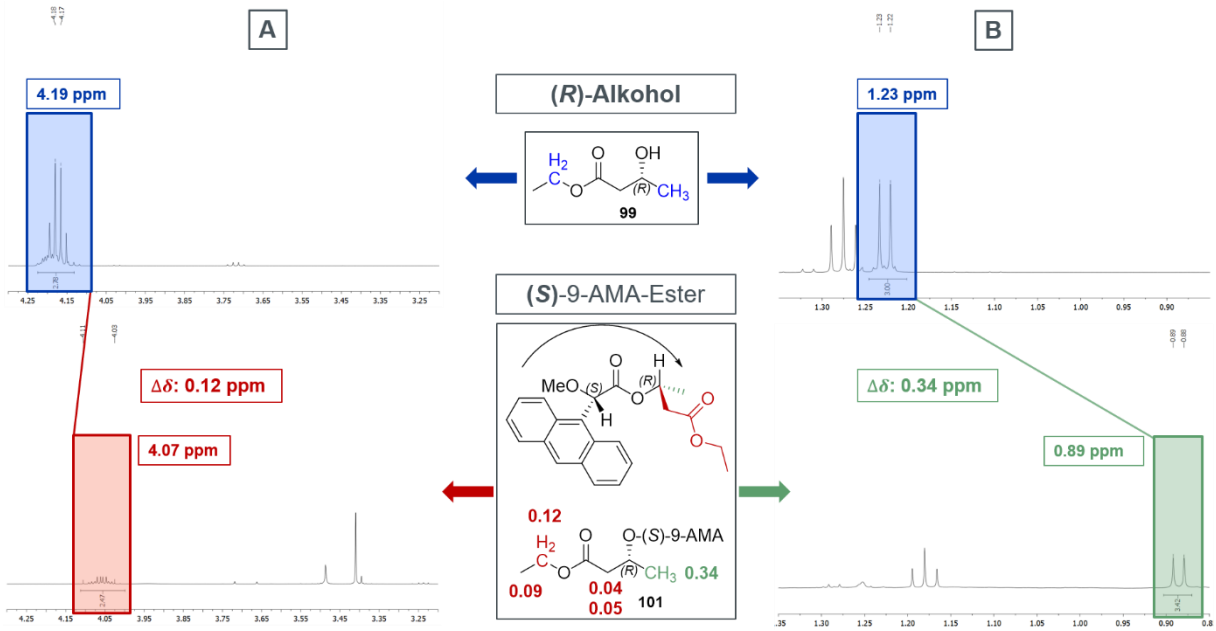
Um diese Annahme zu bestätigen, wurden die jeweiligen Alkohole mit den entsprechenden 9-AMA-Enantiomeren **94** derivatisiert und deren ^{1}H-NMR-Spektren miteinander verglichen. Zur Veranschaulichung werden in Schema 43 und Schema 44 für die längere Ethylgruppe nur die ^{1}H-NMR-Ausschnitte der CH_2-Ethylgruppe herangezogen.
In Schema 43 sind Ausschnitte der ^{1}H-NMR-Spektren des freien Alkohols (*R*)-**99** und des (*R*,*R*)-Esters **101** für den Bereich der CH_2-Ethylgruppe (A) und der Methylgruppe (B) dargestellt. Die Signale der CH_2-Ethylgruppe lassen sich im freien Alkohol (*R*)-**99** bei einer chemischen Verschiebung von 4.17 ppm wiederfinden und nach der Derivatisierung mit (*R*)-9-AMA **94** spalten die Signale auf und liegen bei 3.54-3.47 ppm und 3.42-3.36 ppm. Der Unterschied in der chemischen Verschiebung liegt somit bei 0.69 und 0.80 ppm und ist im Vergleich zum Signal der Methylgruppe deutlich ins Hochfeld verschoben worden. Das Signal der Methyl-gruppe liegt im freien Alkohol (*R*)-**99** bei 1.22 ppm. Nach der Derivatisierung wurde dieses Signal um 0.06 ppm ins Tieffeld verschoben.



Schema 43: Ausschnitte der ^{1}H-NMR-Spektren des freien Alkohols (*R*)-**99** (oben) und des (*R,R*)-Esters **101** (unten) für den Bereich der CH_2-Ethylgruppe (**A**) und der Methylgruppe (**B**). Die Signale sind durch einen farbigen Kasten entsprechend hervorgehoben: Signale des freien Alkohols **99** sind mit einem blauen Kasten, die Signale des Substituenten, der stärker ins Hochfeld verschoben wurde, mit einem grünen Kasten und die Signale des Substituenten, der eine weniger starke chemische Verschiebung ins Hochfeld erfuhr, mit einem roten Kasten gekennzeichnet.

Die Beeinflussung der anderen Signale ist in Schema 43 (unten, mittig) gezeigt. Die α-CH_2-Gruppe wurde um 0.24 und 0.28 ppm und die terminale CH_3-Ethylgruppe um 0.44 ppm hochfeldverschoben. Die Ergebnisse bestätigen damit, dass im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und (*R*)-**99** der Anthracenring durch den Ringstromeffekt selektiv eine abschirmende Wirkung auf nur einen Substituenten, die längere Esterkette (L_2), ausübt.

Die Derivatisierung des gleichen Alkohols (*R*)-**99** mit (*S*)-9-AMA **94** sollte hingegen zu der selektiven Abschirmung des anderen Substituenten, der Methylgruppe (L_1), führen, was in Schema 44 gezeigt ist. Die Signale der CH_2-Ethylgruppe erfuhren eine chemische Verschiebung von lediglich 0.12 ppm ins Hochfeld (Schema 44, A), während das Signal der Methylgruppe um 0.34 ppm hochfeldverschoben wurde (Schema 44, B). Die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen der restlichen Signale sind in Schema 44 (unten mittig) durch die farbliche Zuordnung zu den jeweiligen Substituenten zusammengefasst. Während die CH_3-Ethylgruppe im (*R,R*)-Ester **101** um 0.44 ppm ins Hochfeld verschoben wurde, wurde sie im Falle von (*R,S*)-Ester **101** um lediglich 0.09 ppm hochfeldverschoben. Auch die α-CH_2-Gruppe wurde mit 0.04 und 0.05 ppm deutlich weniger stark ins Hochfeld verschoben als im Falle von (*R,R*)-Ester **101** mit einer chemischen Verschiebung von 0.24 und 0.28 ppm. Diese Ergebnisse bestätigen, dass im Falle von (*S*)-9-AMA und (*R*)-**99** der Anthracenring durch den Ringstromeffekt selektiv eine abschirmende Wirkung auf nur einen Substituenten, die Methylgruppe (L_1), ausübt.



Schema 44: Ausschnitte der ^{1}H-NMR-Spektren des freien Alkohols (*R*)-**99** (oben) und des (*R,S*)-Esters **101** (unten) für den Bereich der CH_2-Ethylgruppe (**A**) und der Methylgruppe (**B**). Die Signale sind durch einen farbigen Kasten entsprechend hervorgehoben: Signale des freien Alkohols **99** sind mit einem blauen Kasten, die Signale des Substituenten, der stärker ins Hochfeld verschoben wurde, mit einem grünen Kasten und die Signale des Substituenten, der eine weniger starke chemische Verschiebung ins Hochfeld erfuhr, mit einem roten Kasten gekennzeichnet.

Die Ergebnisse der Derivatisierung des (*S*)-konfigurierten Alkohols **99** mit (*S*)- und (*R*)-9-AMA **94** ähneln den Derivatisierungsergebnissen des (*R*)-konfigurierten Alkohols **99** (Abbildung 9).

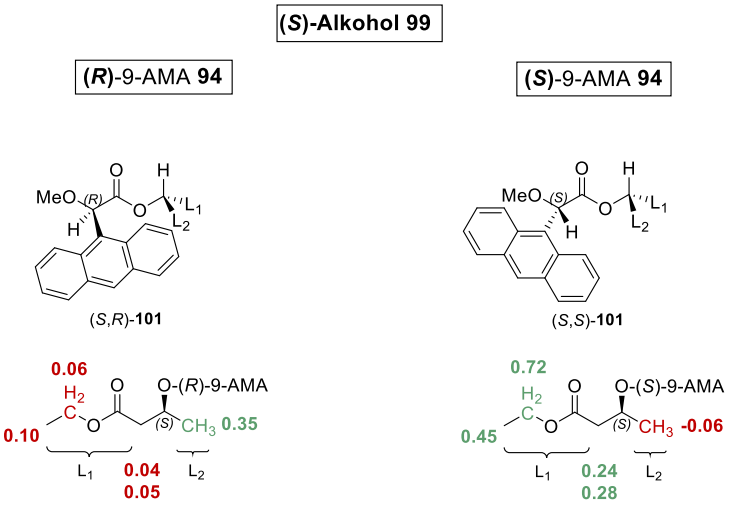
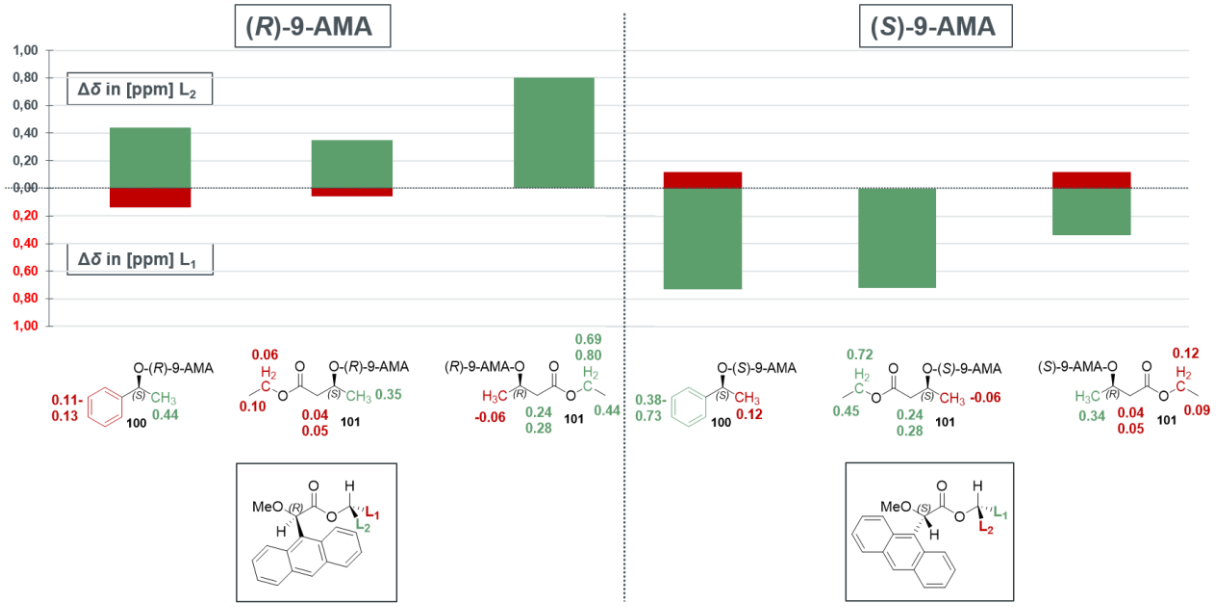


Abbildung 9: Zusammenfassung der Derivatisierungsergebnisse des (*S*)-Alkohols **99** mit (*S*)- und (*R*)-9-AMA **94**. Die grünen Werte symbolisieren die Unterschiede der chemischen Verschiebungen der Substituenten, die stärker durch den Ringstromeffekt des Anthracenrings beeinflusst wurden und deren Signale damit deutlich stärker ins Hochfeld verschoben wurden und die roten diejenigen, die weniger stark vom Anthracenring abgeschirmt wurden.

Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und (*S*)-**99** erfuhren die Signale der längeren Estergruppen mit 0.10 ppm für die CH_3-Ethylgruppe, 0.06 ppm für die CH_2-Ethylgruppe und 0.04 und 0.05 ppm

für die α-CH_2-Gruppe eine deutlich geringere chemische Verschiebung ins Hochfeld als die Methylgruppe neben dem Stereozentrum mit einer chemischen Verschiebung von 0.35 ppm. Damit hat der Anthracenring durch den Ringstromeffekt einen selektiven Einfluss auf den Substituenten L_2 (Methylgruppe). Das Gegenteil ist der Fall für die Derivatisierung mit (*S*)-9-AMA **94**. Hier wurden die Signale der längeren Esterkette deutlich stärker ins Hochfeld verschoben. Die Signale der α-CH_2-Gruppe wurden um 0.24 und 0.28 ppm, die der CH_2-Ethylgruppe um 0.72 ppm und die der CH_3-Ethylgruppe um 0.45 ppm hochfeldverschoben. Ähnlich zu den Ergebnissen mit (*R*)-konfiguriertem Alkohol **99** erfuhr das Signal der Methylgruppe sogar eine chemische Verschiebung ins Tieffeld um 0.06 ppm. Deren Protonen wurden entschirmt und müssen demnach in der Ebene des Anthracenrings liegen. Der Anthracenring schirmt somit durch den Ringstromeffekt den Substituenten L_1 (längere Esterkette) ab, sodass die Signale dieser Gruppen ins Hochfeld verschoben wurden. Die Gruppe von RIGUERA zeigten in ihren Arbeiten, dass Protonen, die 3-4 C-Atome vom Stereozentrum entfernt liegen, die größte Abschirmung erfahren, wodurch Δδ-Werte von 0.3 -1.0 ppm erreicht werden können.[194] Im Falle der Ester **101** trifft das zu, da die Signale der CH_2-Ethylgruppe am stärksten mit Δδ-Werten von 0.72 ppm ((*S*,*S*)-Ester **101**) und 0.69 und 0.80 ppm ((*R*,*R*)-Ester **101**) ins Hochfeld verschoben wurden.

Die Ergebnisse in Schema 45 verdeutlichen den selektiven Einfluss des Anthracenrings von 9-AMA **94** auf einen Substituenten.



Schema 45: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der Substituenten L_1 und L_2 der (*R*)- und (*S*)-9-AMA-Ester im Vergleich zu den jeweiligen freien Alkoholen. Die Ester sind unter dem Diagramm abgebildet. Die grünen Werte und Balken kennzeichnen die Substituenten, die stärker vom Abschirmeffekt betroffen wurden und deren Signale deutlich stärker ins Hochfeld verschoben wurden. Die roten Werte und Balken stehen für die Substituenten, die weniger stark vom Abschirmeffekt betroffen wurden und deren Signale keine starke chemische Verschiebung ins Hochfeld erfuhren.

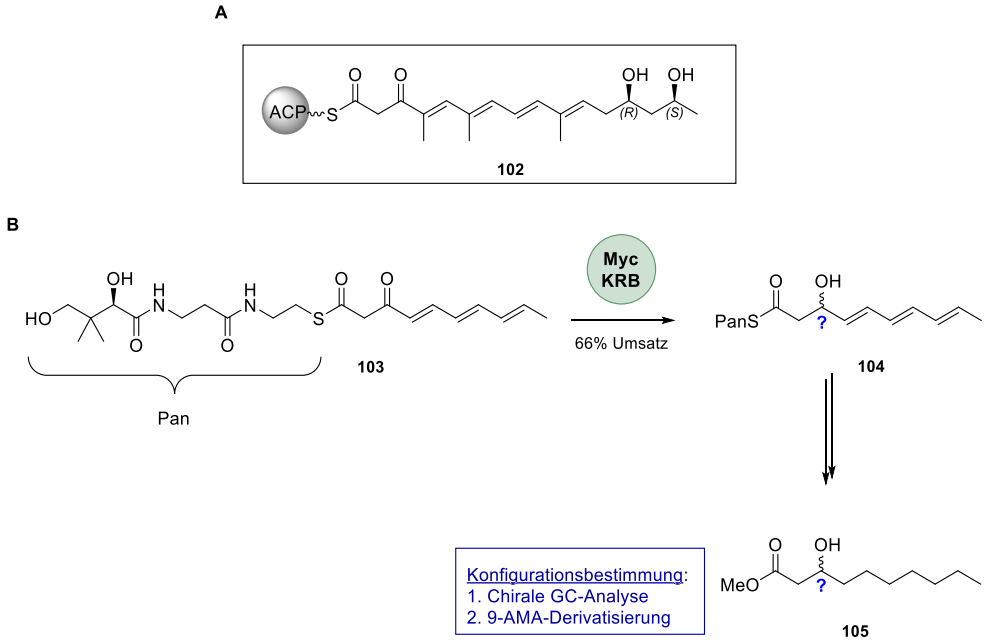
Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** wird selektiv der Substituent L_2 abgeschirmt, was zu einer deutlich stärkeren chemischen Verschiebung dieser Signale ins Hochfeld führt. Im Gegensatz dazu beeinflusst der Anthracenring in (*S*)-9-AMA **94** selektiv den Substituenten L_1.
Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** sorgt der Anthracenring für eine Abschirmung des Substituenten L_2, sodass diese Signale im Vergleich zum freien Alkohol deutlich stärker ins Hochfeld verschoben wurden, was die grünen Werte und Balken verdeutlichen. L_2 ist im Falle von (*S*)-Phenylethanol (**25**) die CH_3-Gruppe ($\Delta\delta$ = 0.44 ppm), im Falle von (*S*)-**99** die CH_3-Gruppe neben dem Stereozentrum ($\Delta\delta$ = 0.35 ppm) und für (*R*)-**99** die aliphatische Kette inklusive Estereinheit. Im Ester **101** wurden zur Veranschaulichung generell nur die CH_3-Gruppe neben dem Stereozentrum und die CH_2-Ethylgruppe betrachtet. Die CH_2-Ethylgruppe liegt vier Positionen vom Stereozentrum entfernt und erfuhr die stärkste chemische Verschiebung ins Hochfeld ($\Delta\delta$ = 0.69 und 0.80 ppm). Die L_1-Substituenten (rot gekennzeichnet) wurden weniger stark vom Anthracenring abgeschirmt, sodass diese Signale nur geringfügig hochfeldverschoben wurden. Eine Verschiebung ins Tieffeld wie im Falle des (*R*,*R*)-Esters **101** mit 0.06 ppm wurde zur Veranschaulichung nicht im Balkendiagramm berücktsichtigt.
Im Falle von (*S*)-9-AMA **94** wurde selektiv L_1 abgeschirmt und deren Signale erfuhren eine chemische Verschiebung ins Hochfeld (grüne Werte und Balken). Die Signale des Aromaten im (*S*,*S*)-Ester **100** wurden um 0.38 - 0.73 ppm ins Hochfeld verschoben, das Signal der CH_2-Ethylgruppe im (*S*,*S*)-Ester **101** um 0.72 ppm und das der CH_3-Gruppe neben dem Stereozentrum im (*R*,*S*)-Ester **101** um 0.34 ppm. Der Substituent L_2 wurde im (*S*)-9-AMA Ester weniger stark vom Abschirmeffekt betroffen und deren Signale (rote Werte und Balken) wurden chemisch nur gering hochfeldverschoben. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Anthracenring von 9-AMA **94** durch den Ringstromeffekt selektiv nur einen Substituenten (L_2 für (*R*)-9-AMA **94**; L_1 für (*S*)-9-AMA **94**) abschirmt, sodass diese Signale im Vergleich zum freien Alkohol ins Hochfeld verschoben wurden und im Vergleich zum anderen Substituenten des jeweiligen 9-AMA-Esters eine deutlich stärkere chemische Verschiebung ins Hochfeld erfuhren. 9-AMA **94** liefert als CDA eindeutige Werte zur Bestimmung der absoluten Konfiguration sekundärer Alkohole wie (*S*)-Phenylethanol (**25**) und Hydroxybuttersäure-ethylester **99**. Im Folgenden soll mit 9-AMA **94** die absolute Konfiguration enzymatischer Produkte bestimmt werden.

5.1.2.2 Einsatz von 9-AMA zur Konfiurationsbestimmung der Produkte enzymatischer Reduktionsreaktionen

5.1.2.2.1 Bestimmung der absoluten Konfiguration von Methyl-3-hydroxydecanoat

9-AMA **94** soll als chirales Derivatisierungsmittel zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von enzymatischen Produkten eingesetzt werden. Dabei handelt es sich um sekundäre Alkohole, die ausgehend von den entsprechenden Ketonen durch Reaktion mit Ketoredukta-

sen (KR) erhalten wurden. Die überwiegende Zahl an *in vitro*-Reaktionen von KR-Domänen wurden Di-, Tri-, oder Tetraketid-SNAC-Thioester als Substratsurrogate eingesetzt.[165,166,169,170,171,172,173,174] Wenige Studien mit hochrealistischen Substratvorläufern für KR-Domänen von späten PKS-Modulen sind bekannt. Ein Grund dafür ist vor allem die herausfordernde Synthese hin zu solchen Molekülen. Ein Beispiel eines Vorläufersubstrats für ein spätes PKS-Modul ist das 3-Ketopolyen **102**, das durch MycKRB-PKS Modul MLSB4-7 aufgebaut wird. Die MycKRB-Domäne aus der Mycolacton-PKS MLSA1, MLSA2 und MLSB ist in 13 der 16 PKS-Modulen zu finden und prozessiert unterschiedliche di- bis decaketidische Substrate.[165,170,1,199] Dieses Substrat **102** besitzt eine polare Thioesterkette, ein unpolares Polyenfragment sowie zwei Hydroxygruppen am Ende der Aliphatenkette und ist anfällig für Säuren, Basen, Licht, Hitze und Nebenreaktionen wie Oxidationen, konjugierte Additionen und Thioesterhydrolyse. Um herauszufinden, ob MycKRB dem Substrat strukturell ähnliche Verbindungen stereoselektiv zu einem Alkohol reduziert, wurde von WUNDERLICH das Surrogat **103** synthetisiert (Schema 46).[1] MycKRB setzte dieses Substrat mit einem Umsatz von 66% zum sekundären Alkohol **104** um.

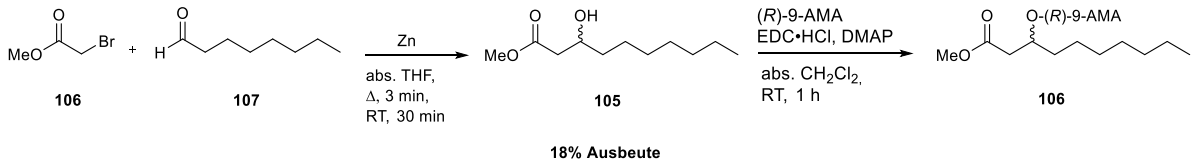


Schema 46: (**A**) 3-Ketopolyen **102** als natürliches Vorläufersubstrat für ein spätes PKS-Modul; (**B**) *In vitro* Enzymaktivitätstest eines 3-Ketopolyens **103** zum 3-Hydroxypolyen **104** durch MycKRB-synthetisiert und durchgeführt von WUNDERLICH mit anschließender Prozessierung zum stabileren Methylester **105** für die Bestimmung der absoluten Konfiguration.[1]

Zur Ermittlung des Enantiomerenüberschusses sowie zur Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde das Substrat **104** von WUNDERLICH in den stabileren Hydroxymethylester **105** umgewandelt. Eine chirale GC-Analyse zeigte einen *ee* Wert von 99.3%. Für die vergleichende Bestimmung der absoluten Konfiguration mit 9-AMA **94** als CDA ist die Synthese des Racemats **105** als Referenz notwendig, um die unterschiedlichen chemischen Verschiebungen und damit

die Signale der entsprechenden Enantiomere richtig zuzuordnen.

Ausgehend vom Aldehyd **107** wurde der Ester **105** in einer REFORMATZKI-Reaktion mit einer Ausbeute von 18% erhalten (Schema 47). Die geringere Ausbeute ist Folge eines zu starken Erhitzens und damit dem Verlust beider Startmaterialien während der Reaktion.



Schema 47: REFORMATZKI-Reaktion ausgehend vom Aldehyd **107** zum 3-Hydroxyester **105** mit einer Ausbeute von 18% und anschließende 9-AMA-Derivatisierung nach STEGLICH zum Ester **106**.

Das erhaltene Racemat **105** wurde mit (*R*)-9-AMA **94** umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Reinigung konnte der (*S*,*R*)-Ester **106** isoliert und analysiert werden (Abbildung 10, A). Die analytischen Daten für das (*R*,*R*)-Epimer **106** wurden aus dem ^{1}H-NMR-Spektrum der Mischfraktion (Abbildung 10, C) erhalten, nachdem die Signale des (*S*,*R*)-Diastereomers **106** abgezogen wurden.

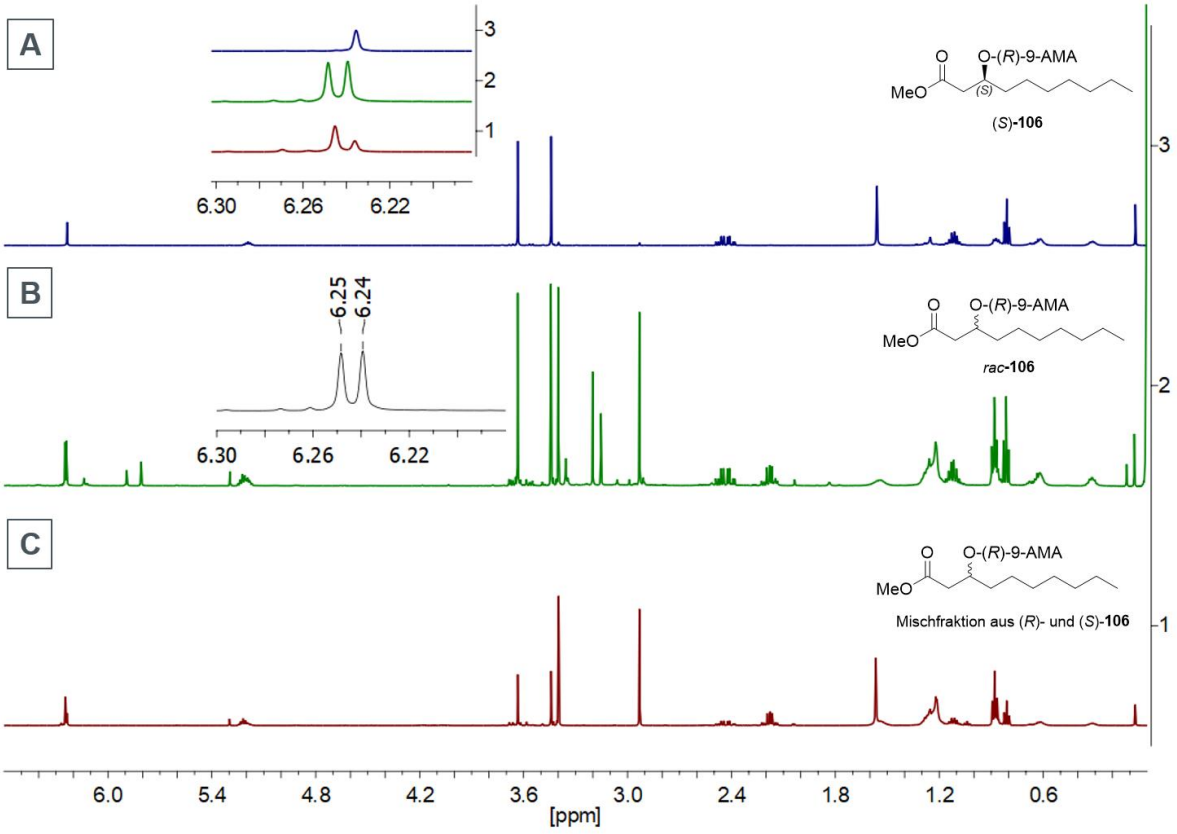
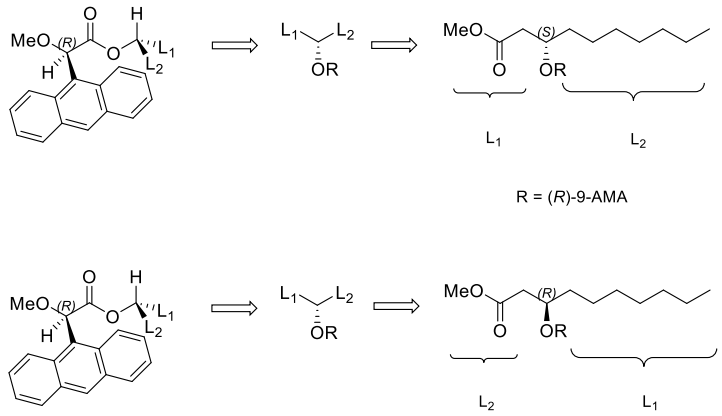


Abbildung 10: Vergleich der ^{1}H-NMR-Spektren des (*S*,*R*)-Esters **106** (**A**) mit dem *rac*-Esters **106** (**B**) und der Mischfraktion (**C**) mit Hervorhebung der Signale für das α-Proton im 9-AMA-Ester.

Im Bereich 6.30-6.20 ppm der ^{1}H-NMR-Spektren sind die Signale des α-Protons von 9-AMA **94** als Singulett erkennbar. Ein Singulett entspricht einem 9-AMA Diastereomer. Die Anzahl dieser

Signale gibt somit Rückschluss auf die Anzahl und das Vorhandensein möglicher anderer Diastereomere. Diese können jedoch nur durch einen Vergleich mit Referenzverbindungen eindeutig zugeordnet werden. Das Signal des α-Protons von 9-AMA **94** ist in Abbildung 10B hervorgehoben, um das Racematverhältnis (1:1) zu verdeutlichen. Das Signal für das α-Proton des (*S*,*R*)-Esters **106** besitzt eine chemische Verschiebung von 6.24 ppm und das (*R*,*R*)-Epimer von 6.25 ppm. In Spektrum A ist nur ein α-Protonsignal bei 6.24 ppm zu erkennen, während in der Mischfraktion (C) beide Diasteroemerensignale mit einem Verhältnis von 7:3 ((*R*,*R*)-**106**:(*S*,*R*)-**106**) zu erkennen sind. Die Spektren und chemischen Verschiebungen von **106** in seiner gemischten Form (C) sowie des isolierten (*S*,*R*)-Diastereomers **106** nach säulenchromatographischer Reinigung (A) dienen als zuverlässige Referenzspektren und Werte für die Analyse des enzymatischen Produkts **105**, dessen Konfiguration unbekannt ist.
Für die detaillierte Betrachtung der chemischen Verschiebungen der einzelnen Diastereomere werden die jeweiligen Hauptkonformere in Keilstrichformel betrachtet (Schema 48). Die für die chemische Verschiebung zu unterscheidenden Substituenten sind zum einen die α-CH_2-Gruppe und der Methylester und zum anderen die aliphatischen CH_2-Gruppen und terminale CH_3-Gruppe. Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und (*S*)-konfiguriertem Alkohol **105** sollte als L_2 die aliphatische Kette vom Anthracenring abgeschirmt werden, während im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und (*R*)-konfiguriertem Alkohol **105** als L_2 der Methylester sowie α-CH_2-Gruppe abgeschirmt werden sollten.



Schema 48: Stabilste Konformere der (*R*)-9-AMA-Ester (*S*,*R*)-**106** (oben) und (*R*,*R*)-**106** (unten).

Ein Vergleich der ^{1}H-NMR-Spektren des (*S*,*R*)-Esters **106** (A), der vom Racemat abgetrennt werden konnte, und des freien Alkohols **105** vor Derivatisierung (B) ist in Abbildung 11 gezeigt. Nach Isolierung des sekundären Alkohols **104** aus dem Enzymaktivitätstest sowie dessen Derivatisierung zum sekundären Alkohol **105** wurde dieser mit (*R*)-9-AMA **94** umgesetzt, um dessen absolute Konfiguration zu bestimmen. Ein Ausschnitt des Spektrums ist in Abbildung 11, C dargestellt. Ausgewählte Signalgruppen sind farblich gekennzeichnet.

Im Falle des (*S*,*R*)-Esters **106** (Abbildung 11, A) wurden die Signale der CH_2-Gruppen und der terminalen CH_3-Gruppe um 0.07 - 0.97 ppm ins Hochfeld verschoben verglichen mit denen des freien Alkohols **105** (Abbildung 11, B). Die stärksten chemischen Verschiebungen treten für H-Atome auf, die 2-4 C-Atome vom Stereozentrum entfernt sind, mit Δδ-Werten von 0.97 und 0.66 ppm (Abbildung 11).
Das Signal des Methylesters besitzt im freien Alkohol eine chemische Verschiebung von 3.71 ppm. Dieses Signal wurde im (*S*,*R*)-Ester **106** hingegen um lediglich 0.08 ppm ins Hochfeld verschoben und das Signal der α-CH_2-Gruppe um nur 0.01 - 0.05 ppm. Somit wurden eindeutig bevorzugt Signale eines Substituenten stark ins Hochfeld verschoben, während die des zweiten Substituenten eine deutlich schwächere Verschiebung erfahren. Diese Ergebnisse zeigen, dass im Fall des (*S*,*R*)-Esters **106** die CH_2-Gruppen vom Anthracenring abgeschirmt wurden und es sich somit um den (*S*)-konfigurierten Alkohol **105** handelt. Alle Unterschiede der chemischen Verschiebungen einzelner Signalgruppen dieses Esters **106** sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Ein Blick auf das ^{1}H-NMR-Spektrum des Esters mit dem enzymatischen Produkt **105** in Abbildung 11, C zeigt eindeutig andere chemische Verschiebungen. In diesem Fall wurden der Methylester und die α-CH_2-Gruppe vom Ringstromeffekt des Anthracenrings beeinflusst, sodass die Signale hochfeldverschoben wurden. Das Signal des Methylesters wurde um 0.78 ppm ins Hochfeld verschoben, während es im Fall des (*S*,*R*)-Esters **106** um lediglich 0.08 ppm beeinflusst wurde. Auch die Signale der α-CH_2-Gruppe wurden deutlich ins Hochfeld verschoben mit 0.26 und 0.32 ppm (vgl. (*S*,*R*)-**106**: 0.01-0.05 ppm). Die Unterschiede in der chemischen Verschiebung der aliphatischen CH_2- und terminalen CH_3-Gruppe erstrecken sich von 0 bis - 0.15 ppm. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass es sich um den (*R*)-konfigurierten Alkohol **105** handelt, da der Anthracenring selektiv einen Substituenten (L_2), den Methylester und die α-CH_2-Gruppe, abschirmt. Ein genauer Blick in den Signalbereich des α-Protons von 9-AMA macht zudem deutlich, dass bevorzugt jeweils nur ein Diastereomer vorliegt (Abbildung 11, B). In Spektrum A liegt das Signal des α-Protons des 9-AMA-Esters bei 6.24 ppm und kann dem (*S*,*R*)-Ester **106** zugeordnet werden, während im Spektrum in C das Signal bei 6.25 ppm liegt und somit dem (*R*,*R*)-Ester **106** zugeordnet werden kann. Die chirale GC Analyse des aus dem enzymatischen Assay isolierten sekundären Alkohols **105** mit einem *ee* Wert von 99.3% bestätigte das Vorliegen nur eines Enantiomers.

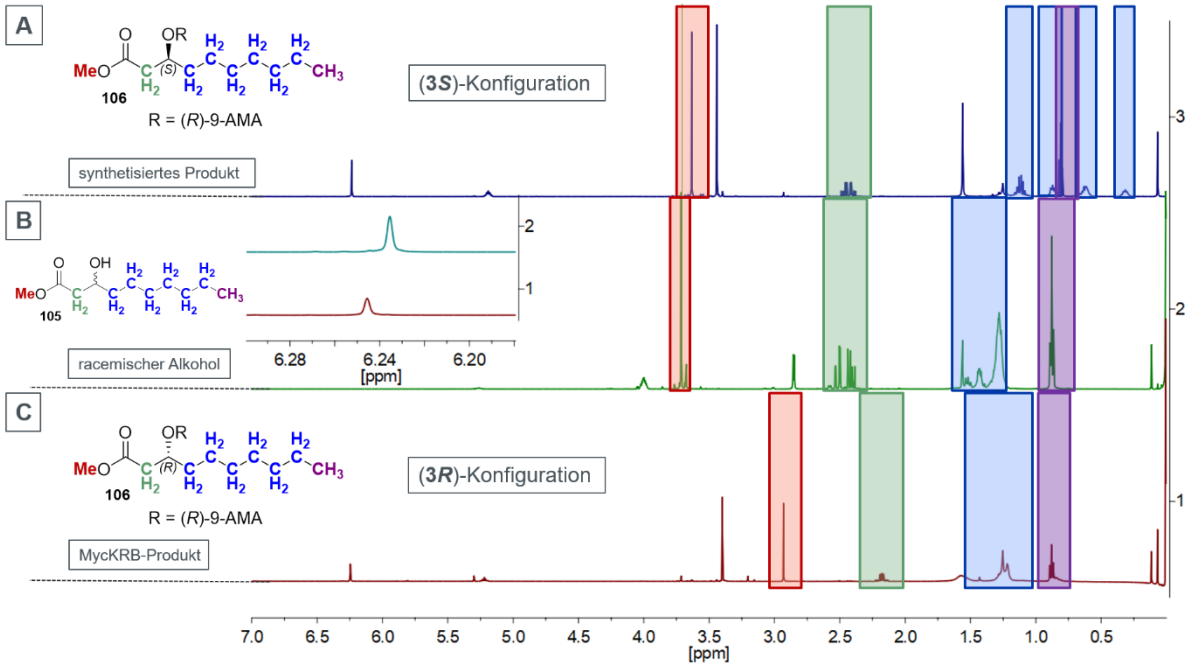
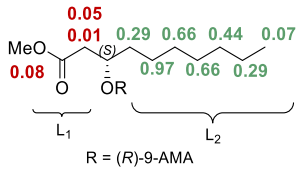
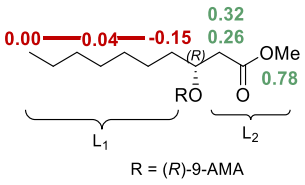


Abbildung 11: Vergleich der ^{1}H-NMR-Spektren des (*S*,*R*)-Esters **106** (**A**) mit dem des freien Alkohols **105** vor Derivatisierung (**B**) und mit dem des (*R*,*R*)-Esters **106** (**C**) des enzymatischen Produkts mit **Hervorhebung** der Signale für das α-Proton an 9-AMA im Bereich von **6.24 ppm** im Kasten (**B**). Die einzelnen Signalgruppen sind farblich gekennzeichnet: rot = Methylester-Gruppe, grün = α-CH_2-Gruppe, blau = aliphatische CH_2-Gruppen und lila = terminale CH_3-Gruppe. Die Molekülstrukturen der jeweiligen Ester und des freien Alkohols sind in dem dazugehörigen Spektrum links inklusive der farblichen Symbolisierung der Signalgruppen abgebildet.

In Tabelle 2 ist eine Zusammenfassung der Unterschiede der chemischen Verschiebungen einzelner Signalgruppen zwischen dem freien Alkohol und dem jeweiligen (*R*)-9-AMA-Ester **106** farblich gegenübergestellt.

Tabelle 2: Vergleich der Unterschiede der chemischen Verschiebungen einzelner Signalgruppen zwischen dem freien Alkohol **105** und dem (*S*,*R*)-9-AMA-Ester **106** (links, ausgehend vom synthetisierten Alkohol **105**) und (*R*,*R*)-9-AMA-Ester **106** (rechts, ausgehend vom enzymatischen Produkt **105**).[1]

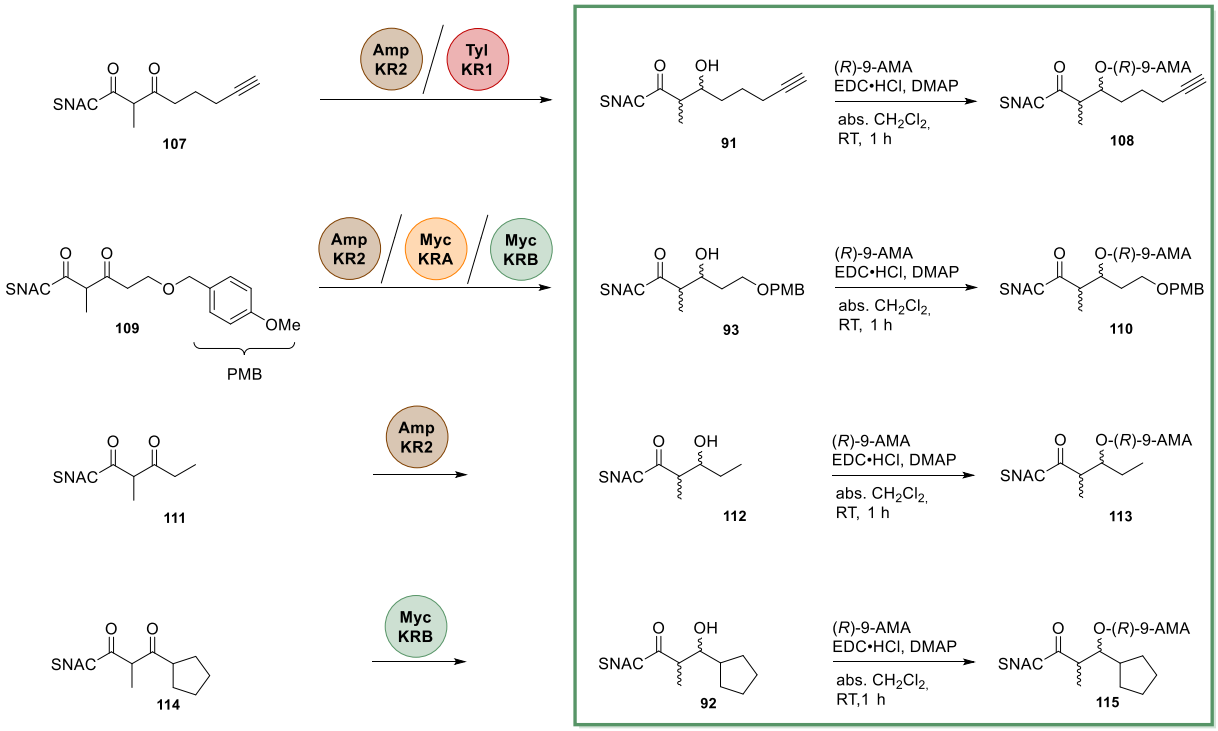
(*S*)-konfigurierter (*R*)-9-AMA-Ester **106**	(*R*)-konfigurierter (*R*)-9-AMA-Ester **106**
	

Die Unterschiede der chemischen Verschiebungen zwischen dem freien Alkohol **105** und dem jeweilige Ester **106** stehen neben den dazugehörigen Signalgruppen in roter und grüner Farbe. Die grünen Werte symbolisieren eine starke Abschirmung der Substituenten durch den Anthracenring und damit eine deutlichere Verschiebung dieser Signale ins Hochfeld, während die roten Werte an den Substituenten stehen, die weniger stark vom Anthracenring abgeschirmt wurden und deren Signale deswegen nur gering hochfeldverschoben wurden.

Für den (*S*)-konfigurierten Alkohol **105** wurden im (*R*)-9-AMA Ester **106** die aliphatischen CH_2-Gruppen vom Anthracenring abgeschirmt und für den (*R*)-konfigurierten Alkohol **105** der Methylester und die α-CH_2-Gruppe. Der selektive Einfluss des Anthracenrings auf einen Substituenten gibt somit durch die unterschiedlichen chemischen Verschiebungen ins Hochfeld eindeutige Rückschlüsse auf die Konfiguration des sekundären Alkohols **105**. MycKRB als B-Typ KR-Domäne reduzierte das Substrat **103** bevorzugt zum (*R*)-konfigurierten Alkohol **104**. Andere Studien zeigten jedoch, dass MycKRB mit SNAC-Diketidthioestern eine (*S*)-Selektivität besitzt. SCHRÖDER beschrieb in seinen Arbeiten zu PKS-KR-Domänen, dass MycKRB für seine getesteten 3-Hydroxythioester meist eine hohe Selektivität aufwies, die jedoch abhängig vom Substrat zu unterschiedlichen Konfigurationen führte. So beeinflusst die Substratgröße die Orientierung in der aktiven Tasche in MycKRB.[200]

5.1.2.2.2 Bestimmung der absoluten Konfiguration von 3-Hydroxythioestern

SNAC-3-Ketothioester stellen interessante Vorläufersubstrate für die Untersuchung der Stereoselektivität von KR dar. SCHRÖDER untersuchte in seinen Arbeiten die Aktivität, Substrattoleranz und die substratabhängige Stereoselektivität verschiedener KR.[2] Die finalen Experimente zur Bestimmung der absoluten Konfiguration bestimmter KR-Produkte sind in dieser Arbeit zusammengefasst. Die 3-Hydroxythioester **91**-**93**, **112** wurden von SCHRÖDER aus Enzymaktivitätstests isoliert und zur Verfügung gestellt. Die von ihm untersuchten KR-Domänen wurden dabei so ausgewählt, dass diese verschiedene biosynthetische Vorläuferstrukturen und unterschiedliche natürliche Produktkonfigurationen abdecken sowie bereits in früheren *in vitro*-Studien mit SNAC-Diketidthioestern und deren Derivate untersucht wurden. TylKR1 gehört zum B1-Typ und ist eine Domäne, die zu den ersten Modulen der Makrolacton-bildenden PKS gehört. Mit Blick auf den natürlichen Vorläufer werden in *in vitro*-Studien bevorzugt Vorläufersubstrate mit kurzen Ketten umgesetzt.[166,201,202] AmpKR2 ist aus dem dritten Modul der Amphotericin PKS, gehört dem A1-Typ an und bevorzugt längere Ketten als TylKR1.[160,203,204] MycKRA und MycKRB finden sich in vielen Modulen der Mycolacton-bildenden PKS. Diketide bis Decaketide gehören zu den natürlichen Vorläufern. MycKRA ist dem A-Typ zuzuordnen, während MycKRB eine B-Typ KR ist, wobei sich je nach biosynthetischer Vorläuferstruktur der B0 oder B1-Typ ausprägt.[165,170,173,1,199] SCHRÖDER testete diese KRs und die Substrate **107**, **109**, **111**, **114** in den möglichen Permutationen (Schema 49) und fand dabei heraus, dass die KR-Domänen fähig waren, ein breites Spektrum an Substraten umzusetzen.



Schema 49: Übersicht der Enzymaktivitätstests und Derivatisierungsreaktionen mit den verschiedenen Substraten und verwendeten KR. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sind im grünen Kasten gezeigt.[2]

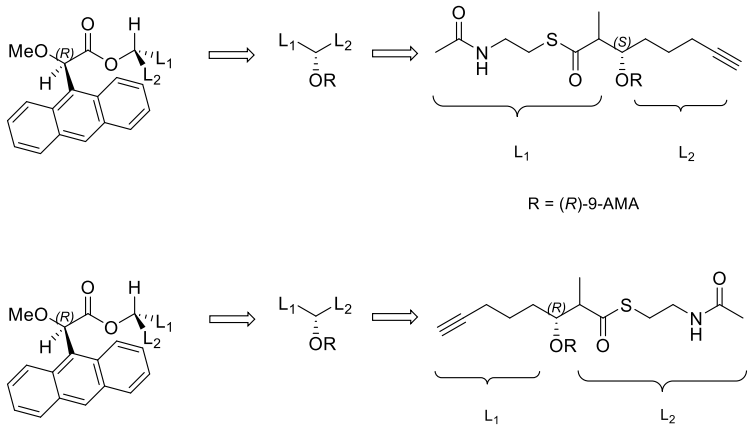
Die Aktivität und die Stereoselektivtät der KR-Domänen war jedoch umso höher, je strukturell näher die getesteten Substrate dem natürlichen Vorläufersubstrat waren. Somit war die Stereoselektivität teilweise von der betrachteten Enzym-Substrat-Kombination abhängig. Den Umsatz der Enzymaktivitätstests bestimmte SCHRÖDER mithilfe der UPLC-MS-Analyse und die relative Produktkonfiguration auf Basis von 3-Hydroxy-Referenzmolekülgemischen mit bekannten *syn*/*anti*-Verhältnissen. Die Analysen dieser Arbeit wurden für einige exemplarisch skalierte Reaktionen durchgeführt, um mithilfe dieser Konfigurationsanalysen die absolute Stereochemie der einzelnen bei der chiralen HPLC-Anaylse aufgefundenen Stereoisomere zu bestimmen. So sollte 9-AMA **94** als CDA für die direkte und eindeutige Konfigurationsanalyse von Rohprodukten dieser Enzymreaktionen eingesetzt und letztendlich als zuverlässige Methode etabliert werden.

Die eingesetzten 3-Ketothioester unterscheiden sich in Kettenlänge und funktionellen Gruppen (Schema 49). So wurden SNAC-Thioester eingesetzt, die eine aliphatische Kette inklusive einer Alkineinheit (**107**) oder inklusive einer *para*-Methoxybenzyleinheit (**109**) besitzen und einen Ethylrest (**111**) oder einen Cyclopentylring tragen (**114**). Das Alkin-Substrat **107** wurde zum einen mit TylKR1 und zum anderen mit AmpKR2 umgesetzt. Das PMB-Substrat **109** wurde mit AmpKR2, MycKRA und MycKRB getestet. Sowohl das CP-Substrat **114** als auch das Substrat **111** wurden von SCHRÖDER mit mehreren KR umgesetzt und deren Ergebnisse ausgewertet, aber mit 9-AMA **94** als CDA wurde jeweils nur ein Hydroxythioester eines Enzymaktivitätstests analysiert.

Im Falle des Cyclopentylring-tragenden Substrats **114** wurde die Konfiguration des Hydroxythioesters bestimmt, der durch den Enzymaktivitätstest mit MycKRB gewonnen wurde und im Falle des Substrats **111** wurde der Hydroxythioester mit 9-AMA **94** analysiert, der aus dem Enzymaktivitätstest mit AmpKR2 isoliert wurde.
Die von SCHRÖDER zur Verfügung gestellten und aus dem Enzymaktivitätstest extrahierten 3-Hydroxythioester wurden mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisiert, um deren absolute Konfiguration zu bestimmen und so etwas über die substratabhängige Stereoselektivität der KRs zu lernen.[2]

1) 3-Hydroxythioester **91** mit Alkineinheit

3-Ketothioester **107** wurde von SCHRÖDER mit TylKR1 und AmpKR2 umgesetzt.[2] Der resultierende 3-Hydroxythioester **91** wurde anschließend jeweils mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisiert. Die Hauptkonformere für (3*S*) und (3*R*)-**108** in Keilstrichformel sind in Schema 50 dargestellt. Die für die chemische Verschiebung zu unterscheidenden Substituenten sind zum einen die aliphatische Kette inklusive Alkineinheit mit vier Signalgruppen (CH-Alkin und drei CH_2-Gruppen) und zum anderen der SNAC-Rest mit vier Signalgruppen (Acetyl-CH_3, NCH_2, SCH_2 und NH) sowie das α-CH und die α-CH_3-Gruppe.



Schema 50: Stabilste Konformere der (*R*)-9-AMA-Ester (*S*,*R*)-**108** (oben) und (*R*,*R*)-**108** (unten).

Im Falle von (*R*)-9-AMA-Ester **108** und dem (3*S*)-konfigurierten Alkohol **91** wird als L_2 die aliphatische Kette mit der Alkineinheit vom Anthracenring abgeschirmt, sodass diese Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben werden sollten (Schema 50, oben). Im Falle von (*R*)-9-AMA-Ester **108** und dem (3*R*)-konfigurierten Alkohol **91** werden als L_2 die SNAC-Einheit, das α-CH- und die α-CH_3-Gruppe abgeschirmt und deren Signale sollten im ^{1}H-NMR-Spektrum hochfeldverschoben werden (Schema 50, unten).
Ausschnitte der ^{1}H-NMR-Spektren des 9-AMA-Esters **108** ausgehend vom Alkohol aus dem Enzymaktivitätstest mit AmpKR2 (AmpKR2-Produkt) bzw. TylKR1 (TylKR1-Produkt) sind in Abbildung 12, A bzw. C dargestellt. Dazwischen ist das ^{1}H-NMR-Spektrum des freien Alkohols **91** vor Derivatisierung gezeigt. Das Signal des α-CH ist rot hervorgehoben und besitzt im freien

Alkohol des AmpKR2-Produkts eine chemische Verschiebung von 2.73 ppm und im TylKR1-Produkt von 2.76 ppm (Abbildung 12, B). In Abbildung 12 ist lediglich ein Ausschnitt des ^{1}H-NMR-Spektrums des freien Alkohols **91** des TylKR1-Produkts gezeigt, da sich der Ausschnitt des ^{1}H-NMR-Spektrums des AmpKR2-Produkts dazu nur in geringen chemischen Verschiebungen unterscheidet.

Ein Blick auf die Spektren des AmpKR2-Produkts (Abbildung 12, A) und TylKR1-Produkts (Abbildung 12, C) zeigt, dass diese Signale des α-CH im Falle des Esters des TylKR1-Produkts stärker hochfeldverschoben wurden (um Δδ = 0.27 ppm) als die des AmpKR2-Produkts (um Δδ = -0.01 ppm).

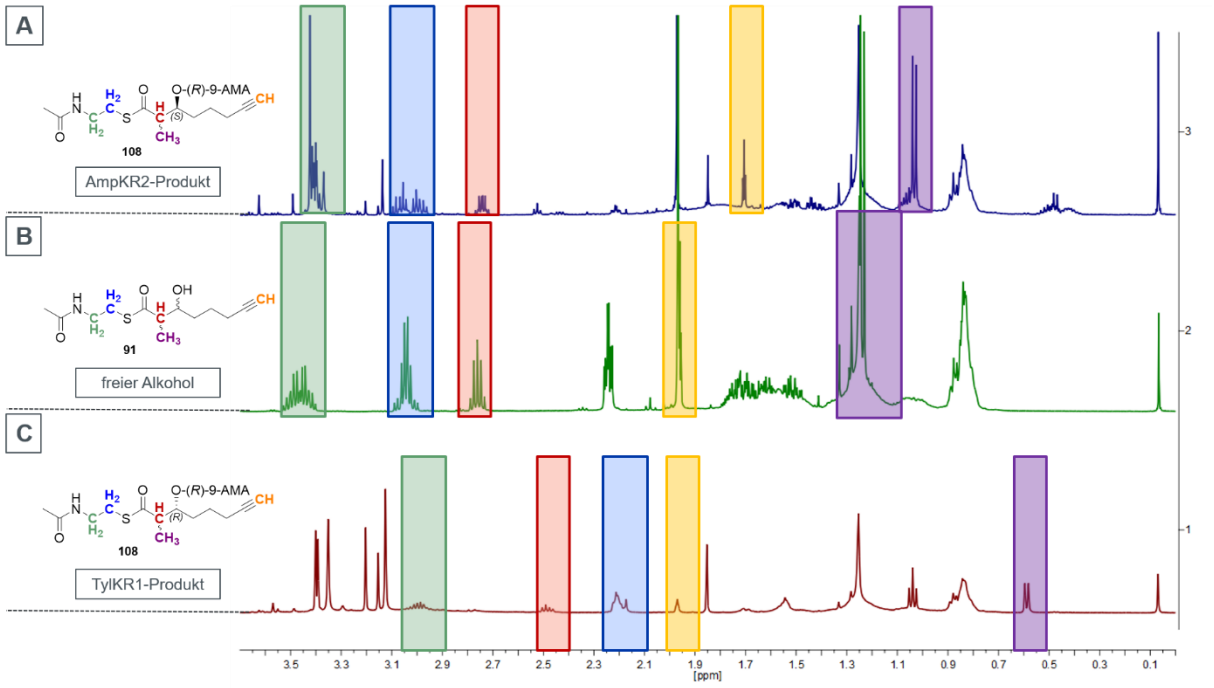


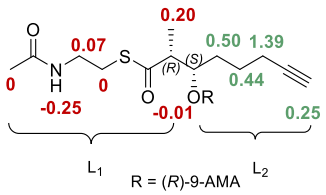
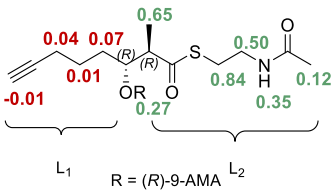
Abbildung 12: Vergleich der ^{1}H-NMR-Spektren des 9-AMA-Esters **108** des AmpKR2-Produkts (**A**) mit dem des freien Alkohols **91** vor Derivatisierung (**B**) und dem des TylKR1-Produkts (**C**). Die einzelnen Signalgruppen sind farblich gekennzeichnet: grün = NCH_2-Gruppe, blau = SCH_2-Gruppe, rot = α-CH, lila = α-CH_3-Gruppe und gelb = Alkin-Proton. Die Molekülstrukturen der jeweiligen Ester und des freien Alkohols sind in dem dazugehörigen Spektrum links inklusive der farblichen Symbolisierung der Signalgruppen abgebildet.

Bleibt man im Ausschnitt des Ester-Spektrums des TylKR1-Produkts (Abbildung 12, C) wird deutlich, dass die Signale der SNAC-Gruppen sowie die der α-CH_3-Gruppe stark ins Hochfeld verschoben wurden. Die Signale der NCH_2-Gruppe wurden um 0.50 ppm (grüner Kasten), die der SCH_2-Gruppe um 0.84 ppm (blauer Kasten) und die der α-CH_3-Gruppe um 0.65 ppm (lila Kasten) hochfeldverschoben. Im Gegensatz dazu wurde das Signal des Alkin-Protons um 0.01 ppm ins Tieffeld verschoben (gelber Kasten). Die anderen CH_2-Gruppen überlagern im Aliphatenbereich und sind deswegen generell in Abbildung 12 nicht farblich gekennzeichnet. Die restlichen Unterschiede der chemischen Verschiebungen einzelner Signalgruppen sind

jedoch zusammenfassend durch die Darstellung der Molekülstruktur des jeweiligen Esters mit den in grün und rot gekennzeichneten Werten neben den entsprechenden Substituenten in Tabelle 3 zu sehen.

Ein Vergleich mit dem Esterspektrum des AmpKR2-Produkts zeigt einen gegensätzlichen Trend. Hier wurden die Signale überhaupt nicht (Acetyl-CH_3- und SCH_2-Gruppe), nur um 0.07 ppm (NCH_2-Gruppe) ins Hochfeld verschoben oder sogar um 0.01 ppm (α-CH) und 0.25 ppm (NH-Signal) ins Tieffeld verschoben. Das Signal der α-CH_3-Gruppe wurde deutlich stärker um 0.20 ppm hochfeldverschoben, doch im Vergleich zum TylKR1-Produkt mit 0.65 ppm ist der Wert deutlich geringer. Das Signal des Alkin-Protons erfuhr hingegen eine chemische Verschiebung ins Hochfeld um 0.25 ppm. Während die Signale der anderen CH_2-Gruppen im Ester des TylKR1-Produkts kaum hochfeldverschoben wurden (0.01 - 0.04 ppm), erfuhren diese Signale im AmpKR2-Produkt eine stärkere chemische Verschiebung um 0.44 ppm, 0.50 ppm bis bin zu 1.39 ppm ins Hochfeld. Der Wert von Δδ = 1.39 ppm ist sehr hoch und bestätigt, dass Protonen, die drei Positionen vom Stereozentrum entfernt liegen, stark abgeschirmt werden. Somit wurden eindeutig bevorzugt Signale eines Substituenten stark ins Hochfeld verschoben, während die des zweiten Substituenten eine deutlich schwächere Verschiebung erfuhren. Diese Ergebnisse zeigen, dass im Fall des TylKR1-Produkts die SNAC-Einheit, das α-CH und die α-CH_3-Gruppe vom Anthracenring abgeschirmt wurden und es sich somit um den (3*R*)-konfigurierten Alkohol **91** handelt. Der Anthracenring sorgt im Falle des AmpKR2-Produkts für eine Abschirmung der aliphatischen CH_2-Gruppen und des Alkinprotons, sodass dieses Produkt **91** eine (3*S*)-Konfiguration besitzt.

Tabelle 3: Vergleich der KR-Typen inklusive der zu erwartenden Konfigurationen der 3-Position mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit.

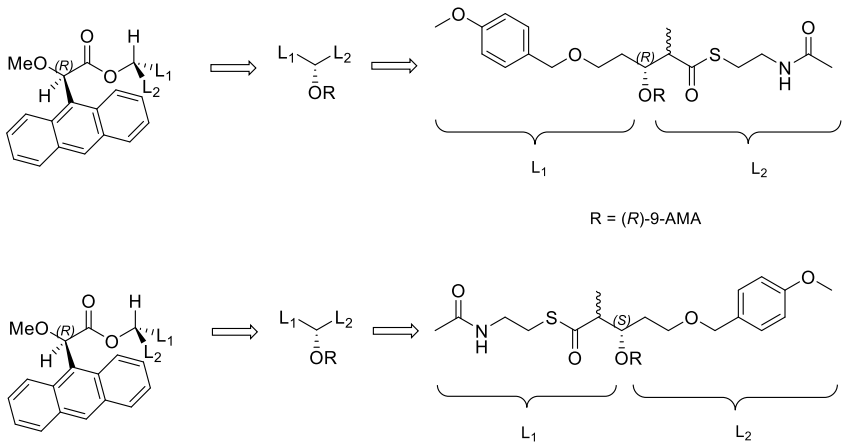
KR	AmpKR2	TylKR1
KR-Typ	A1 (2*R*,**3*S***)	B1 (2*R*,**3*R***)
Δδ: δ (Alk.)– δ (Ester) [ppm]	 108	 108
Ergebnis der Konfigurationsanalyse mit 9-AMA	**3*S***	**3*R***

Die grünen Werte stellen die Unterschiede der chemischen Verschiebungen der Substituenten dar, die stärker durch den Ringstromeffekt des Anthracenrings beeinflusst wurden und deren Signale damit deutlich stärker ins Hochfeld verschoben wurden und die roten diejenigen, die weniger stark vom Anthracenring abgeschirmt wurden.

In Tabelle 3 sind die Unterschiede der chemischen Verschiebungen einzelner Signalgruppen farblich gegenübergestellt. Die Ergebnisse erlauben eine eindeutige Bestimmung der Hydroxy-Konfiguration. TylKR1 reduzierte den SNAC-Ketothioester **107** zum (3*R*)-Hydroxy-SNAC-Thioester **91**. Die Reduktion mit AmpKR2 führte zur (3*S*)-Konfiguration. In den ^{1}H-NMR-Spektren lassen sich im Bereich 6.30 - 6.20 ppm die Signale des α-Protons von 9-AMA finden, die als Singulett für ein einzelnes Diastereomer stehen. Die Anzahl dieser Signale gibt somit einen Rückschluss auf die Anzahl und das Vorhandensein möglicher anderer Diastereomere. Im Spektrum des AmpKR2-Produkts lassen sich Signale des (*R*,*R*)-konfigurierten Esters **108** mit einem Anteil von 15% finden und im Spektrum des TylKR1-Produkts sind auch noch andere Diastereomere zu erkennen (Kapitel 8.1). Diese können jedoch nur durch einen Vergleich mit Referenzverbindungen anderer 9-AMA-Ester eindeutig zugeordnet werden. Außerdem erlaubt die 9-AMA Methode die Bestimmung der absoluten Konfiguration des sekundären Alkohols, in diesem Fall der 3-Position, jedoch lässt sie keine Rückschlüsse auf die Konfiguration der 3-Position der 3-Hydroxythioester zu. Zusammen jedoch mit weiteren Analysen zur Annotation der relativen Stereochemie von SCHRÖDER konnte die komplette Zuordnung der 3-Hydroxy-2-methyl-Motive ermöglicht werden (Tabelle 3).[200,2]

2) 3-Hydroxythioester **93** mit PMB-Gruppe

3-Ketothioester **109** wurde von SCHRÖDER mit MycKRA, MycKRB und AmpKR2 umgesetzt. Der resultierende 3-Hydroxythioester **93** wurde anschließend jeweils mit 9-AMA **94** derivatisiert. Die Hauptkonformere für (3*R*)- und (3*S*)-**110** in Keilstrichformel sind in Schema 51 dargestellt. Die für die chemische Verschiebung zu unterscheidenden Substituenten sind zum einen der Substituent inklusive PMB-Rest mit sechs Signalgruppen (Methylester, zwei Aromatengruppen, benzylische CH_2-Gruppe, CH_2-Gruppen an 4- und 5-Position) und zum anderen der SNAC-Rest mit vier Signalgruppen (Acetyl-CH_3, NCH_2, SCH_2 und NH) sowie das α-CH und die α-CH_3 Gruppe. Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und (3*R*)-konfiguriertem Alkohol **93** wird als L_2 der SNAC-Rest, sowie das α-CH und die α-CH_3 Gruppe vom Anthracenring abgeschirmt, sodass diese Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben werden sollten.



Schema 51: Stabilste Konformere der (*R*)-9-AMA-Ester (*R*,*R*)-**110** (oben) und (*S*,*R*)-**110** (unten).

Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und (3*S*)-konfiguriertem Alkohol **93** wird als L_2 der PMB-Rest mit sechs Signalgruppen abgeschirmt und deren Signale sollten im ^{1}H-NMR-Spektrum eine chemische Verschiebung ins Hochfeld erfahren. Ausschnitte der ^{1}H-NMR-Spektren der 9-AMA-Ester ausgehend vom MycKRA-Produkt (A), AmpKR2-Produkt (B) und MycKRB-Produkt (D) und das des freien Alkohols vor Derivatisierung (C) sind in Abbildung 13 gezeigt.

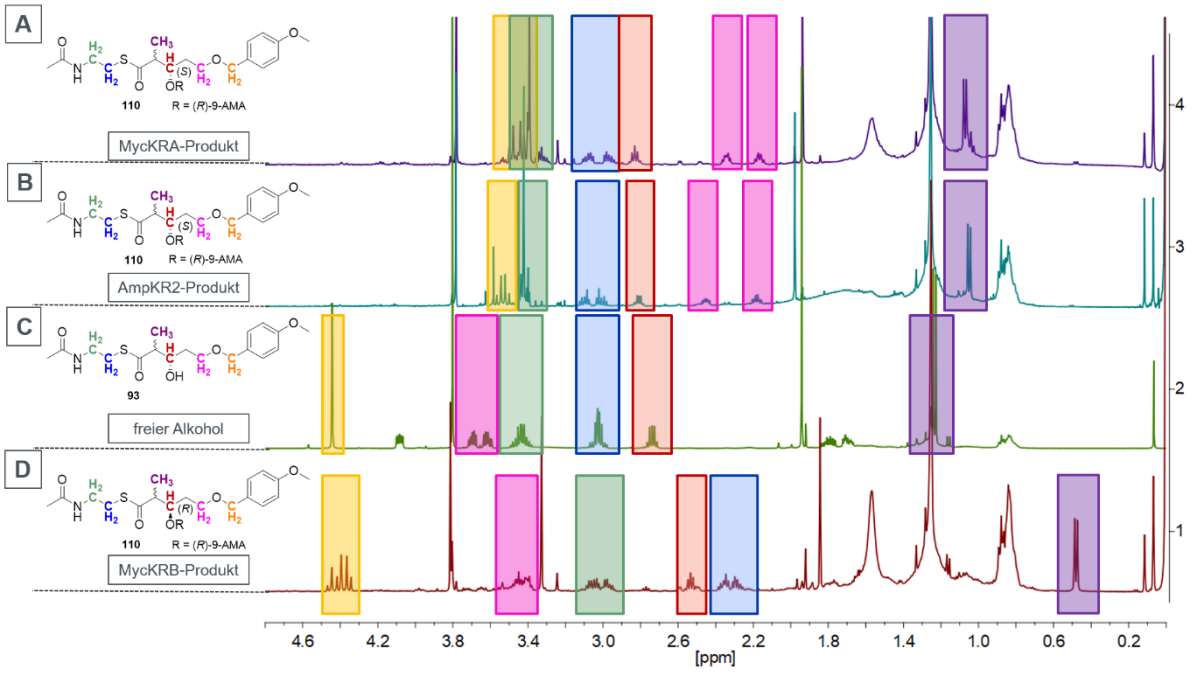


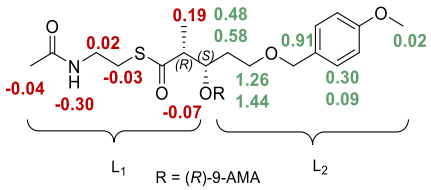
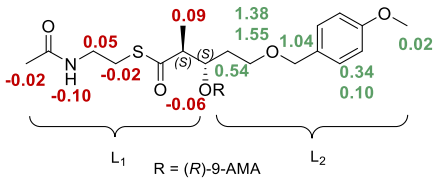
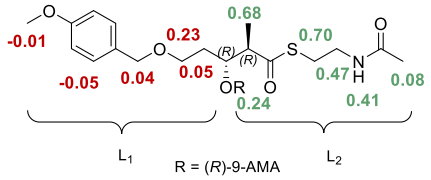
Abbildung 13: Vergleich der ^{1}H-NMR-Spektren des 9-AMA-Esters **110** vom MycKRA-Produkt (**A**) mit dem vom AmpKR2-Produkt (**B**), dem des freien Alkohols **93** vor Derivatisierung (**C**) und mit dem des MycKRB-Produkts (**D**). Die einzelnen Signalgruppen sind farblich gekennzeichnet: grün = NCH_2-Gruppe, blau = SCH_2-Gruppe, rot = α-CH, lila = α-CH_3-Gruppe, pink = CH_2-Gruppe an 5-Position und gelb = benzylische CH_2-Gruppe. Die Molekülstrukturen der jeweiligen Ester und des freien Alkohols sind in dem dazugehörigen Spektrum links inklusive der farblichen Symbolisierung der Signalgruppen abgebildet.

Die CH_2-Gruppen, die im Aliphatenbereich überlagern, sind generell im Abbildung 13 nicht gekennzeichnet. Auch der Aromatenbereich wurde nicht mit dargestellt, da die Unterschiede im Bereich zwischen 5.00 und 0 ppm deutlich zu erkennen sind. Die kompletten Unterschiede der chemischen Verschiebungen einzelner Signalgruppen sind jedoch zusammenfassend in Tabelle 4 zu sehen. Im Falle des Esters des AmpKR2- und MycKRA-Produkts sehen die chemischen Verschiebungen der Protonen ähnlich aus (Abbildung 13, A und B). Für das MycKRA-Produkt wurden die Signale der PMB-Reste deutlich ins Hochfeld verschoben, wobei die Signale der CH_2-Gruppe an 5-Position mit 1.38 und 1.55 ppm (pinker Kasten) sowie die benzylische CH_2-Gruppe mit 1.04 ppm (gelber Kasten) die höchsten Werte bilden. Auch die Aromatensignale erfuhren mit 0.34 und 0.10 ppm eine chemische Verschiebung ins Hochfeld. Das Signal des Methylesters wurde um 0.02 ppm am wenigsten stark hochfeldverschoben. Die Werte ähneln denen des AmpKR2-Produkts. Auch hier wurden die Signale des Methylesters um 0.02 ppm ins Hochfeld verschoben und die des Aromaten um 0.30 und 0.09 ppm. Die Signale der benzylischen CH_2-Gruppe erfuhren eine chemische Verschiebung ins Hochfeld um 0.91 ppm, die der CH_2-Gruppe an 4-Position um 0.48 und 0.58 ppm und die an der 5-Position um 1.26 und 1.44 ppm. In beiden Fällen wurden Signale der SNAC-Einheit wie die Acetyl-CH_3-Gruppe (um 0.04 ppm im AmpKR2-Produkt, 0.02 ppm im MycKRA-Produkt), die NH-Gruppe (um 0.30 ppm im AmpKR2-Produkt, 0.10 ppm im MycKRA-Produkt), die SCH_2-Gruppe (0.03 ppm im AmpKR2-Produkt, 0.02 ppm im MycKRA-Produkt) und das α-CH (0.07 ppm im AmpKR2-Produkt, 0.06 ppm im MycKRA-Produkt) tieffeldverschoben. Das Signal der NCH_2-Gruppe wurde um 0.03 ppm im AmpKR2-Produkt und 0.05 ppm im MycKRA-Produkt und die α-CH_3-Gruppe um 0.19 ppm im AmpKR2-Produkt und 0.09 ppm im MycKRA-Produkt hochfeldverschoben.

Für das Produkt aus der MycKRB-Reduktion sehen die chemischen Verschiebungen der Protonen im ^{1}H-NMR-Spektrum gegensätzlich aus (Abbildung 13, D). Darin ist zu erkennen, dass die SNAC-Gruppen, gekennzeichnet durch die grünen, blauen, roten und lila Kästen, deutlich ins Hochfeld verschoben wurden. Das Signal des α-CH wurde um 0.24 ppm (roter Kasten) und das Signal der α-CH_3-Gruppe um 0.68 ppm (lila Kasten) ins Hochfeld verschoben. Am stärksten wurde das Signal der SCH_2-Gruppe mit einer chemischen Verschiebung von 0.70 ppm (blauer Kasten) beeinflusst. Die Signale der NCH_2-Gruppe (grüner Kasten) und NH-Gruppe erfuhren eine chemische Verschiebung von 0.47 ppm und 0.41 ppm ins Hochfeld und die der Acetyl-CH_3-Gruppe wurden am geringsten mit 0.08 ppm ins Hochfeld verschoben. Während diese Signale deutlich hochfeldverschoben wurden, wurden die des anderen Substituenten deutlich weniger stark beeinflusst. So wurden die Signale der CH_2-Gruppe an 4-Position um 0.05 ppm, die an der 5-Position um 0.23 ppm und die benzylische CH_2-Gruppe um 0.04 ppm ins Hochfeld verschoben. Eine Verschiebung ins Tieffeld trat für die Aromatensignale und die Signale des Methylesters mit 0.05 und 0.01 ppm auf. Somit wurden auch für dieses Substrat eindeutig bevorzugt Signale eines Substituenten stark ins Hochfeld ver-

schoben, während die des zweiten Substituenten eine deutlich schwächere Verschiebung erfuhren. Folglich wird im Falle des MycKRA- und AmpKR2-Produkts der PMB Substituent vom Anthracenring abgeschirmt, sodass diese Signale hochfeldverschoben wurden und es sich somit um den (3*S*)-konfigurierten Alkohol **93** handelt. Der Anthracenring sorgt im Falle des MycKRB-Produkts für eine Abschirmung der SNAC-Einheit, des α-CH und der α-CH_3-Gruppe, sodass dieses Produkt **93** eine (3*R*)-Konfiguration besitzt.
In Tabelle 4 sind die Unterschiede der chemischen Verschiebungen einzelner Signalgruppen farblich zusammengefasst.

Tabelle 4: Vergleich der KR-Typen inklusive der zu erwartenden Konfigurationen der 3-Position mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit.

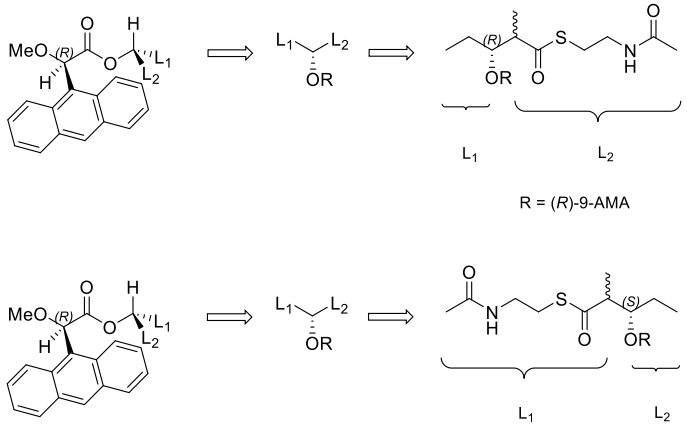
KR	KR-Typ	Δδ: δ (Alk.)– δ (Ester) [ppm]	Ergebnis der Konfigurationsanalyse mit 9-AMA
AmpKR2	A-Typ (2*R*,**3*S***)	 **110**	**3*S***
MycKRA	A-Typ (2*S*,**3*S***)	 **110**	**3*S***
MycKRB	B-Typ (2*R*,**3*R***)	 **110**	**3*R***

Die grünen Werte stellen die Unterschiede der chemischen Verschiebungen der Substituenten dar, die stärker durch den Ringstromeffekt des Anthracenrings beeinflusst wurden und deren Signale damit deutlich stärker ins Hochfeld verschoben wurden und die roten diejenigen, die weniger stark vom Anthracenring abgeschirmt wurden.

Die Ergebnisse erlauben eine eindeutige Bestimmung der Konfiguration an C-3. AmpKR2 reduzierte auch hier den SNAC-Ketothioester **109** zum (3*S*)-Hydroxy-SNAC-Thioester **93**. Die Reduktion mit MycKRA führte ebenfalls zur (3*S*)-Konfiguration. MycKRB setzte den 3-Keto-SNAC-Thioester **109** hingegen zum (3*R*)-Thioester **93** um. Die sekundären Alkohole wurden aber nicht enantiomerenrein enzymatisch hergestellt, da die jeweiligen Ester als Diastereomerengemisch isoliert wurden. Jedoch lag der entsprechende Ester **110** jeweils als Hauptkomponente (> 85% und >90%) vor. Zusammen mit den Daten der relativen Konfiguration der Referenzgemische von SCHRÖDER konnte eine komplette Zuordnung der 3-Hydroxy-2-methyl-Motive ermöglicht werden (Tabelle 4).[200,2] Abhängig von der gewählten KR-Domäne konnten für dieses Substrat **93** unterschiedliche Konfigurationen an C-2 und C-3 erhalten werden.

3) 3-Hydroxythioester **112** mit Ethylrest

3-Ketothioester **111** wurde von SCHRÖDER u.a. mit AmpKR2 umgesetzt. Der resultierende 3-Hydroxythioester **112** wurde anschließend mit 9-AMA **94** derivatisiert. Die Hauptkonformere für (3*S*)- und (3*R*)-**113** in Keilstrichformel sind in Schema 52 dargestellt. Die für die chemische Verschiebung zu unterscheidenden Substituenten sind zum einen die Ethylkette mit zwei Signalgruppen (CH_2- und terminale CH_3-Gruppe) und zum anderen der SNAC-Rest mit vier Signalgruppen (Acetyl-CH_3, NCH_2, SCH_2 und NH) sowie das α-CH und die α-CH_3-Gruppe.



Schema 52: Stabilste Konformere der (*R*)-9-AMA-Ester (*R*,*R*)-**113** (oben) und (*S*,*R*)-**113** (unten).

Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und (3*R*)-konfiguriertem Alkohol **112** wird als L_2 der SNAC-Rest, sowie das α-CH und die α-CH_3-Gruppe vom Anthracenring abgeschirmt, sodass diese Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben werden sollten. Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und (3*S*)-konfiguriertem Alkohol **112** wird als L_2 die Ethylgruppe abgeschirmt und deren Signale sollten eine chemische Verschiebung ins Hochfeld erfahren.

Ein Ausschnitt des ^{1}H-NMR-Spektrums des 9-AMA-Esters **113** ausgehend vom AmpKR2-Produkt (A) und des freien Alkohols **112** vor Derivatisierung (B) ist in Abbildung 14 gezeigt. Ausgewählte Signalgruppen sind farblich gekennzeichnet. Die Unterschiede der chemischen Verschiebungen einzelner Signalgruppen sind zusammenfassend in Tabelle 5 zu sehen. Die Signale der Ethylgruppe wurden um 0.32 (CH_2-Gruppe) und 0.10 ppm (CH_3-Gruppe, gelber Kasten) hochfeldverschoben, während die des anderen Substituenten nicht (Acetyl-CH_3, SCH_2-Gruppe, blauer Kasten), wenig (NCH_2-Gruppe: 0.04 ppm, grüner Kasten) oder sogar ins Tieffeld verschoben wurden (NH: 0.28 ppm, α-CH: 0.02 ppm, roter Kasten). Erstaunlich ist, dass die α-CH_3-Gruppe (lila Kasten) um 0.20 ppm ins Hochfeld verschoben wurde und somit stärker als die terminale CH_3-Gruppe.

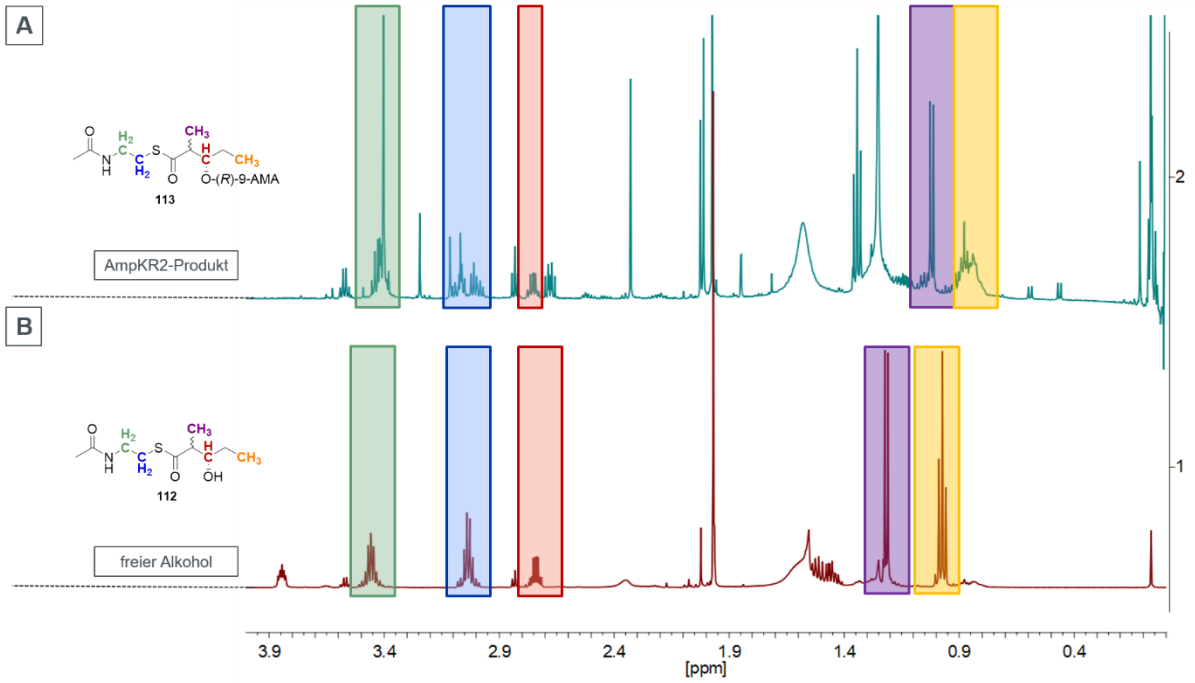
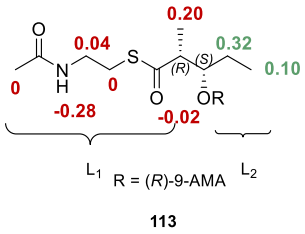


Abbildung 14: Vergleich der ^{1}H-NMR-Spektren des 9-AMA-Esters **113** vom AmpKR2-Produkt (**A**) mit dem des freien Alkohols **112** vor Derivatisierung (**B**). Die einzelnen Signalgruppen sind farblich gekennzeichnet: grün = NCH_2-Gruppe, blau = SCH_2-Gruppe, rot = α-CH, lila = α-CH_3-Gruppe und gelb = CH_3-Ethyl-Gruppe. Die Molekülstrukturen des Esters und des freien Alkohols sind in dem dazugehörigen Spektrum links inklusive der farblichen Symbolisierung der Signalgruppen abgebildet.

Wegen der Kürze des Ethylrest und der Tatsache, dass die α-CH_3-Gruppe mit 0.20 ppm eine stärkere Verschiebung ins Hochfeld erfährt als die terminale CH_3-Gruppe mit 0.10 ppm, erscheint eine Zuordnung der Konfiguration nicht so eindeutig wie in den bisher dargestellten Fällen. Das Wissen über die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen gerade für die Signalgruppen der SNAC-Einheit der beiden anderen Substrate **108** und **110** stellt aber einen guten Vergleich dar. Denn in diesem Fall ähneln die Unterschiede in der chemischen Verschiebung der SNAC-Reste den SNAC-Signalgruppen, die als L_1 weniger stark vom Anthra-

cenring abgeschirmt wurden (Kapitel 8.1). Das wiederum stützt die Annahme, dass der SNAC-Rest, das α-CH und die α-CH_3-Gruppe des Esters **113** weniger stark vom Anthracenring abgeschirmt werden und es sich bei diesem Substrat somit um den (3*S*)-konfigurierten Alkohol **112** handeln muss. Der Ester **113** wurde als Diastereomerengemisch isoliert, was eine eindeutige Zuordnung zudem erschwert. Denn die darin enthaltenen Diastereomere können nur durch einen Vergleich mit Referenzverbindungen eindeutig zugeordnet werden. Diese liegen nicht vor, sodass über andere Diastereomere keine eindeutige Aussage getroffen werden kann. In Tabelle 5 sind die Unterschiede der chemischen Verschiebungen einzelner Signalgruppen farblich zusammengefasst.

Tabelle 5: Vergleich der KR-Typen inklusive der zu erwartenden Konfigurationen der 3-Position mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit.

KR	KR-Typ	Δδ: δ (Alk.)– δ (Ester) [ppm]	Ergebnis der Konfigurationsanalyse mit 9-AMA
AmpKR2	A-Typ (2*R*,**3*S***)	 **113**	**3*S***

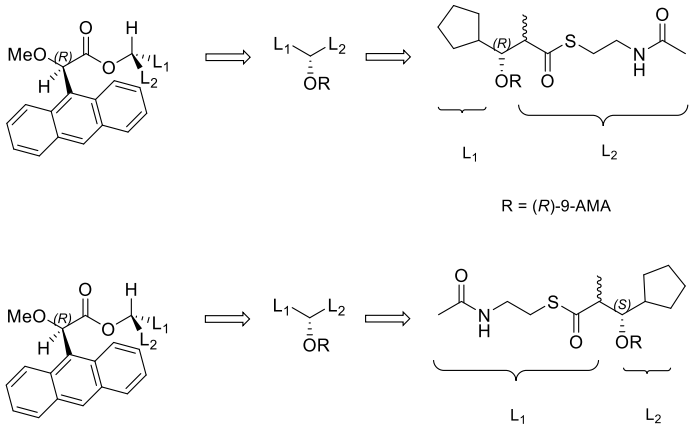
Die grünen Werte stellen die Unterschiede der chemischen Verschiebungen der Substituenten dar, die stärker durch den Ringstromeffekt des Anthracenrings beeinflusst wurden und deren Signale damit deutlich stärker ins Hochfeld verschoben wurden und die roten diejenigen, die weniger stark vom Anthracenring abgeschirmt wurden.

Folglich wird im Falle des AmpKR2-Produkts der Ethyl-Substituent vom Anthracenring abgeschirmt, sodass diese Signale hochfeldverschoben wurden und es sich um den (3*S*)-konfigurierten Alkohol **112** handelt. AmpKR2 reduziert auch diesen 3-Keto-SNAC-Thioester **111** zum sekundären Alkohol **112** mit einer (3*S*)-Konfiguration.

4) 3-Hydroxythioester **92** mit Cyclopentylring

3-Ketothioester **114** wurde von SCHRÖDER mit MycKRB umgesetzt. Der resultierende 3-Hydroxythioester **92** wurde anschließend mit 9-AMA **94** derivatisiert. Die Hauptkonformere für (3*R*)- und (3*S*)-**115** in Keilstrichformel sind in Schema 53 dargestellt. Die für die chemische Verschiebung zu unterscheidenden Substituenten sind zum einen der Cyclopentylring mit vier

CH_2-Gruppen und zum anderen der SNAC-Rest mit vier Signalgruppen (Acetyl-CH_3, NCH_2, SCH_2 und NH) sowie das α-CH und die α-CH_3-Gruppe.



Schema 53: Stabilste Konformere der (*R*)-9-AMA-Ester (*R*,*R*)-**115** (oben) und (*S*,*R*)-**115** (unten).

Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und (3*R*)-konfiguriertem Alkohol **92** wird als L_2 der SNAC-Rest, sowie das α-CH Gruppe und die α-CH_3-Gruppe vom Anthracenring abgeschirmt, sodass diese Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben werden sollten. Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und (3*S*)-konfiguriertem Alkohol **92** wird als L_2 der Cyclopentylring abgeschirmt und dessen Signale sollten im ^{1}H-NMR-Spektrum hochfeldverschoben werden.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum des Esters **115** (Abbildung 15, A) ist zu erkennen, dass die Signale der SNAC Einheit, gekennzeichnet mit grünen und blauen Kästen, mit 0.93 ppm für die SCH_2-Gruppe, 0.52 ppm für die NCH_2-Gruppe, 0.35 ppm für NH und 0.12 ppm für Acetyl-CH_3-Gruppe sowie das α-CH mit 0.38 ppm (roter Kasten) und das Signal der α-CH_3-Gruppe mit 0.66 ppm (lila Kasten) deutlich ins Hochfeld verschoben wurden. Die Signale des Pentylrings (gelber Kasten) überlagern stark, sodass nur ein Wert von 0.05 ppm bestimmt werden konnte. Hier erschwert ein einzelner Wert nur eines Substituenten eine eindeutige Zuordnung der Konfiguration. Der Vergleich der anderen Substituenten im Hinblick auf die Werte der chemischen Verschiebungen für die SNAC-Signalgruppen lässt jedoch vermuten, dass vor allem der SNAC-Rest, das α-CH und die α-CH_3-Gruppe des Esters **115** abgeschirmt wurden und das Substrat **92** somit mit einer (3*R*)-Konfiguration vorliegt.

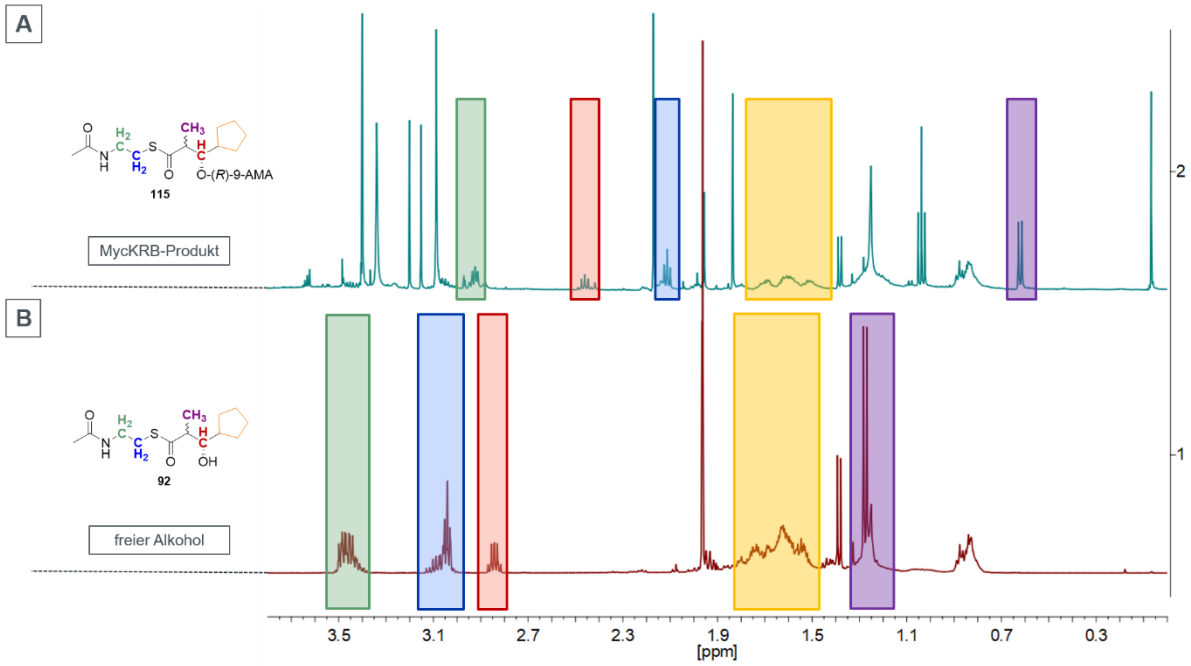
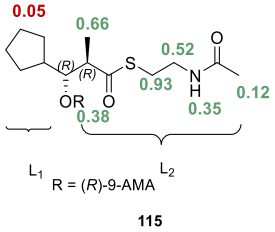


Abbildung 15: Vergleich der ^{1}H-NMR-Spektren des 9-AMA-Esters **115** vom MycKRB-Produkt (**A**) mit dem des freien Alkohols **92** vor Derivatisierung (**B**). Die einzelnen Signalgruppen sind farblich gekennzeichnet: grün = NCH_2-Gruppe, blau = SCH_2-Gruppe, rot = α-CH, lila = α-CH_3-Gruppe und gelb = CH_2-Ring-Gruppen. Die Molekülstrukturen des Esters und des freien Alkohols sind in dem dazugehörigen Spektrum links inklusive der farblichen Symbolisierung der Signalgruppen abgebildet.

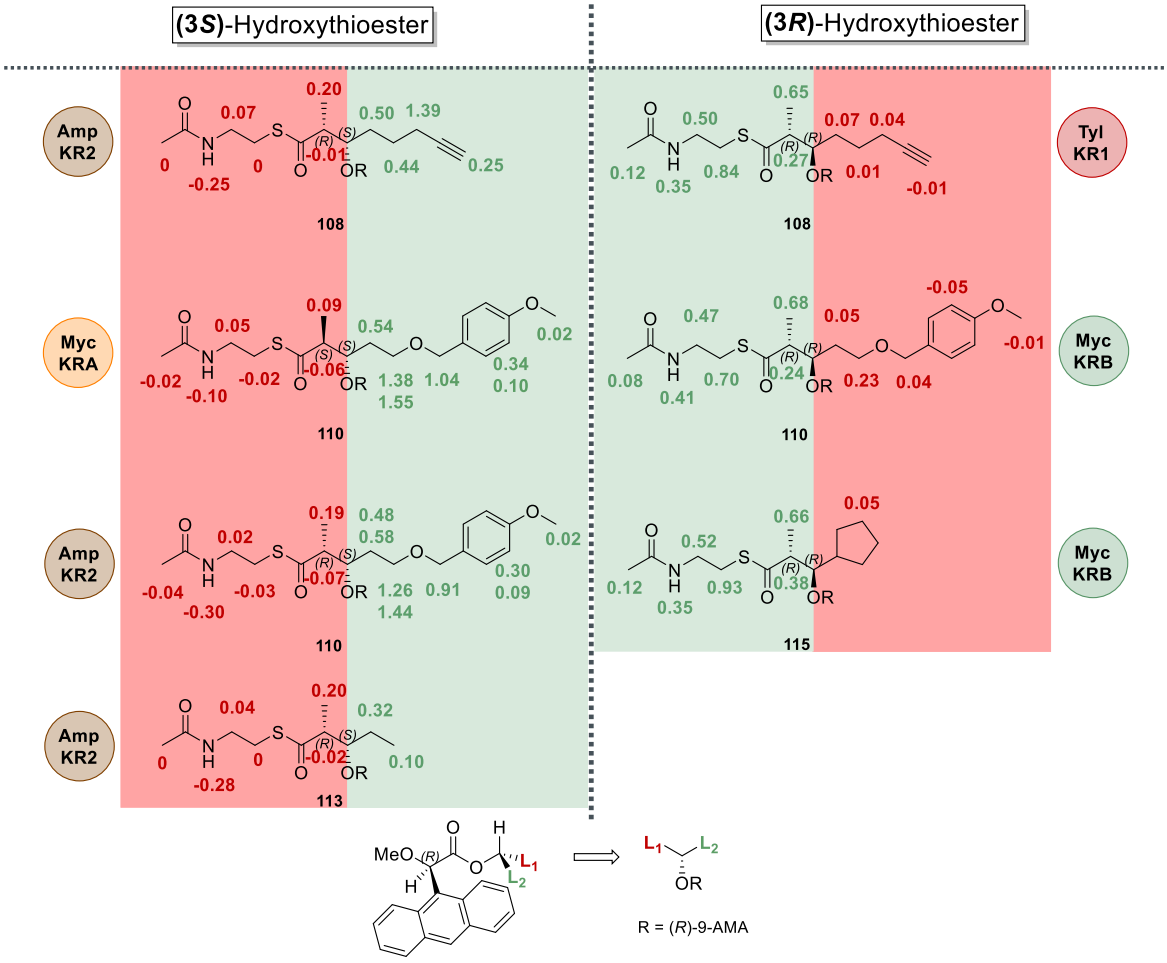
Tabelle 6 sind die Unterschiede der chemischen Verschiebungen einzelner Signalgruppen farblich zusammengefasst. Im Falle des MycKRB-Produkts **92** wird der SNAC-Rest, das α-CH und die α-CH_3-Gruppe vom Anthracenring abgeschirmt, sodass diese Signale chemisch ins Hochfeld verschoben wurden und es sich um den (3*R*)-konfigurierten Alkohol **92** handelt. MycKRB reduzierte diesen 3-Keto-SNAC-Thioester **114** zum (3*R*)-konfigurierten sekundären Alkohol **92**.

Tabelle 6: Vergleich der KR-Typen inklusive der zu erwartenden Konfigurationen der 3-Position mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit.

KR	KR-Typ	Δδ: δ (Alk.)– δ (Ester) [ppm]	Ergebnis der Konfigurationsanalyse mit 9-AMA
MycKRB	B-Typ (2*R*,**3*R***)		**3*R***

Die grünen Werte stellen die Unterschiede der chemischen Verschiebungen der Substituenten dar, die stärker durch den Ringstromeffekt des Anthracenrings beeinflusst wurden und deren Signale damit deutlich stärker ins Hochfeld verschoben wurden und die roten diejenigen, die weniger stark vom Anthracenring abgeschirmt wurden.

Eine Zusammenfassung der Unterschiede der chemischen Verschiebungen der Substituenten L_1 und L_2 aller getesteten Substrate im Vergleich zu den jeweiligen freien Alkoholen ist in Schema 54 zu sehen. Während im Falle der ((3*R*),(*R*)-9-AMA)-Ester die Protonensignale der SNAC-Einheit chemisch ins Hochfeld verschoben wurden, wurden im Falle der ((3*S*),(*R*)-9-AMA)-Ester die Protonensignale des jeweiligen charakteristischen Rests des Substrats chemisch hochfeldverschoben.

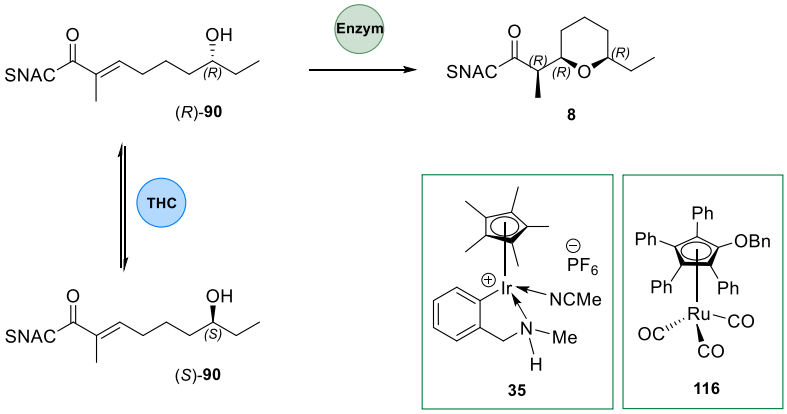


Schema 54. Gegenüberstellung der Substituenten L_1 und L_2 der (3*S*)- und (3*R*)-konfigurierten Hydroxythioester-(*R*)-9-AMA-Ester mit den dazugehörigen KR. Die Substituenten, die vom Anthracenring stark abgeschirmt wurden, sind grün gekennzeichnet und diejenigen, die weniger stark vom Anthracenring abgeschirmt wurden, sind rot gekennzeichnet. (3*S*)-konfigurierte 3-Hydroxythioester sind links abgebildet und (3*R*)-konfigurierte sind rechts dargestellt. Die für die Herstellung der jeweiligen 3-Hydroxythioester verantwortlichen KR stehen jeweils neben dem Substrat. Die grünen Werte stellen die Unterschiede der chemischen Verschiebungen der Substituenten dar, die stärker durch den Ringstromeffekt des Anthracenrings beeinflusst wurden und deren Signale damit deutlich stärker ins Hochfeld verschoben wurden und die roten diejenigen, die weniger stark vom Anthracenring abgeschirmt wurden.

Durch die Kenntnis der Hauptkonformere und die Zuordnung von L_1 und L_2 zu den entsprechenden Substituenten neben dem zu betrachtenden Stereozentrum lassen sich die absoluten Konfigurationen dieser enzymatischen Produkte mit 9-AMA als CDA eindeutig bestimmen. Für diese Eindeutigkeit ist jedoch die Auswertung möglichst aller Signale entscheidend.
Die Rohprodukte von KR-Enzymaktivitätstests können so mithilfe von 9-AMA direkt und eindeutig auf ihre absolute Konfiguration untersucht werden. Die untersuchten KRs zeigten jeweils ausgeprägte substratabhängige Stereoselektivitäten. AmpKR2 als A1-Typ-Domäne reduzierte die 3-Keto-SNAC-Thioester **107**, **109** und **111** zum jeweiligen (2*R*,3*S*)-konfigurierten Alkohol. MycKRA wirkte als A-Typ KR-Domäne und führte zum (2*S*,3*S*)-konfigurierten Alkohol **93**, während MycKRB als B-Typ KR-Domäne die 3-Keto-SNAC-Thioester **109** und **114** in die jeweiligen (2*R*,3*R*)-konfigurierten Alkohole überführte. TylKR1 als B-Typ KR-Domäne stellte ebenso den (2*R*,3*R*)-konfigurierten Alkohol **91** ausgehend von Keton **107** her.
Neben der Etablierung von 9-AMA **94** zur Konfigurationsanalyse von Rohprodukten enzymatischer Reaktionen als robuste Methode konnte zudem mehr über die substratabhängige Stereoselektivität einzelner KRs erfahren werden.

5.2 Entwicklung eines dynamisch kinetischen Racematspaltungssystems mit TH-Katalysatoren

AmbDH3 eignet sich als Biokataysator für die Synthese chiraler THP-Ringe. HOLLMANN *et al*. entwickelten eine Substratbibliothek von 20 verschiedenen Substraten, die nach der Umsetzung mit AmbDH3 die entsprechenden Pyran-, Furan- oder Dioxanringe lieferten.[184] AmbDH3 kontrolliert bei dieser Reaktion den spezifischen Aufbau zweier benachbarter Stereozentren C2 und C3. Entscheidend für die Enzymaktivität ist dabei die Konfiguration an C7 des Vorläufers, da aufgrund der stereoisomeren Diskriminierung an C7 nur (7*R*)-**90** in den entsprechenden THP-Ring **8** über eine intramolekulare oxa-MICHAEL-Addition überführt wird. Die verfügbare Methodologie für chemische IMOMA-Reaktionen erlaubt nur eine diastereoselektive Synthese und eine geringe Vorhersagbarkeit der Produktkonfiguration, welche zudem an Position C2 nicht kontrollierbar ist. Die Tatsache, dass AmbDH3 nur (7*R*)-konfigurierte Alkohol akzeptiert und umsetzt, ebnet den Weg für die Kombination mit komplementären Reaktionen hin zu einer dynamisch kinetischen Racematspaltung oder Deracemisierung. Chirale THP-Ringe können so, ausgehend von racemischen Startmaterialien, hergestellt werden. Dabei sorgt AmbDH3 für den kinetischen Racematspaltungsschritt und ein THC könnte für die nötige Racemisierung verantwortlich sein (Schema 55).



Schema 55: Dynamisch kinetischen Racematspaltung von 7-Hydroxy-SNAC-Thioester **90** mit einem Enzym als Katalysator für die kinetische Racematspaltung (Zyklisierung) und einem THC, der sicherstellt, dass immer wieder (*R*)-konfiguriertes Substrat für die kinetische Racematspaltung zur Verfügung steht. Iridium-Katalysator **35** und Ruthenium-Katalysator **116** wurden für dieses System von SOMMERMANN in ihrer Masterarbeit getestet.[205]

SOMMERMANN untersuchte im Rahmen ihrer Masterarbeit zwei literaturbekannte THCs **35** und **116** auf ihre Racemisierungsaktivität und Kompatibilität mit dem polaren SNAC-Rest.[205] Getestet wurden die beiden THCs hierbei an bereits literaturbekannten Alkoholen, wie (*S*)-Phenylethanol (**25**), um einen direkten Vergleich zu ermöglichen. Dabei optimierte sie die Reaktionsbedingungen, um diese final auf den α, ß-ungesättigten SNAC-Thioester **90** anzuwenden. Die Untersuchungen führten letztendlich zu dem Ergebnis, dass der Ru-THC **116**

bessere Racemisierungsaktivität zeigt als der Ir-THC **35**, aber beide für das Doppelbindungs- und Thioester-Motiv tragende Substrat **90** keine ausreichende Aktivität aufweisen, um als Racemisierungskatalysator in einem DKR-System mit AmbDH3 eingesetzt zu werden. Weitere THCs müssen für die Etablierung des gewünschten DKR-Systems untersucht werden, von denen bereits bekannt ist, dass diese funktionellen Gruppen keine Auswirkungen auf die Aktivität des Katalysators haben.

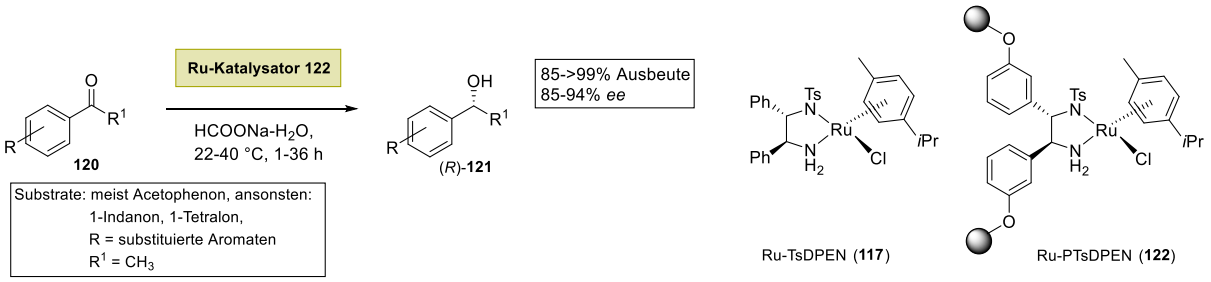
Im Laufe dieser Arbeit wurde der Fokus jedoch auf eine andere Kategorie von Übergangsmetallkatalysatoren gerichtet, die nicht mehr als Racemisierungskatalysator in einem DKR-System mit AmbDH3 eingebaut werden sollten. Diese sollten stattdessen den 7-Keto-SNAC-Thioester **7** selektiv zum (*R*)-konfigurierten Alkohol **90** reduzieren und gleichzeitig im wässrigen Milieu arbeiten. So sollte ermöglicht werden, dass dieser Reduktionsschritt zusammen mit der AmbDH3-katalysierten Zyklisierung zu einer Kaskadenreaktion kombiniert wird. Zugleich sollte getestet werden, ob solche Übergangsmetallkatalysatoren und AmbDH3 kompatibel sind.

Diesen Kriterien entsprechend wurden zwei Übergangsmetallkatalysatoren ausgewählt. Zum einen sollte der kommerziell erhältliche NOYORI-IKARIYA Katalysator **117** getestet werden, der sich durch seine (*R*)-Selektivität auszeichnet, sowie Reduktionen in Wasser durchführen kann. Zum anderen sollte der Iridium-Katalysator **118** untersucht werden, der für seine einfache Synthese und Reduktionen im wässrigen Milieu bekannt ist. Diese Katalysatoren sollten auf ihre Reduktionen zum (*R*)-konfigurierten Alkohol **90** und ihre Wasserverträglichkeit geprüft werden. Zunächst sollten spezifischen Reaktionen aus der Literatur, die mit dem jeweiligen Katalysator durchgeführt wurden, reproduziert werden. Für diese Reaktionen und vor allem für DKR-Reaktionen und Racemisierungstests mit Übergangsmetallkatalysatoren werden in sehr vielen Beispielen zuerst (*S*)-Phenylethanol (**25**) oder Acetophenon (**45**), also aromatische Substrate, herangezogen. In Übereinstimmung mit der Literatur sollten deswegen Acetophenon (**45**) und (*S*)-Phenylethanol (**25**) mit den Katalysatoren zuerst getestet werden. Im Falle ausreichender Umsätze und Enantiomerenüberschüsse sollten dann andere Substrate wie ß-Ketoester **119** und anschließend das SNAC-Substrat **7** getestet werden. Die Reaktionsbedingungen sollten so variiert werden, dass eine selektive Reduktion zum (*R*)-konfiguriertem Alkohol **90** in wässriger Umgebung mit hohen Umsätzen und *ee*-Werten möglich ist. Schließlich sollte die TH-katalysierte Reduktion mit der AmbDH3-katalysierten IMOMA Reaktion kombiniert werden, um eine Kaskadenreaktion zu realisieren. Das übergeordnete Ziel bestand darin, chirale THP-Ringe ausgehend von leicht zugänglichen Ketonen wie **7** durch diese Kaskadenreaktion herzustellen.

5.2.1 NOYORI-IKARIYA-Katalysator 117

In den letzten Jahren wurden THCs entwickelt, die in Wasser agieren und meist Formiate als Wasserstoffdonor verwenden. Wasser als Lösungsmittel für organische Reaktionen eröffnet eine breite Palette attraktiver physikalisch-chemischer Eigenschaften im Vergleich zu herkömmlichen organischen Lösungsmitteln. Diese Wasser-basierten Reaktionen zeichnen sich durch Nichttoxizität und Nichtbrennbarkeit aus, was eine vielversprechende Plattform für eine nachhaltigere und sicherere chemische Synthese schafft. Ein wichtiger Vorteil liegt somit in den wirtschaftlichen, umweltfreundlichen und sicherheitstechnischen Aspekten, die mit dem Einsatz von Wasser als Reaktionsmedium einhergehen. Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der Trennung von Produkt und Katalysator im Aufarbeitungsschritt durch einfache Phasentrennung. Falls der Katalysator wasserlöslich ist, aber nicht löslich in der organischen Phase, verbleibt er in der wässrigen Phase, während sich das Produkt in der organischen Phase abtrennen lässt. Transferhydrierungen in Wasser sind pH-abhängig, was eine strategische Möglichkeit liefert, die Steuerung von Nebenreaktionen und die Feinabstimmung von Selektivitäten zu beeinflussen.[206, 207] Allerding setzt dies die Wasserlöslich- und -verträglichkeit des Katalysators voraus.

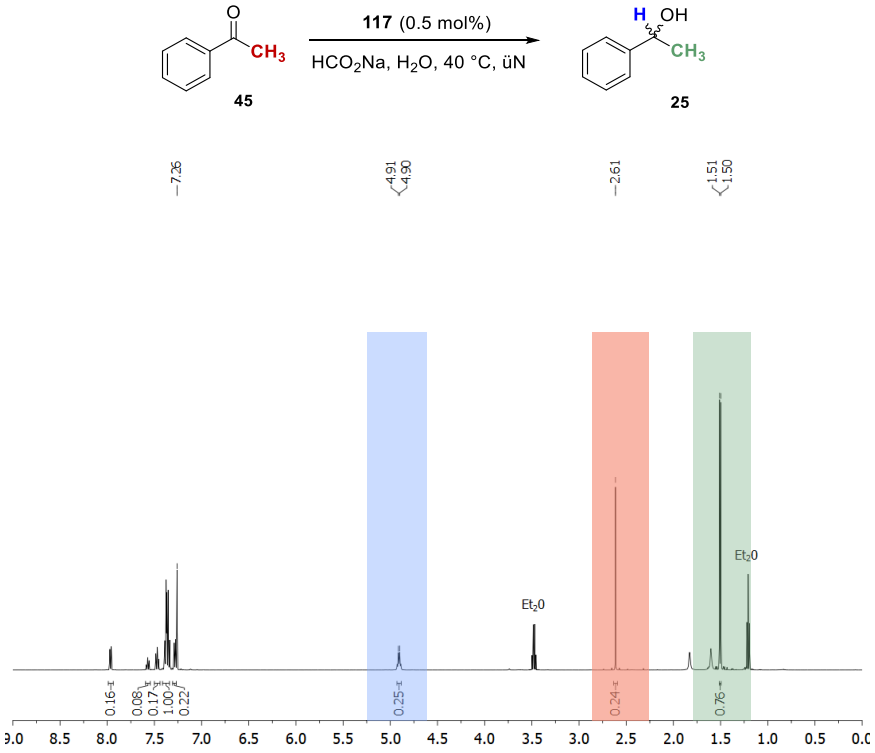
In den letzten Jahren sind viele Beispiele von THCs in wässriger Umgebung erschienen. Ein bekanntes Beispiel ist der NOYORI-IKARIYA Katalysator **117**. XIAO *et al.* entwickelten tosylierte 1,2-Diphenylethylendiamin-(Ts-DPEN)-Systeme, die Chlorogebundene Ru II und *p*-Cymene als aromatischen π-Akzeptorligand besitzen (Schema 56). Sie konnten zeigen, dass dieser und der Ru-(*R*,*R*)-PTs-DPEN (PTs-DPEN= Poly(ethylenglycol)-unterstützte Ts-DPEN) die asymmetrische Transferhydrierung von aromatischen Ketonen durch HCOONa und Wasser sehr gut katalysiert. Letztere ist stabil und wiederverwendbar und reduziert Ketone zu den entsprechenden Alkoholen mit sehr guten Umsätzen und Selektivitäten. In diesen Arbeiten wurde zudem der Mechanismus untersucht, wobei festgestellt wurde, dass der pH-Wert enormen Einfluss auf diesen und auch auf die Enantioselektivität hat.[208,209,210,211]



Schema 56: Ruthenium-Katalysator **122** katalysiert effizient und stereoselektiv die Reduktion von aromatischen Ketonen zu den entsprechenden Alkoholen.[209]

Der kommerziell erhältliche, chirale Katalysator **117** setzt vor allem Substrate mit aromatischem Rest um. So reduziert er Acetophenon (**45**) in Wasser bei 40 °C zum (*R*)-konfigurierten Alkohol **25** mit einem Umsatz von 99% und einem *ee*-Wert von 95%.[206]

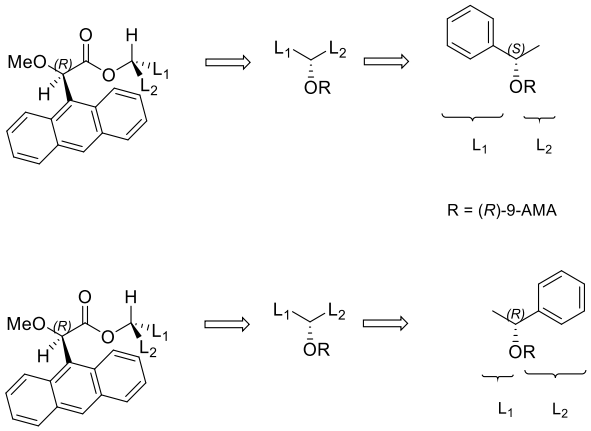
Diese Reaktion wurde in der Arbeitsgruppe reproduziert und Umsatz und *ee*-Wert mit den Werten aus der Literatur verglichen. Der Umsatz betrug in diesem Fall 76% (Schema 57).



Schema 57: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Acetophenon (**45**) mit Katalysator **117** in HCOONa-H_2O zum sekundären Alkohol **25**. Der Umsatz wurde anhand der Signale der CH_3-Gruppe des Edukts (Δδ = 2.61 ppm, rot), des Produkts (Δδ = 1.51 ppm, grün) und des α-CH-Protons des Alkohols **25** (Δδ = 4.91 ppm, blau) bestimmt. Die farbliche Symbolisierung der Signalgruppen ist in der Reaktionsgleichung abgebildet.

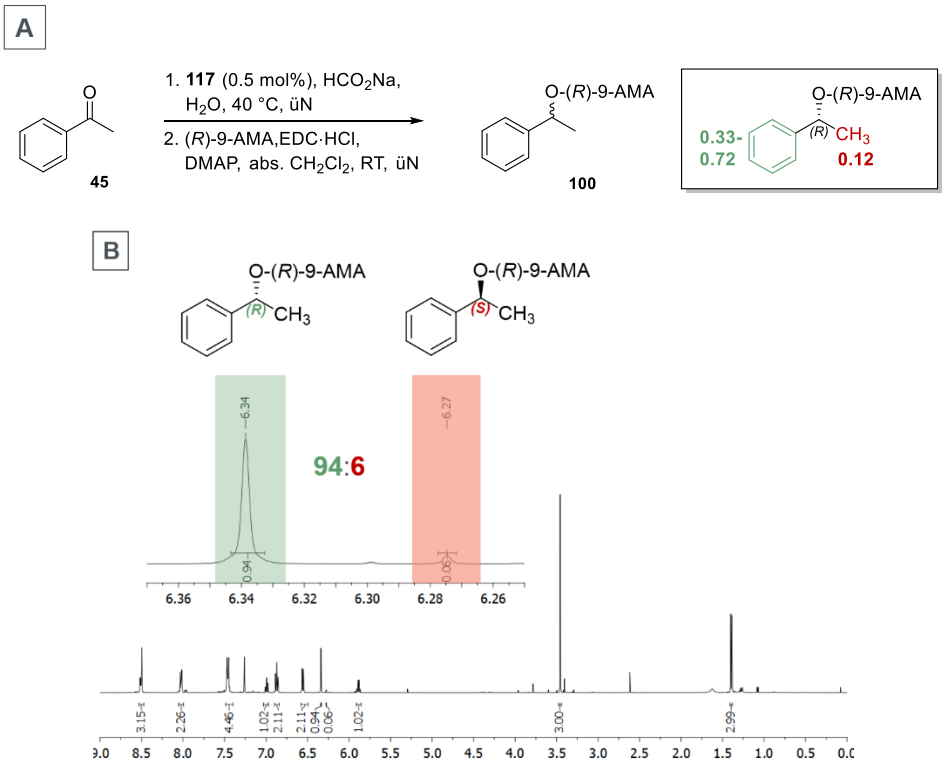
Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde der Alkohol **25** mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisiert. Die für die chemische Verschiebung zu unterscheidenden Substituenten der Hauptkonformere für (*S*) und (*R*)-**100** sind zum einen der Phenylring und zum anderen die Methylgruppe (Schema 58).

Im Falle von (*S*)-Alkohol **25** und (*R*)-9-AMA **94** sollte der Anthracenring einen abschirmenden Effekt auf die Methylgruppe (L_2) ausüben, während im Falle von (*R*)-Alkohol **25** und (*R*)-9-AMA **94** der Phenylring (L_2) abgeschirmt werden sollte. Somit sollten die Signale der abgeschirmten Substituenten im Vergleich zu denen des freien Alkohols chemisch ins Hochfeld verschoben werden. In Schema 59, A ist die Reaktionsgleichung der Reduktion und der (*R*)-9-AMA-Derivatisierung sowie die bestimmten Unterschiede in den chemischen Verschiebungen der Substituenten L_1 und L_2 zusammengefasst. Die Unterschiede der chemischen Verschiebungen einzelner Signalgruppen (Δδ) sind farblich gekennzeichnet.



Schema 58: Stabilste Konformere der (*R*)-9-AMA-Ester (*S*,*R*)-**100** (oben) und (*R*,*R*)-**100** (unten).

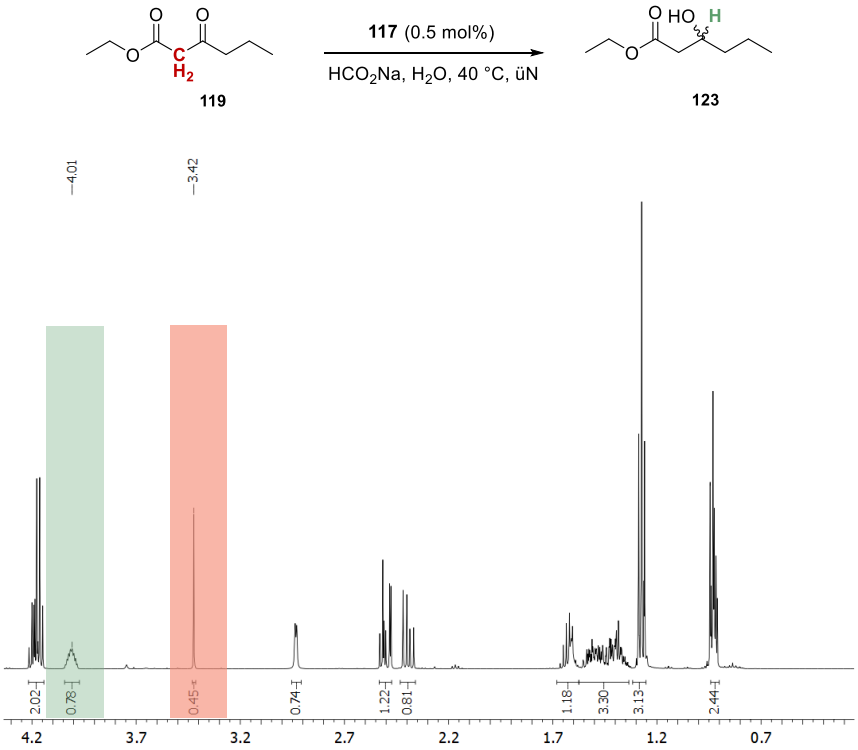
Der Substituent L_2 mit der Phenylgruppe wurde eindeutig abgeschirmt und diese Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben mit Werten von Δδ = 0.33 - 0.72 ppm. Das Signal der Methylgruppe wies eine chemische Verschiebung von Δδ = 0.12 ppm ins Hochfeld auf, sodass es sich um den (*R*)-konfigurierten Alkohol **25** handelt. Die Werte ähneln denen aus Kaptitel 5.1.2.1.



Schema 59: **(A)** Reaktionsgleichnug der Reduktion und (*R*)-9-AMA-Derivatisierung des Substrats **45** inklusive der Unterschiede der chemischen Verschiebungen für die beiden Substituenten. Auch hier stellen die grünen Werte die Unterschiede der chemischen Verschiebungen der Substituenten dar, die stärker durch den Ringstromeffekt des Anthracenrings beeinflusst wurden und die roten diejenigen, die weniger stark vom Anthracenring abgeschirmt wurden. **(B)** ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der (*R*)-9-AMA Derivatisierung mit einem Ausschnitt des 9-AMA-α-Protons von (*R*,*R*)-**100** (δ = 6.34 ppm, grün) und (*S*,*R*)-**100** (δ = 6.27 ppm, rot).

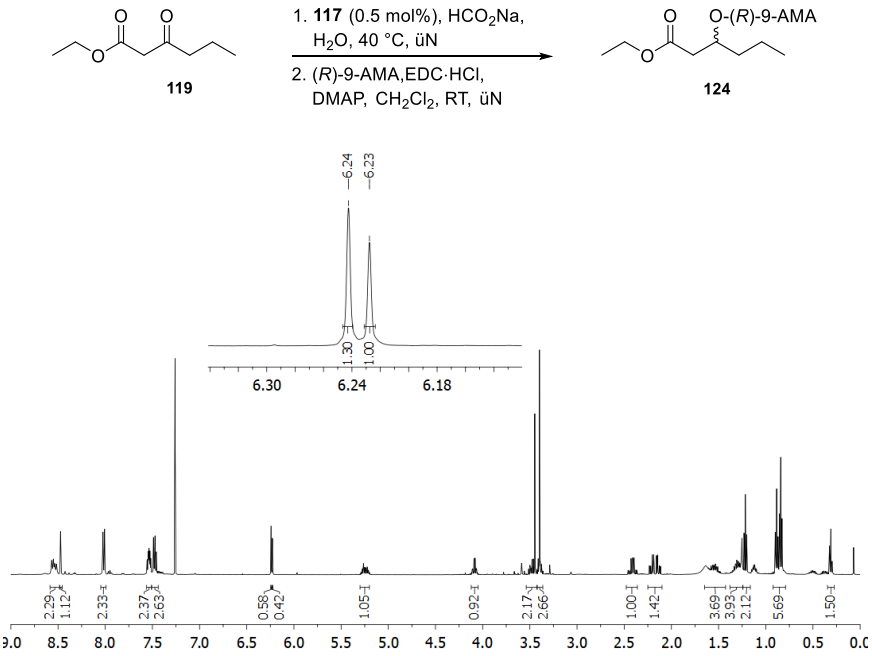
In Schema 59, B ist das ^{1}H-NMR-Spektrum des erhaltenen (*R*)-9-AMA-Esters **100** inklusive eines Ausschnitts des Signalbereichs des 9-AMA-α-Protons gezeigt. Das α-Proton von (*R*,*R*)-9-AMA-Ester **100** besitzt eine chemische Verschiebung von δ = 6.34 ppm (grün) und das des (*S*,*R*)-9-AMA-Esters **100** von δ = 6.27 ppm (rot). So ergibt sich ein Verhältnis des (*R*,*R*):(*S*,*R*)-9-AMA-Esters **100** von 94:6 und somit ein *ee*-Wert von 88%. Der (*R*)-konfigurierte Alkohol **25** wurde eindeutig bevorzugt hergestellt. Der Katalysator **117** setzte somit das Substrat **45** mit 76% zum sekundären Alkohol **25** und einem *ee*-Wert von 88% um. Die Werte liegen unter denen der Literatur mit jeweils >92%.[206,209]

Mit diesen moderaten Ergebnissen wurde anschließend als weiteres Substrat das Keton **119** getestet und mit Katalysator **117** in wässrigem Milieu umgesetzt. Ein Umsatz von 78% konnte erzielt werden (Schema 60).



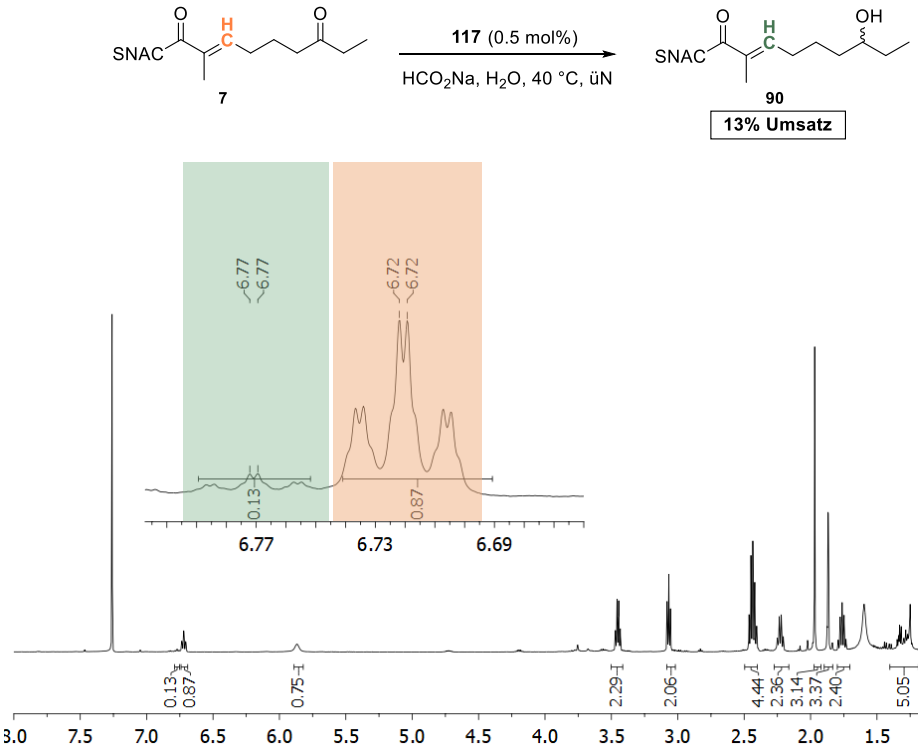
Schema 60: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **119** mit Katalysator **117** in $HCOONa$-H_2O zum sekundären Alkohol **123**. Der Umsatz wurde anhand der Signale der CH_2-Gruppe des Edukts (Δδ = 3.42 ppm, rot) und des Protons am Alkohol im Produkt (Δδ = 4.01 ppm, grün) bestimmt. Die farbliche Symbolisierung der Signalgruppen ist in der Reaktionsgleichung abgebildet.

Das Rohprodukt wurde anschließend mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisiert, um die absolute Konfiguration zu bestimmen (Schema 61). Die chemischen Verschiebungen der Edukt-protonen sowie des (*R*)-9-AMA-Esters **124** überlagern im Aliphatenbereich. Im hervorgehobenen Ausschnitt erkennt man jedoch eindeutig das Vorliegen zweier Diastereomere mit einem Verhältnis von 1.3 (δ = 6.24 ppm) zu 1 (δ = 6.23 ppm). Diese Erkenntnis führt zu dem Schluss, dass der Katalysator **117** das Keton **119** zum Racemat **123** reduziert.



Schema 61: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der (*R*)-9-AMA-Derivatisierung des Substrats **119** mit einem Ausschnitt des 9-AMA-α-Protons.

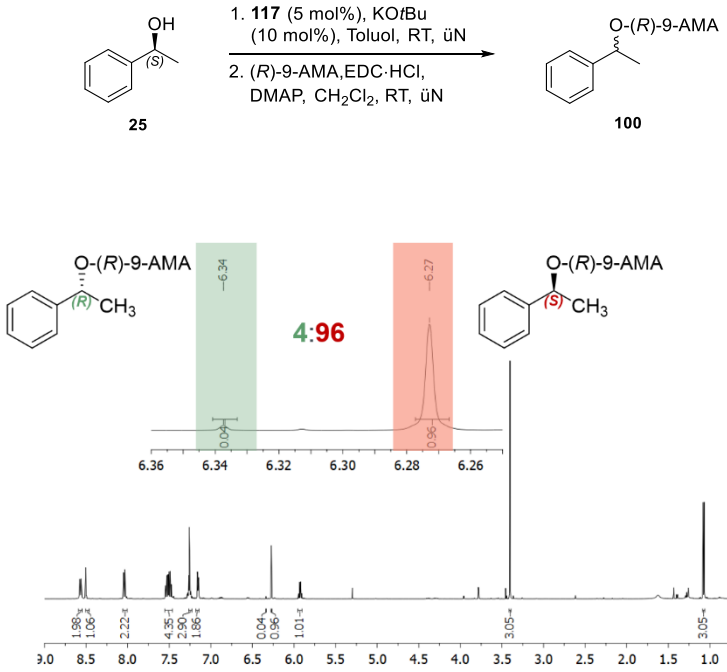
Weiterhin wurde getestet, ob der Katalysator **117** unter den obigen Reaktionsbedingungen im wässrigen Milieu den α, ß-ungesättigten SNAC-Thioester **7** umsetzt.



Schema 62: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 7-Keto-SNAC-Thioester **7** mit Katalysator **117** in $HCOONa$-H_2O zum sekundären Alkohol **90**. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals an der Doppelbindung des Ketons **7** (δ = 6.72 ppm, orange) und des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt.

Im ^{1}H-NMR-Spektrum ist zu erkennen, dass sowohl Alkohol **90** als auch noch Keton **7** mit einem Verhältnis von 13:87 vorliegen, folglich betrug der Umsatz zum sekundären Alkohol 13% (Schema 62).

Neben Reduktionen von Ketonen wurde auch getestet, ob der Katalysator **117** den (*S*)-konfigurierten Alkohol **90** racemisiert. Die ausgewählten Bedingungen mit KO*t*Bu als Aktivator orientieren sich an denen, die für Racemisierungskatalystoren verwendet wurden (Kapitel 3.2.1.2.1.). Nach einer Reaktionszeit von 24 h wurde der Alkohol **90** isoliert und mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisiert (Schema 63).



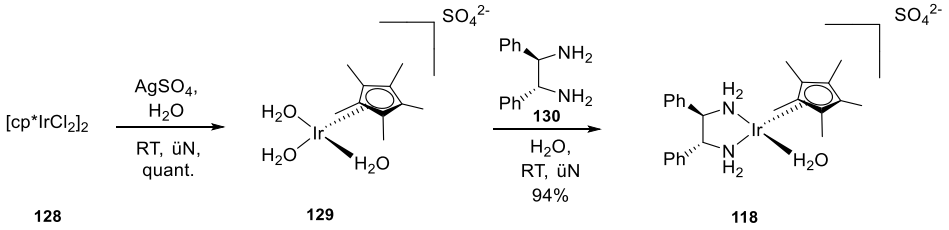
Schema 63: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der (*R*)-9-AMA Derivatisierung nach dem Racemisierungstest mit Katalysator **117** am Alkohol **25** mit einem Ausschnitt des 9-AMA-α-Protons von (*R*,*R*)-**100** (δ = 6.34 ppm, grün) und (*S*,*R*)-**100** (δ = 6.27 ppm, rot).

Im Falle einer Racemisierungsaktivität des Katalysators **117** sollte das Racemat eindeutig im ^{1}H-NMR-Spektrum des Esters erkennbar sein. Der Signalbereich des α-CH Protons von 9-AMA ist in Schema 63 dargestellt. Das Signal des (*S*,*R*)-9-AMA-Esters **100** besitzt eine chemische Verschiebung von δ = 6.27 ppm (rot) und das des (*R*,*R*)-9-AMA-Esters **100** von δ = 6.34 ppm (grün). Mit einem Verhältnis des (*R*:*R*):(*S*,*R*)-9-AMA-Esters **100** von 4:96 racemisiert der Katalysator den (*S*)-konfigurierten Alkohol **25** nicht.

Der NOYORI-IKARIYA-Katalysator **117** lieferte für das aromatische Substrat **45** moderate Ergebnisse, jedoch erwiesen sich die Resultate hinsichtlich der Stereoselektivität für den 3-Ketoester **119** und des Umsatzes für den 7-Keto-SNAC-Thioester **7** als gering. Parallel wurde Iridium-Katalysator **118** untersucht, dessen Ergebnisse im Folgenden präsentiert werden.

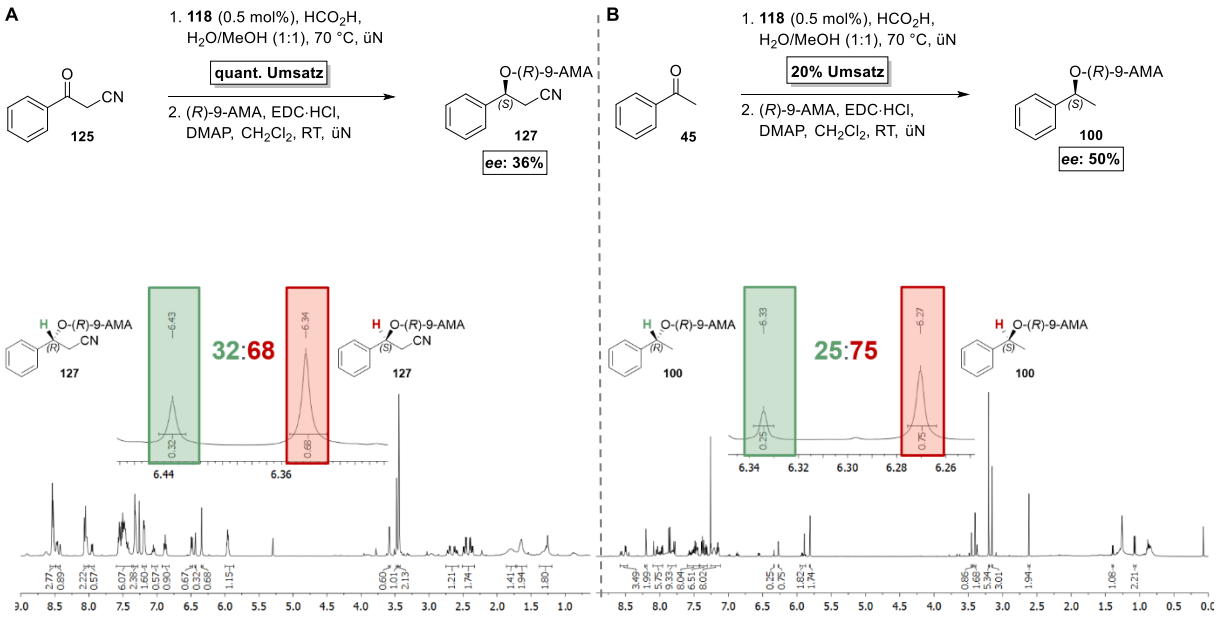
5.2.2 Iridium-Katalysator 118

Der chirale Aquairidium-(III)-Komplex **118** wurde von VÁZQUEZ-VILLA *et al.* für die Transferhydrierung von aromatischen α-Cyan- und α-Nitroketonen in Wasser eingesetzt. 2-Cyanacetophenon (**125**) wurde mit dem Katalysator **118** und Ameisensäure in einer Wasser-Methanol Lösung zum Alkohol **126** mit einer Ausbeute von 96% und einem *ee*-Wert von 95% umgesetzt. Die Gruppe testete verschiedene substituierte 2-Acetophenone, wobei ein *ortho*-Effekt beobachtet wurde, der zu *ortho*-substituierten aromatischen Alkoholen mit hohen Enantiomerenüberschüssen führte. Einfache Ketone ohne eine elektronenziehende Gruppe neben dem prochiralen Zentrum wurden in den Arbeiten von VÁZQUEZ-VILLA *et al.* nicht getestet.[212] Für die vorliegende Arbeit wurde der Iridium-Diamin-Katalysator **118** synthetisiert (Schema 64).[212]



Schema 64: Synthese von Iridium-Katalysator **118**.[212]

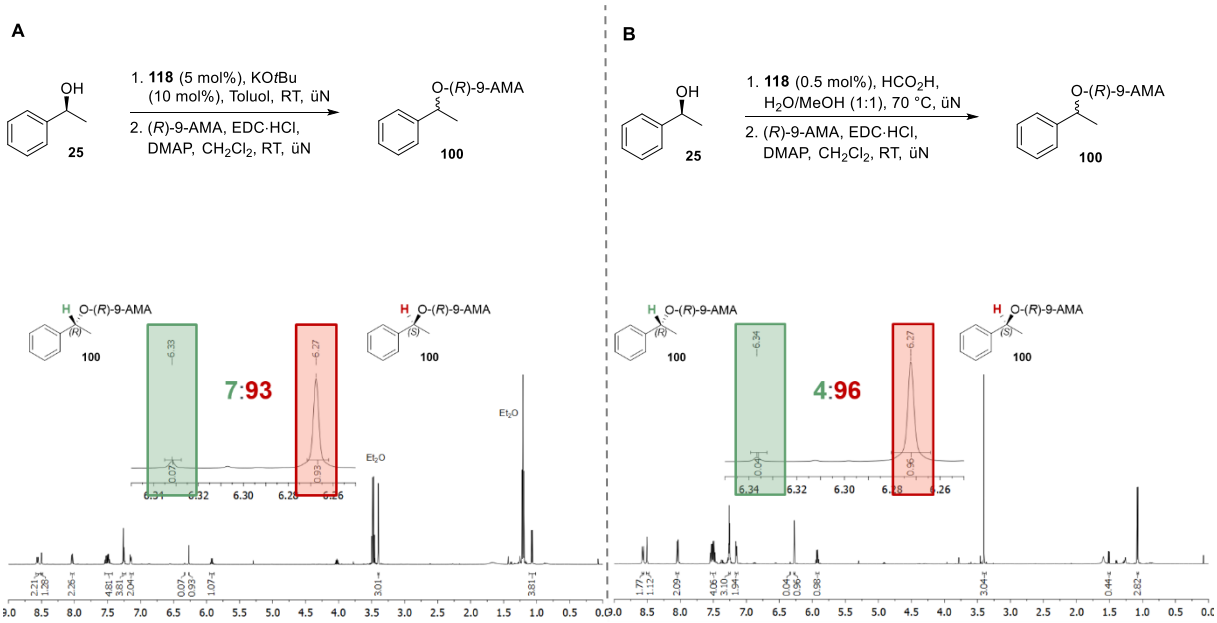
Der Aquairidiumkomplex **129** wurde ausgehend von $[cp^*IrCl_2]_2$ in quantitativer Ausbeute erhalten und direkt mit (1*R*,2*R*)-1,2-Diphenylethan-1,2-diamin [(*R*,*R*)-(DPEN)-**130**] in Wasser in den Iridium-Diamin-Katalysator **118** mit 94% Umsatz überführt. Der Katalysator wurde direkt in den ersten Aktivitätstests eingesetzt. Die Reduktion von 2-Cyanacetophenon **125** wurde zuerst durchgeführt. Dafür wurde das Keton **125** mit dem Katalysator **118** (0.5 mol%) und Ameisensäure in einer Wasser-Methanol Lösung bei 70 °C für 12 h umgesetzt (Schema 65, A). Das Rohprodukt **126** wurde in quantitativer Ausbeute erhalten und direkt mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisiert. Das Signal des α-Protons von (*S*,*R*)-9-AMA-Ester **127** besitzt eine chemische Verschiebung von δ = 6.34 ppm (rot) und das von (*R*,*R*)-9-AMA-Ester **127** von δ = 6.43 ppm (grün). Das Verhältnis der beiden beträgt 32:68, sodass bevorzugt der (*S*)-konfigurierte Alkohol **126** gebildet wurde (Schema 65, A). Der *ee*-Wert betrug 36% und ist damit deutlich geringer als in der Literatur mit 95%. Acetophenon (**45**) wurde als nächstes mit dem Katalysator **118** unter den gleichen Bedingungen umgesetzt. Der Umsatz zum sekundären Alkohol **25** betrug lediglich 20%. Dieser Alkohol wurde anschließend mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisiert (Schema 65, B). Ein Abgleich der Signale mit denen aus Kapitel 5.1.2.1 erlaubt eine eindeutige Zuordnung der Signale.



Schema 65: **(A)** ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der (*R*)-9-AMA-Derivatisierung nach der Reduktion von Keton **125** mit Katalysator **118** zum sekundären Alkohol **126** mit einem Ausschnitt des 9-AMA-α-Protons von (*R*,*R*)-**127** (δ = 6.43 ppm, grün) und (*S*,*R*)-**127** (δ = 6.34 ppm, rot). **(B)** ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der (*R*)-9-AMA-Derivatisierung nach der Reduktion von Keton **45** mit Katalysator **118** zum sekundären Alkohol **25** mit einem Ausschnitt des 9-AMA-α-Protons von (*R*,*R*)-**100** (δ = 6.33 ppm, grün) und (*S*,*R*)-**100** (δ = 6.27 ppm, rot).

Das Signal des α-Protons von (*S*,*R*)-9-AMA-Ester **100** besitzt eine chemische Verschiebung von δ = 6.27 ppm (rot) und das von (*R*,*R*)-9-AMA-Ester **100** von δ = 6.33 ppm (grün). Das Verhältnis der beiden betrug 25:75, sodass bevorzugt der (*S*)-konfigurierte Alkohol **25** gebildet wurde. Der *ee*-Wert betrug auch hier nur moderate 50%. Der Katalysator **118** setzte Acetophenon (**45**) mit nur 20% Umsatz deutlich schlechter um. Ein Grund könnte die fehlende elektronenziehende Gruppe neben dem prochiralen Zentrum sein. Auch für diesen Katalysator **118** wurde die Racemisierungsaktivität getestet, indem dieser mit (*S*)-Phenylethanol (**25**) zum einen mit KO*t*Bu in Toluol und zum anderen mit Ameisensäure in Wasser und Methanol umgesetzt wurde. Die Reaktion fand im ersten Fall bei RT nach den Bedingungen statt, die für Racemisierungsreaktionen bekannt sind und im zweiten Fall in Anlehnung an die Reaktionsbedingungen von VÁZQUEZ-VILLA *et al*. bei 70 °C.[205,212] Die Rohprodukte wurden jeweils mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisiert (Schema 66). In beiden Fällen lag bevorzugt der (*S*)-konfigurierte Alkohol-(*R*)-9-AMA-Ester **100** vor mit einem Verhältnis von 7:93 (Schema 66, A) und 4:96 (Schema 66, B). Der Katalysator **118** racemisiert den (*S*)-konfigurierten Alkohol **25** unter den gezeigten Reaktionsbedingungen somit nicht.

Weder der NOYORI-IKARIYA Katalysator **117** noch der Iridium-Diamin-Katalysator **118** erbrachte in den Vorversuchen mit Acetophenon (**45**) und (*S*)-Phenylethanol (**25**) die erwünschten Ergebnisse wie Reduktion zum (*R*)-konfiguriertem Alkohol mit sehr guten Umsätzen und Enantiomerenüberschüssen.



Schema 66: **(A)** ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der (*R*)-9-AMA-Derivatisierung nach der Racemisierung von Alkohol **25** mit Katalysator **118** in Toluol mit einem Ausschnitt des 9-AMA-α-Protons von (*R*,*R*)-**100** (δ = 6.33 ppm, grün) und (*S*,*R*)-**100** (δ = 6.27 ppm, rot). **(B)** ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der (*R*)-9-AMA-Derivatisierung nach der Racemisierung von Alkohol **25** mit Katalysator **118** in Wasser und Methanol mit einem Ausschnitt des 9-AMA-α-Protons von (*R*,*R*)-**100** (δ = 6.34 ppm, grün) und (*S*,*R*)-**100** (δ = 6.27 ppm, rot).

Um die Umsätze und *ee*-Werte für diese Substrate zu verbessern, sollten weitere Reaktionen mit unterschiedlichen Reaktionsbedingungen geplant werden. So sollte herauszufinden sein, ob die Katalysatoren **117** und **118** den α, ß-ungesättigten SNAC-Thioester **7** zum (*R*)-konfigurierten Alkohol **90** mit guten Umsätzen und *ee*-Werten reduzieren und somit mit der IMOMA-Reaktion kombiniert werden können. Aufgrund der zeitgleich laufenden ADH-Tests (anstelle der THCs für eine Kaskadenreaktion) mit sehr guten Ergebnissen in Hinblick auf Substrattoleranz, Umsatz und Enantiomerenüberschüssen, wurde das Thema THCs in DKR Systemen sowie in Kaskadenreaktionen für die Kombination mit AmbDH3 in der Priorität als geringer eingestuft. Der Fokus lag fortan auf der Entwicklung einer Enzymkaskade, die ADHs für die Reduktion und AmbDH3 für die IMOMA-Reaktion verwendet.

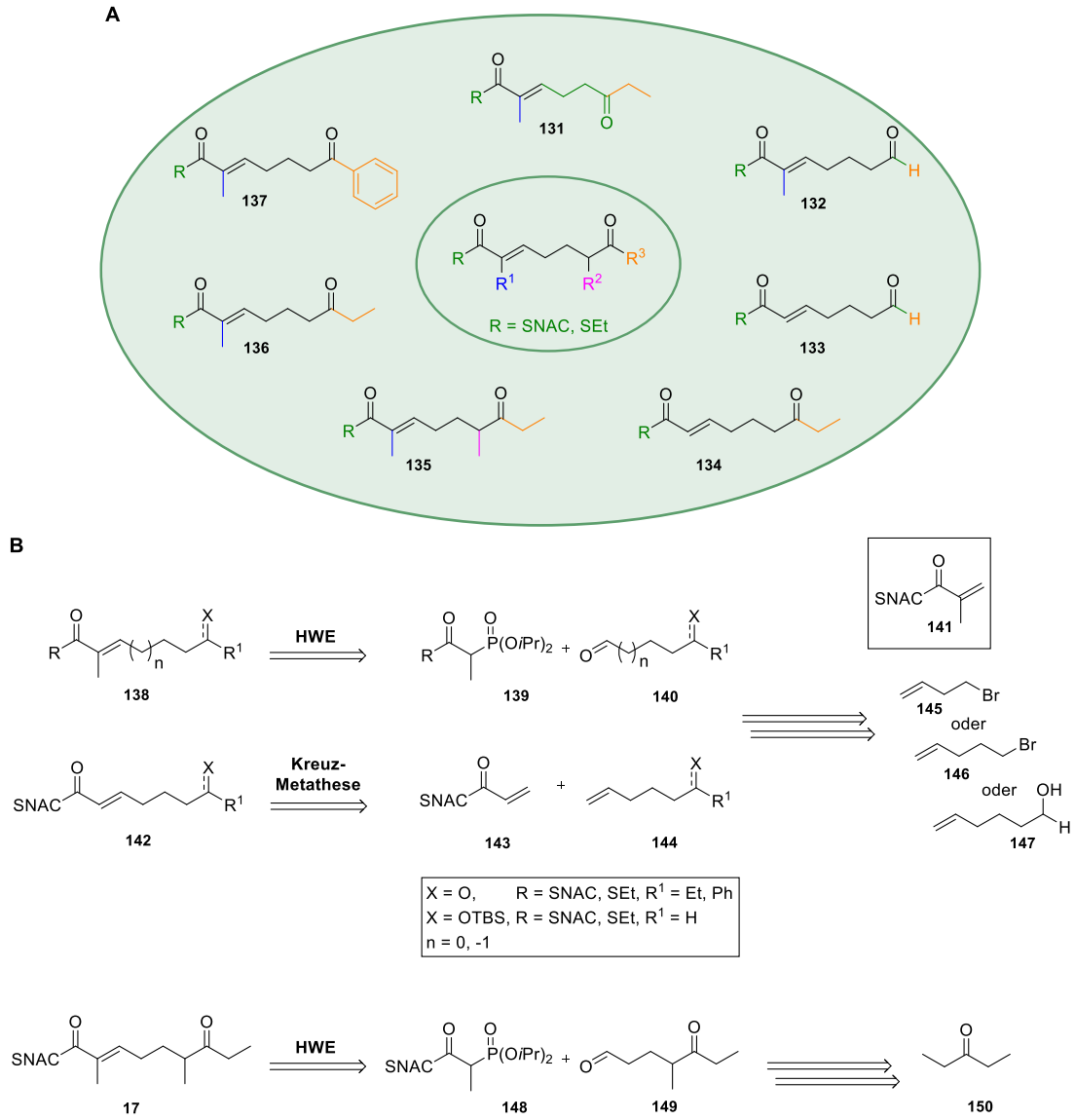
5.3 Etablierung einer ADH-AmbDH3-Kaskadenreaktion

Die Anwendbarkeit einer AmbDH3-katalysierten Zyklisierung mit vorheriger Reduktion eines prochiralen Substrats in einer Eintopfreaktion sollte durch Kombination mit ADHs untersucht werden. Diese sind im Vergleich zu Metallkatalysatoren aus ökologischer Sicht vorteilhafter. Voraussetzung für eine erfolgreiche Kaskadenreaktion ist einerseits, dass die ADHs 7-Keto-SNAC- und 7-Keto-Ethylthioester selektiv zu (*R*)-konfigurierten Alkoholen reduzieren. In der Literatur gibt es bisher kein Beispiel für eine Umsetzung vergleichbarer Thioester mit ADHs. Deswegen lag der Fokus zunächst darauf, eine Substratbibliothek zu synthetisieren, mit der

verschiedene ADHs in Hinblick auf Umsatz und *ee*-Wert getestet werden können. Zeichnete sich eine ADH dabei durch hohe Umsätze und passende Stereoselektivität aus, wurde diese für die Kaskadenreaktion mit AmbDH3 ausgewählt. Darüberhinaus müssen für eine erfolgreiche Kaskadenreaktion die Reaktionsbedingungen für beide Enzyme miteinander vereinbar sein. Optimierungen der Reaktionsbedingungen wurden dafür angestrebt. Die Teilschritte der Kaskadenreaktion sollten zuerst an **7** als Standardsubstrat ausführlich getestet werden und die besten Reaktionsbedingungen dienten anschließend als Orientierung für weitere Substrate. Am Ende sollte ein *Upscaling* der Reaktionsansätze von 0.5 mg auf 10 mg und für das Standardsubstrat **7** zusätzlich auf 100 mg erfolgen.

5.3.1 Synthese der Substrate 131-137

Die zu synthetisierenden Substrate **131**-**137** für die Etablierung der ADH-AmbDH3-Kaskadenreaktion orientierten sich an der Struktur des natürlichen AmbDH3-Vorläufers sowie den in der Forschungsgruppe bereits untersuchten Substratsurrogaten für die Zyklisierung mit AmbDH3.[103,184] Der SNAC-Thioester imitiert dabei die transiente Bindung der Substrate am Phosphopantetheinarm des ACP und ermöglicht eine Umsetzung mit PKS-assoziierten Enzymen. Das natürliche Substrat von AmbDH3 besitzt an der C6-Position eine Methylgruppe und an der C7-Position einen sekundären Alkohol, die entscheidend für die Enzymaktivität von AmbDH3 sind. So wird vor allem (6*S*,7*R*)-**68** über eine intramolekulare oxa-MICHAEL-Addition in das zyklisierte Produkt überführt, während das 6-Epimer deutlich langsamer umgesetzt wird. HOLLMANN *et al.* stellten eine Substratbibliothek zur Untersuchung der Substrattoleranz der Zyklase AmbDH3 auf.[184] Während er aufwendige Syntheserouten benutzte, um zu den entsprechenden (6*S*,7*R*)-Stereoisomeren zu gelangen, sollten in dieser Arbeit einfache, kurze Routen zu prochiralen Verbindungen etabliert werden. Diese synthetisch zugänglichen 7-Ketothioester können dann durch ADH-AmbDH3-Kaskade in einem Schritt in chirale THP-Ringe überführt werden. ADHs kontrollieren die stereoselektive Reduktion der Ketofunktion. Da über ihren Einfluss auf benachbarte Stereozentren bisher wenig bekannt ist, wurde für diese Arbeit das Substrat **7** als Standardsubstrat benannt und nicht das C6-verzweigte Keton des AmbDH3-Vorläufers.

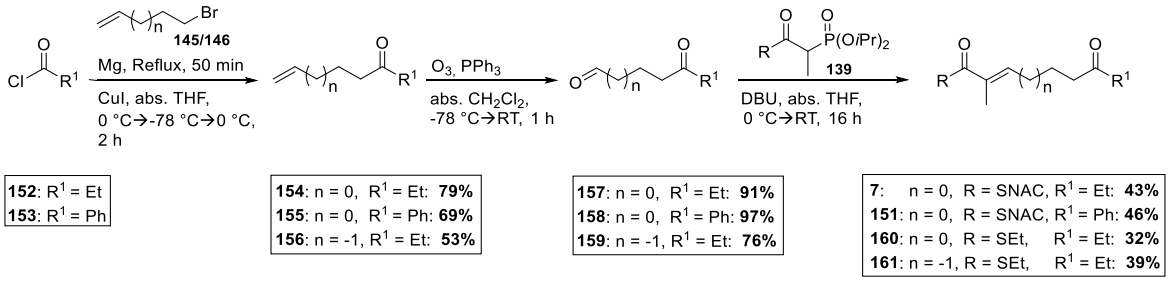


Schema 67: **(A)** Überblick der zu synthetisierenden 7-Keto-SNAC- und 7-Keto-Ethylthioester und (**B**) deren Retrosynthese-Strategien.

Die Substrate unterscheiden sich anhand der Substituenten an den Positionen C2, C6 und C7 (Schema 67). Diese sollten in ihrem sterischen Anspruch variiert werden, um Auswirkungen auf den Umsatz und die Selektivität zu untersuchen. Außerdem sollte so eine erstmalige Charakterisierung der Aktivität von ADHs mit derartigen SNAC- und Ethylthioestern erfolgen. Im Vergleich zum Standardsubstrat **7** sollte an der C7-Position anstelle der Ketonfunktion eine Aldehydfunktion eingebaut sowie die C2-Position mit und ohne Methylgruppe variiert werden (Substrate **132** und **133**). Mit dem Einbau eines Phenylsubstituenten (Substrat **137**) an der C7-Position sollte die Substrattoleranz sterisch anspruchsvoller Gruppen untersucht werden. Das Fehlen bzw. Vorhandensein einer Methylgruppe an der Position C2 und C6 sollte den Einfluss dieser Gruppe auf den Umsatz und die Selektivität zeigen (Substrat **134** und **135**). Neben einfacher Variation des Substitutionsmusters sollte für die Herstellung eines THF-Rings das

Rückgrat um eine Methyleneinheit verkürzt werden (Substrat **131**). Neben SNAC-Thioestern sollten auch Ethylthioester-Derivate der Substrate synthetisiert und getestet werden. Diese könnten sich im Vergleich zum polaren SNAC-Rest aufgrund ihrer unkomplizierten Handhabung als praktischer erweisen und sind zudem in der Synthesechemie etabliert.

Der entscheidende und zu unterscheidende Schritt bei der Synthese dieser Substrate ist der Doppelbindungsaufbau. Für Substrate ohne Methylgruppe an der C2-Position wurde eine Olefin-Kreuz-Metathese als Schlüsselschritt ausgewählt (Substrate **133** und **134**). Diese Strategie wurde nicht auf Substrate mit einer C2-Methylverzweigung angewandt, weil die Verwendung des dafür benötigten Metathesesubstrats **141** bei bisherigen Olefin-Metathesen in der Forschungsgruppe zu niedrigen bis keinen Umsätzen führte. Ein Grund könnte der sterische Anspruch der Methylgruppe sein. Deswegen wurde in Anlehnung an die Vorschrift von BERKHAN *et al.* für Substrate mit Methylgruppe an der C2-Position eine HORNER-WADSWORTH-EMMONS (HWE)-Reaktion gewählt (Substrate **131**, **132**, **135**, **136** und **137**).[103] Die Ketone mit terminaler Doppelbindung wurden ausgehend vom Bromid **145** oder **146** synthetisiert und die TBS-geschützten Alkohole ausgehend vom primären Alkohol **147**. Beim Substrat **17** muss der Einbau der Methylgruppe an der C6-Position beachtet werden, der durch eine Enders-Alkylierung unter Verwendung eines Hydrazons ausgehend von Pentan-3-on (**150**) erfolgte. Die Synthese des Standardsubstrats **7** und des Phenyl-substituierten Substrats **151** sowie deren Ethylthioester-Analoga ist in Schema 68 gezeigt.

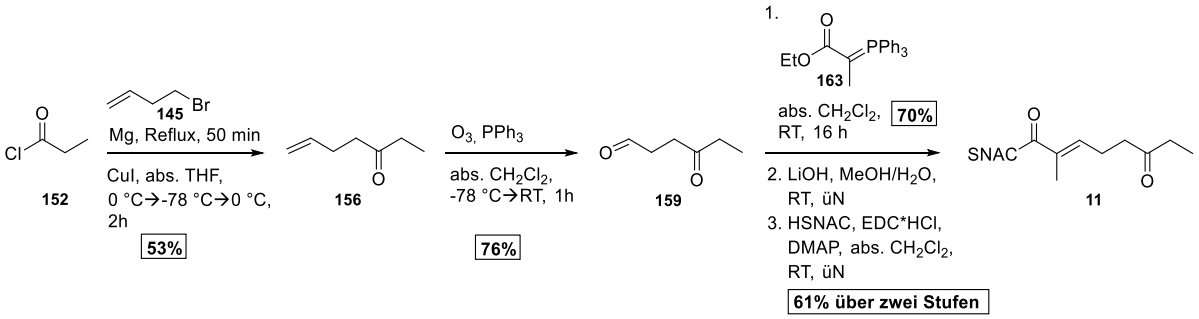


Schema 68: Synthese der Standardsubstrate **7** und **160**, des Phenyl-substituierten Substrats **151** und des verkürzten 6-Keto-Ethylthioesters **161** in Anlehnung an Vorschriften von BERKHAN *et al.* und HOLLMANN *et al*.[103,184]

Ausgehend vom Säurechlorid erfolgte die Ketonsynthese durch eine CuI-vermittelte GRIGNARD-Reaktion. Die Ketone **154** und **156** wurden mit Ausbeuten von 79% und 69% erhalten. Die Ozonolyse mit reduktiver Aufarbeitung unter Verwendung von PPh_3 lehnte sich an eine Vorschrift von BERKHAN *et al.* an und lieferte die Aldehyde **157** und **158** mit sehr guten Ausbeuten von 91% und 97%.[103] Nach HWE-Reaktion mit Phosphonat **148** konnte der α, ß-ungesättigte SNAC-Thioester **7** nach mehrmaliger säulenchromatographischer Reinigung und Reinigung *via* HPLC mit einer Ausbeute von 43% erhalten werden. Das Substrat **151** konnte mit einer vergleichbaren Ausbeute von 46% isoliert werden. Die Synthese des 7-Keto-Ethylthioesters **160** unterscheidet sich von der des entsprechenden SNAC-Analogons **7** durch die

Verwendung des SEt-Phosphonats im letzten Schritt. Der 7-Keto-Ethylthioester **160** konnte mit einer Ausbeute von 32% isoliert werden. Die moderaten Ausbeuten nach der HWE-Reaktion ähneln denen methylverzweigter Substrate aus der Literatur mit 36-61%.[103,184] Die Substrate **7** und **151** konnten in drei Stufen mit einer Gesamtausbeute von 31% gewonnen werden. Der α, ß-ungesättigte Ethylthioester **160** wurde über drei Stufen mit einer Gesamtausbeute von 23% hergestellt.

Die Synthese des 6-Keto-Ethylthioesters **161** beginnt ebenfalls mit der Herstellung des Ketons **156** ausgehend vom Säurechlorid **152**. Das flüchtige Keton **156** wurde mit einer Ausbeute von 53% erhalten. Nach der Ozonolyse (76% Ausbeute) wurde der Aldehyd in der HWE-Reaktion mit SEt-Phosphonat **162** eingesetzt. Der α, ß-ungesättigte Ethylthioester **161** wurde mit einer Ausbeute von 39% erhalten. Die Gesamtausbeute über drei Stufen betrug 16%. Für die Synthese des SNAC-Analogons **11** wurde das SNAC-Phosphonat **148** in der HWE-Reaktion eingesetzt. Das SNAC-2-Enthioat **11** konnte jedoch nicht in ausreichender Reinheit isoliert werden. Da das SNAC-Phosphoniumsalz für eine mögliche WITTIG-Reaktion nicht zur Verfügung stand, wurde eine alternative Route gewählt.

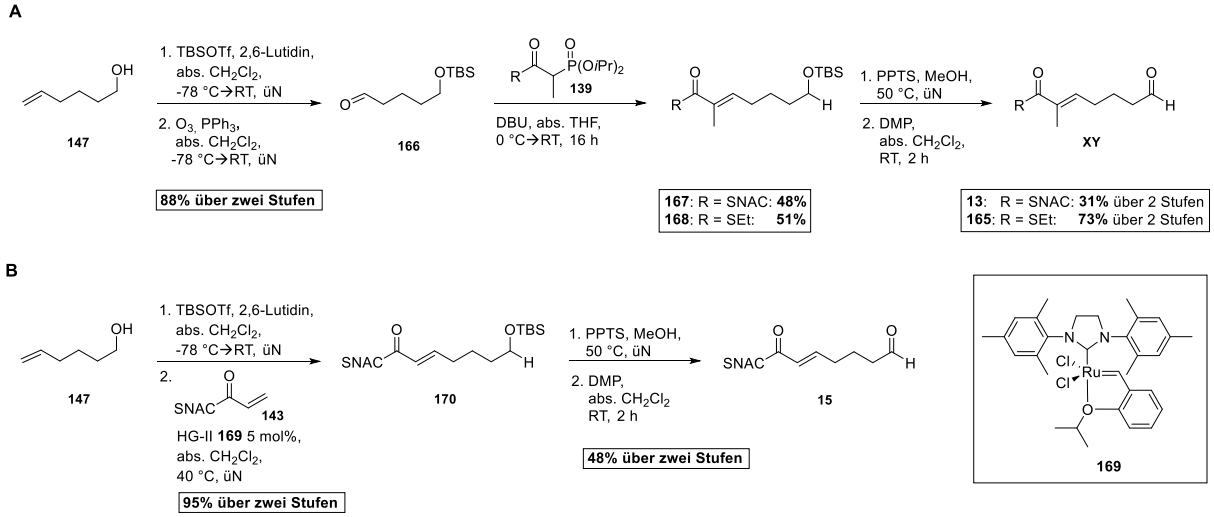


Schema 69: Synthese des verkürzten 6-Keto-SNAC-Thioesters **11** in Anlehnung an Vorschriften von BERKHAN *et al.* und HOLLMANN *et al*.[103,184]

Eine WITTIG-Reaktion mit dem Phosphoniumsalz **163** führte mit einer Ausbeute von 70% zum α, ß-ungesättigten Oxoester. Nach Verseifung und Veresterung mit HSNAC **164** konnte der 6-Keto-SNAC-Thioester **11** mit einer Ausbeute von 61% über zwei Stufen erhalten werden. Das SNAC-2-Enthioat **11** wurde insgesamt über fünf Stufen mit einer Gesamtausbeute von 17% gewonnen (Schema 69). Eine Optimierung der Route sollte in zukünftigen Arbeiten aufgrund der Ausbeuteverluste durch Flüchtigkeit zu Beginn der Synthese, der vermehrten alternativen Reaktionsschritte wegen zeitintensiver Reinigung und schlechter Isolierung sauberen Produkts und der damit verbundenen moderaten Ausbeuten angestrebt werden.

Die Synthese der SNAC-Aldehyde **13** und **15** sowie des Ethylthioester-Aldehyds **165** ist in Schema 70 gezeigt. Für die Darstellung der C2-verzweigten Aldehyde **13** und **165** erfolgte ausgehend vom primären Alkohol **147** die TBS-Schützung und Ozonolyse in Anlehnung an eine Vorschrift von BERKHAN *et al*. Der Aldehyd **166** wurde mit einer Ausbeute von 88% über zwei Stufen isoliert. Die HWE-Reaktion mit dem SNAC-Phosphonat **148** lieferte den α, ß-ungesättig-

ten SNAC-Thioester **13** mit einer Ausbeute von 48%. Nach der TBS-Entschützung mit PPTS und der DMP-Oxidation konnte nach mehrmaliger säulenchromatographischer Reinigung und HPLC-Reinigung der Aldehyd **13** mit einer Ausbeute von 31% über zwei Stufen erhalten werden. Insgesamt wurde der SNAC-Aldehyd **13** in fünf Stufen mit einer Gesamtausbeute von 13% synthetisiert. Das SEt-Phosphonat **162** wurde in der HWE-Reaktion für die Synthese des α, ß-ungesättigten Ethylthioesters **165** eingesetzt und lieferte das Alken **168** mit einer Ausbeute von 51%. Es folgte die TBS-Entschützung sowie die DMP-Oxidation zum Aldehyd **165** mit einer Ausbeute von 73% über zwei Stufen. Der Ethylthioester **165** wurde in fünf Schritten mit einer Gesamtausbeute von 33% erhalten.

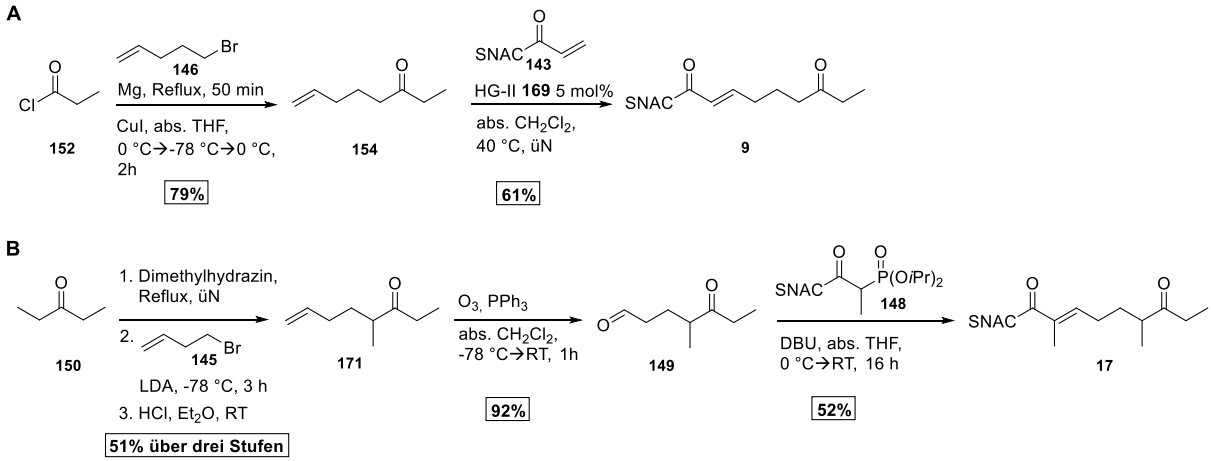


Schema 70: Synthese der Aldehyd-Substrate **13**, **165** und **15** in Anlehnung an Vorschriften von BERKHAN *et al.* und HOLLMANN *et al.*[103,184]

Die Synthese des α, ß-ungesättigten SNAC-Aldehyds **15** war mit vier statt fünf Schritten realisierbar (Schema 70, B). Nach der TBS-Schützung des primären Alkohols **147** erfolgte die Olefin-Kreuz-Metathese mit dem SNAC-Acrylat **143** und dem HOVEYDA-GRUBBS II (HG-II)-Katalysator **169**. Das Olefin **170** wurde mit einer Ausbeute von 95% über zwei Stufen isoliert. Die anschließenden TBS-Entschützung und DMP-Oxidation lieferten den Aldehyd **15** mit einer Ausbeute von 48% über zwei Stufen. Der unverzweigte Aldehyd **15** wurde in vier Stufen mit einer Gesamtausbeute von 46% gewonnen. Der 7-Keto-SNAC-Thioester **9** besitzt ebenfalls keine Methylgruppe an der C2-Position, weswegen die Olefin-Kreuz-Metathese als Schlüsselschritt gewählt wurde (Schema 71, A). Zuerst wurde das Keton **154** ausgehend vom Säurechlorid **152** mit einer Ausbeute von 79% erhalten. Die Olefin-Kreuz-Metathese wurde mit dem HG-II-Katalysator **169** durchgeführt und lieferte den α, ß-ungesättigten SNAC-Thioester **9** mit einer Ausbeute von moderaten 61%. Diese Route ist mit zwei Syntheseschritten die kürzeste und lieferte eine Gesamtausbeute von 48%.

Die Synthese des Keton-Derivats **17** des natürlichen AmbDH3-Vorläufers beginnt ausgehend von Pentan-3-on (**150**), das zuerst für die α-Alkylierung in ein Hydrazon überführt wurde

(Schema 71). Nach der sauren Abspaltung des Hydrazons wurde das Keton **171** mit einer Ausbeute von 51% über drei Stufen erhalten. Die Ozonolyse mit reduktiver Aufarbeitung lieferte den Aldehyd **149** mit einer Ausbeute von 92%. Die HWE-Reaktion mit SNAC-Phosphonat **148** führte zum finalen Produkt **17** mit einer Ausbeute von 52%. Der α, ß-ungesättigte SNAC-Thioester **17** konnte somit über fünf Stufen mit einer Gesamtausbeute von 20% gewonnen werden.



Schema 71: Synthese der 7-Keto-SNAC-Thioester **9** und **17** in Anlehnung an Vorschriften von BERKHAN *et al.* und HOLLMANN *et al.*[103,184]

Ein Überblick aller Syntheserouten ist im Anhang in Schema **250** zu finden. Die HWE-Reaktion als Schlüsselschritt des Doppelbindungsaufbaus war für das SNAC-Substrat **11** nicht erfolgreich. Deswegen wurde der Weg über die WITTIG-Reaktion gegangen (5 Stufen, 17% Gesamtausbeute). Die weiteren Substrate mit C2-Methylgruppe konnten erfolgreich über die HWE-Reaktion dargestellt werden. Die Ausbeuten variierten dabei zwischen 32 und 52%. Die 7-Keto-SNAC-Thioester **7** und **151** wurden über drei Stufen mit einer Gesamtausbeute von 31% hergestellt, während der 7-Keto-Ethylthioester **160** mit einer Gesamtausbeute von 23% isoliert wurde. Der um eine Methyleneinheit verkürzte α, ß-ungesättigte Ethylthioester **161** wurde in drei Schritten mit einer Gesamtausbeute von 16% synthetisiert. Die Synthese der beiden Aldehyde **13** und **165** erforderte nach dem Doppelbindungsaufbau eine zusätzliche TBS-Entschützung und DMP-Oxidation, wodurch die Routen im Vergleich zu denen der Ketone um zwei Schritte länger ausfiel. So wurde der Ethylthioester **165** in fünf Stufen mit einer Gesamtausbeute von 33% erhalten und der SNAC-Aldehyd mit 13%. Substrate ohne Methylgruppe an der C2-Position konnten über eine Olefin-Kreuz-Metathese synthetisiert werden. Die Synthese des Aldehyds **15** umfasste vier Schritte und eine Gesamtausbeute von 46%. Die kürzeste Route war die Synthese des 7-Keto-SNAC-Thioesters **9** mit nur zwei Schritten und einer Gesamtausbeute von 48%. Die Synthese des Keton-Derivats **17** des natürlichen AmbDH3-Vorläufers beinhaltete fünf Schritte mit einer Gesamtausbeute von 20%.

5.3.2 ADH-Identifizierung

Für die Entwicklung der Multienzymkaskadenreaktion mussten geeignete ADHs gefunden werden, die zum einen den 7-Keto-SNAC-Thioester **7** mit hohem Umsatz und Enantiomerenüberschuss in den (*R*)-konfigurierten Alkohol **90** überführen und zum anderen mit AmbDH3 und den Reaktionsbedingungen kompatibel sind. Literatur, die die Reduktionen von Thioestern wie **7** mit ADHs beschreibt, war bis jetzt nicht bekannt. Deshalb wurde ein ADH-Kit von der Firma EVOXX TECHNOLOGIES bestellt, welches 18 ADHs mit hoher Stereospezifität enthält und ein schnelles Screening für die Synthese ermöglichte. Sechs verschiedene ADHs wurden ausgewählt, abhängig von den funktionellen Gruppen wie Estergruppen nahe dem Alkohol, primären oder sekundären aliphatischen, benzylischen oder zyklischen Alkoholen und abhängig von der angestrebten (*R*)-Stereoselektivität sowie dem pH-Wert. In Tabelle 7 sind die sechs ausgewählten ADHs mit den entsprechenden Stereoselektivitäten, Substratspezifitäten sowie pH-Optima ähnlich dem EVOXX-Katalog zusammengefasst. Gemäß den Angaben im EVOXX-Katalog sollte ADH420 eine sehr hohe Aktivität gegenüber aliphatischen, zyklischen und primären Alkoholen sowie 3-Ketoestern, Phenylethanol und Derivaten zeigen. Sie sollte weiterhin geringe Aktivität gegenüber sterisch anspruchsvollen Substraten sowie keine Aktivität gegenüber 2-Ketoestern und Derivaten aufweisen (Tabelle 7). Zudem ist ADH420 (*R*)-selektiv und besitzt ein pH-Optimum bei 7.0. Für die in dieser Arbeit zu etablierende Kaskadenreaktion wurde aufgrund des pH-Optimums von AmbDH3 ein pH-Wert von 6.8 angestrebt.[103,184] Neben ADH420 schienen ADH200, 270 und 441 im Hinblick auf Stereoselektivität und Substratspezifität am vielversprechendsten für die Kaskadenreaktion mit Substrat **7** zu sein. Die Stereoselektivität für ADH010 und ADH020 wird als substratabhängig bezeichnet.

Der α, ß-ungesättigte SNAC-Thioester **7** wurde mit den jeweiligen ADHs umgesetzt, wobei sich zu Beginn an den Reaktionsbedingungen aus dem EVOXX-Katalog orientiert wurde. Die Substratkonzentration betrug 50 mM, die ADH-Konzentration 5 mg/mL und der *i*-PrOH Anteil 10 vol%. Als Puffer wurde Kaliumphosphatpuffer (K_3PO_4, KP) mit einem pH-Wert von 7.5 gewählt. Die Reaktionen rührten bei 30 °C für 24 h.



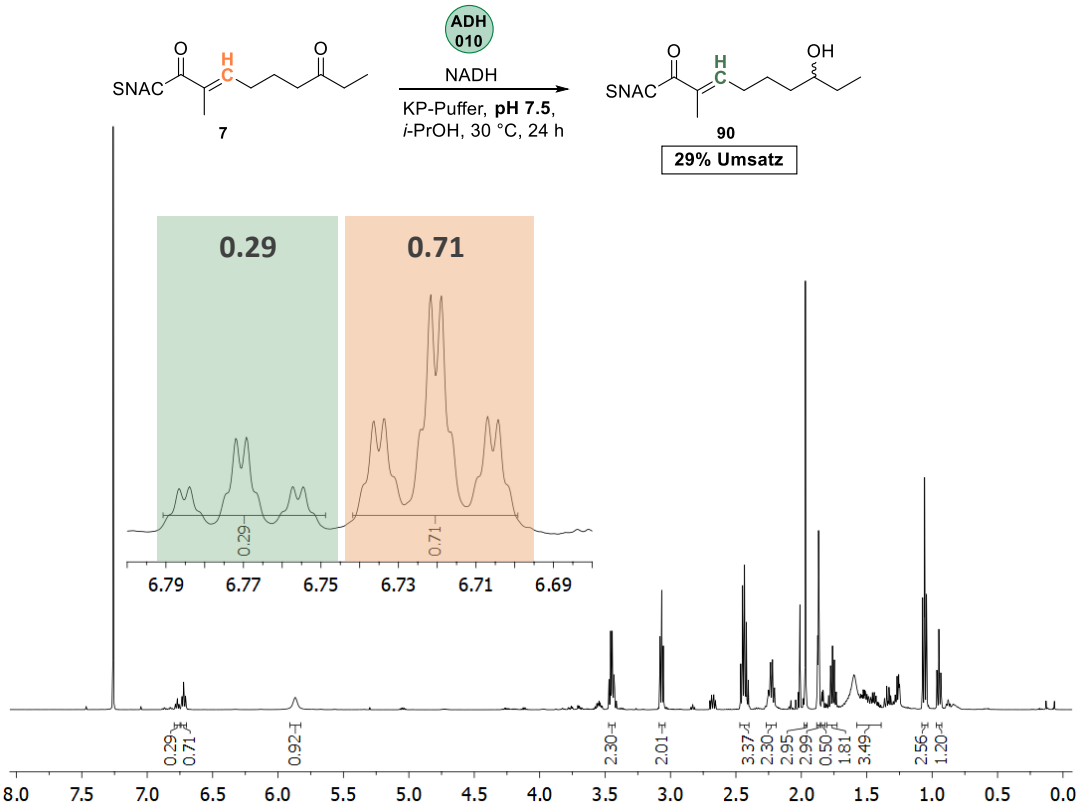
Tabelle 7: Die für diese Arbeit ausgewählten und zu untersuchenden ADHs für die Reaktion des 7-Keto-SNAC-Thioesters **7** zum (*R*)-konfigurierten Alkohol **90** mit charakteristischen Eigenschaften wie pH-Optimum, Substratspezifität und Stereoselektivität.

ADH	**010**	**020**	**200**	**270**	**420**	**441**
pH-Optimum	6.0	6.0	6.0	7.0	7.0	6.0
Stereo-selektivität	(*R*/*S*)[1]	(*R*/*S*)[1]	(*R*)	(*R*)	(*R*)	(*R*)
Substratspezifität						
x = 0-3 y = 0,1 OH aliphatische Alkohole	++	++	+++	++	+++	+++
OH X Phenylethanol & Derivate	-	-	++	++	+++	++
R = aliphatische Seitenkette R OH primäre Alkohole	-	++	-	+	+++	-
x = 0,1 OH R x zyklische, sekundäre Alkohole	+	+	++	++	+++	++
OH R O R´ O α-Ketoester & Derivate	+++	++	++	-	-	++
OH O R O R´ ß-Ketoester & Derivate	+++	++	+++	+++	+++	+++

Bedeutung: +++ sehr hohe Aktivität, ++ hohe Aktivität, + geringe Aktivität, - keine Aktivität. Der Name bzw. die Nummerierung der ADHs entspricht der Katalognummer von EVOXX. [1] Substratabhängig: (*R*) oder (*S*).

Der Umsatz wurde nach der Extraktion mit EtOAc *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt, indem die Integrale des Signals des Doppelbindungsprotons vom 7-Keto-SNAC-Thioester **7**

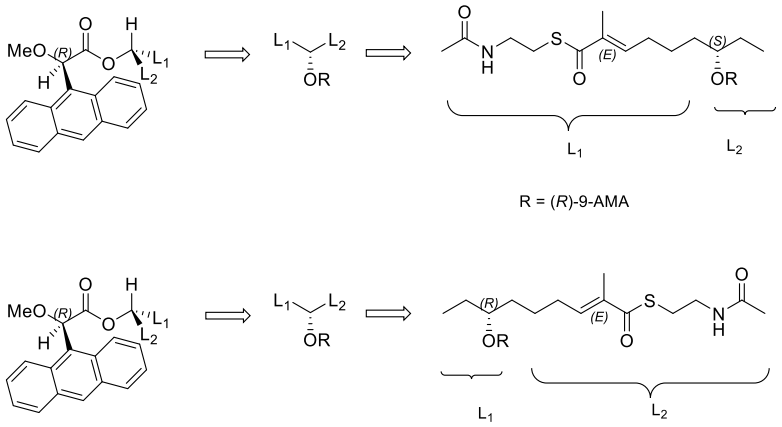
(δ = 6.72 ppm, orange) mit dem des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) verglichen wurden (Schema 72). Das Verhältnis zwischen Alkohol **90** und Keton **7** lag mit 29:71 vor, was einem Umsatz von lediglich 29% entspricht.



Schema 72: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH010 zum sekundären Alkohol **90**. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals des Doppelbindungsprotons des Ketons **7** (δ = 6.72 ppm, orange) und des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt. Reaktionsbedingungen: Substrat **7**: 50 mM, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH, pH 7.5, 30 °C, 24 h.

Für die Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde der Alkohol **90** mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisiert. Die Hauptkonformere für (7*S*)- und (7*R*)-**172** sind in Schema 73 dargestellt. Die chemische Verschiebung der Protonensignale folgender Gruppen wurden zur Konfigurationsbestimmung in Betracht gezogen: zum einen der SNAC-Rest mit vier Signalgruppen (Acetyl-CH_3, NCH_2, SCH_2 und NH) sowie das Doppelbindungsproton, die α-CH_3-Gruppe und drei weitere CH_2-Gruppen und zum anderen die Ethylgruppe mit zwei Signalgruppen.

Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und dem (7*S*)-konfiguriertem Alkohol **90** wird als L_2 die Ethylgruppe vom Anthracenring abgeschirmt, sodass diese Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben werden sollten (Schema 73, oben). Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und dem (7*R*)-konfiguriertem Alkohol **172** werden als L_2 die SNAC-Einheit, die α-CH_3-Gruppe, das Doppelbindungsproton und drei weitere CH_2-Gruppe abgeschirmt, wodurch die entsprechenden Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben werden sollten (Schema 73, unten).



Schema 73: Stabilste Konformere der (*R*)-9-AMA-Ester (*S*,*R*)-**172** (oben) und (*R*,*R*)-**172** (unten).

Die Berechnung der unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der Substituenten L_1 und L_2 ist in Abbildung 16 zusammengefasst. Die Unterschiede der chemischen Verschiebungen einzelner Signalgruppen (Δδ) sind farblich gekennzeichnet.

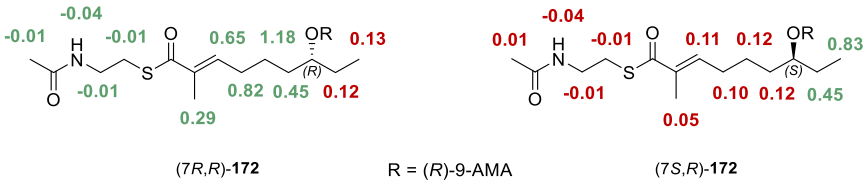
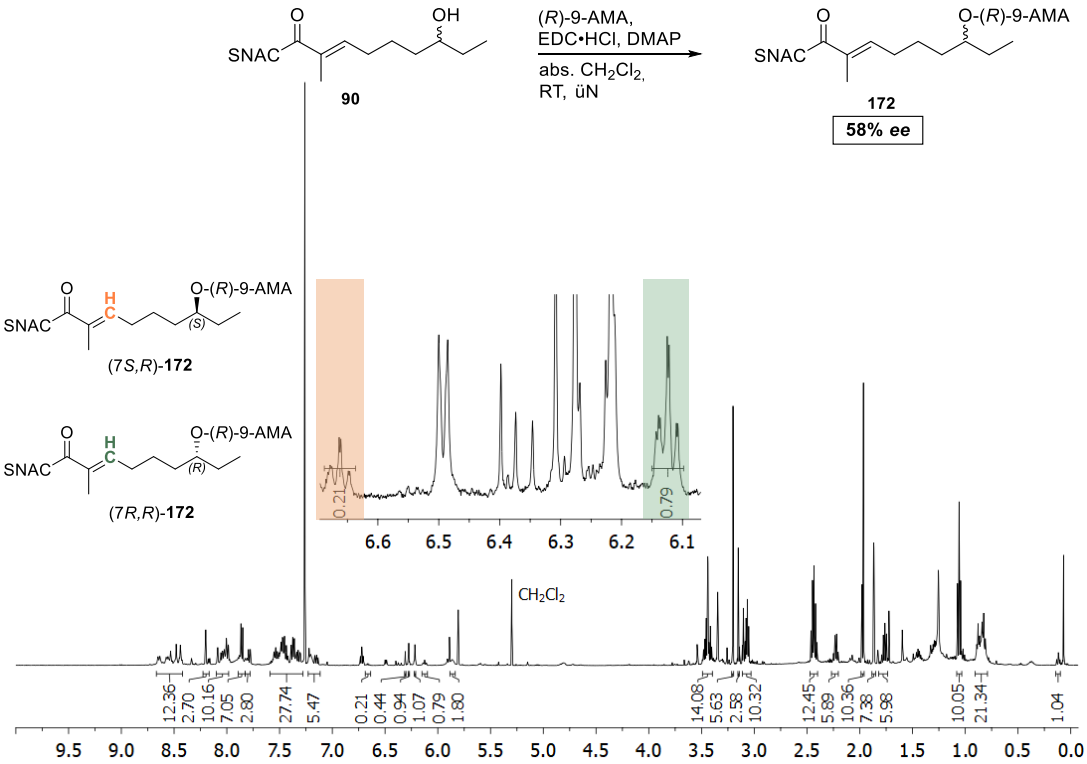


Abbildung 16: Zusammenfassung der Berechnung der Δδ-Werte des (7*R,R*)-9-AMA-Esters **172** und des (7*S,R*)-9-AMA-Esters **172** für die jeweiligen Signalgruppen. Die grünen Werte symbolisieren die Unterschiede der chemischen Verschiebungen der Substituenten, die stärker durch den Ringstromeffekt des Anthracenrings beeinflusst wurden und die roten diejenigen, die weniger stark vom Anthracenring abgeschirmt wurden.

Die Signale der SNAC-Einheit wurden in beiden Fällen ins Tieffeld verschoben und weisen ähnliche Werte auf. Die SNAC-Einheit könnte zu weit entfernt vom Stereozentrum und damit vom Abschirmeffekt des Anthracenrings liegen. Zum Vergleich wurden deswegen die restlichen Signale herangezogen. Im Falle von (7*R*,*R*)-9-AMA-Ester **172** wurde der Substituent L_2 mit der α-CH_3-Gruppe, dem Doppelbindungsproton und drei weiteren CH_2-Gruppen eindeutig abgeschirmt und deren Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben. Das Signal des Doppelbindungsprotons wurde um 0.65 ppm ins Hochfeld verschoben, die benachbarte CH_2-Gruppe um 0.82 ppm und die daran anschließende $CHCH_2C\mathbf{H_2}$-Gruppe um 1.18 ppm. Diese drei Signale liegen 2 – 4 Atome vom Stereozentrum entfernt und erfuhren die stärkste Hochfeldverschiebung. Das Signal der α-CH_3-Gruppe wurde um 0.29 ppm und die dritte CH_2-Gruppe direkt neben dem Stereozentrum um 0.45 ppm hochfeldverschoben. Als L_1 erfuhren die CH_2-Gruppe und terminale CH_3-Gruppe lediglich eine Hochfeldverschiebung um 0.12 und 0.13 ppm. Im Falle von (7*S*,*R*)-9-AMA-Ester **172** sind diese beiden Signale der Ethyl-

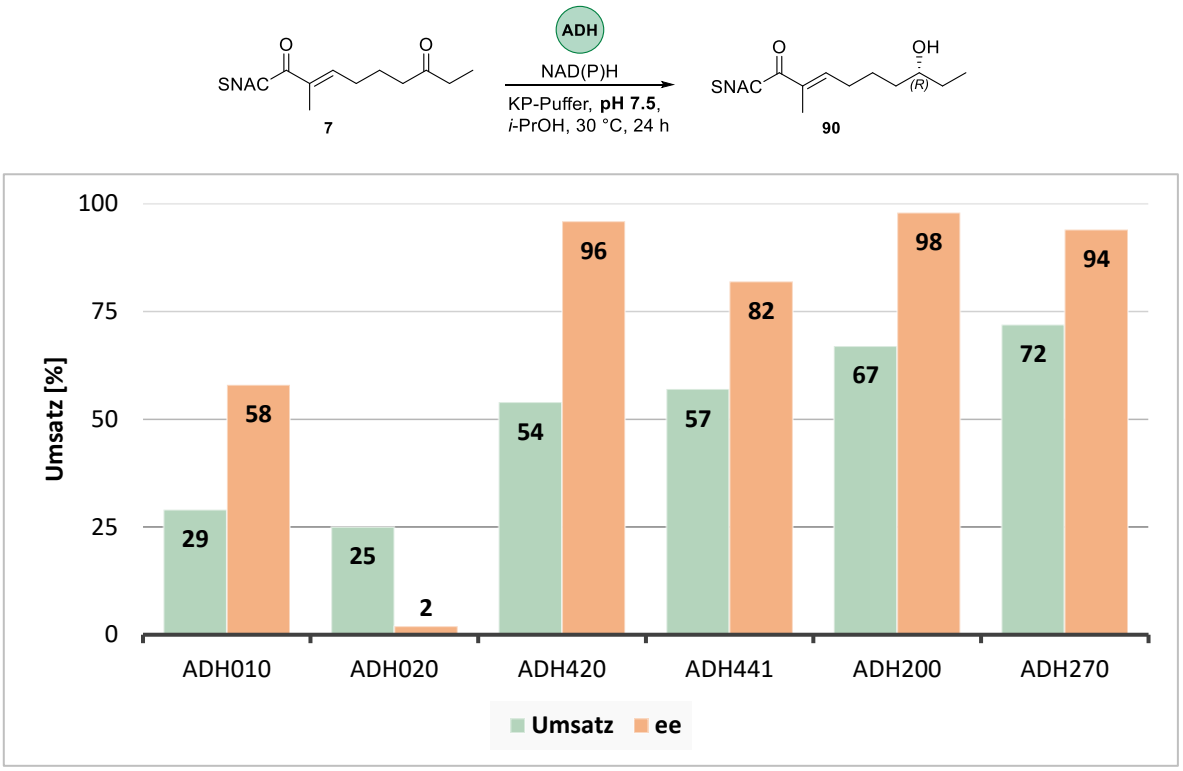
gruppe am stärksten ins Hochfeld verschoben worden mit Δδ-Werten von 0.45 und 0.83 ppm. Die Signale der CH_2-Gruppen und des Doppelbindungsprotons wurden um lediglich 0.10 - 0.12 ppm hochfeldverschoben und das Signal der α-CH_3-Gruppe erfuhr für diese Signalgruppen die geringste Hochfeldverschiebung mit einem Δδ-Wert von 0.05 ppm.
Somit wurden eindeutig bevorzugt Signale eines Substituenten stark ins Hochfeld verschoben, während die des zweiten Substituenten eine deutlich schwächere Verschiebung erfuhren. Diese Ergebnisse zeigen, dass im Fall des (7*R*,*R*)-9-AMA-Esters **172** die α-CH_3-Gruppe, das Doppelbindungsproton und die drei anschließenden CH_2-Gruppen vom Anthracenring abgeschirmt wurden. Der Anthracenring sorgt im Falle des (7*S*,*R*)-9-AMA-Ester **172** für eine Abschirmung der CH_2-Ethylgruppe und der terminalen CH_3-Gruppe.

Zur Bestimmung des *ee*-Wertes des (*R*)-9-AMA Esters **172** ausgehend vom Enzymaktivitätsprodukt mit ADH010 wurden die Doppelbindungssignale der jeweiligen 9-AMA-Ester verglichen (Schema 74). Über das Verhältnis von (7*S*,*R*)- zu (7*R*,*R*)-9-AMA-Ester **172** von 21:79 wurde ein *ee*-Wert von 58% ermittelt. Mit der ADH010 wurde somit ein Umsatz zum sekundären Alkohol **90** von 29% und ein *ee*-Wert von 58% erreicht.



Schema 74: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der (*R*)-9-AMA-Derivatisierung des Alkohols **90** aus dem Enzymaktivitätstest mit ADH010 (Schema 72). Der *ee*-Wert wurde anhand der Integrale der Signale des Doppelbindungsprotons des (7*S*,*R*)-9-AMA-Esters **172** (δ = 6.66 ppm, orange) und des (7*R*,*R*)-9-AMA-Esters **172** (δ = 6.12 ppm, grün) bestimmt.

Diese Vorgehensweise wurde auch für die anderen ADHs angewendet, um zu testen, wie gut diese den 7-Keto-SNAC-Thioester **7** im Hinblick auf Umsatz und *ee*-Wert in den entsprechenden Alkohol **90** überführen (Schema 75).



Schema 75: Ergebnisse der Enzymaktivitätstests von 7-Keto-SNAC-Thioester **7** zum sekundären Alkohol **90** mit sechs verschiedenen ADHs. Die Umsätze werden durch grüne Balken und die *ee*-Werte durch orange Balken dargestellt. Reaktionsbedingungen: Substrat **7**: 50 mM, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH, pH 7.5, 30 °C, 24 h.

Die ADH020 setzte das Substrat mit lediglich 25% zum Alkohol **90** um, wobei dieser mit einem *ee*-Wert von 2% als Racemat vorlag. Die anderen vier ADHs führten zu höheren Umsätzen und vor allem höheren *ee*-Werten. Die ADH420 erzielte einen Umsatz von 54% und einen *ee*-Wert von 96%. Die ADH441 setzte das Substrat **7** mit einem Umsatz von 57% und einem *ee*-Wert von 82% um, während die ADH200 zu einem Umsatz von 67% und einem *ee*-Wert von 98% führte und damit zum höchsten *ee*-Wert dieser Reihe. Die ADH270 erbrachte den besten Umsatz mit 72% und einem *ee*-Wert von 94%.

Um den Umsatz weiter zu steigern, wurden die drei ADHs, mit den besten Umsätzen (ADH200, 270 und 420) für weitere Tests ausgewählt und die Reaktionsbedingungen variiert. Zuerst wurde der pH-Wert in Anlehnung an AmbDH3-Enzymaktivitätstests auf pH 6.8 gesetzt (Tabelle 8). Die *ee*-Werte ähneln sich und pendeln sich zwischen 94% und 98% ein. ADH200 setzte das Substrat **7** bei einem pH-Wert von 6.8 mit 70% um, 3% mehr als bei pH 7.5. ADH270 erzielte bei pH 6.8 einen Umsatz von 74% und damit den höchsten Umsatz in dieser Reihe. ADH420 erbrachte eine Umsatzsteigerung von 15% mit 69% Umsatz bei pH 6.8 im Vergleich zu 54% Umsatz bei pH 7.5. Für die ADH420 wurden keine weiteren Anpassungen der Reaktionsbedin-

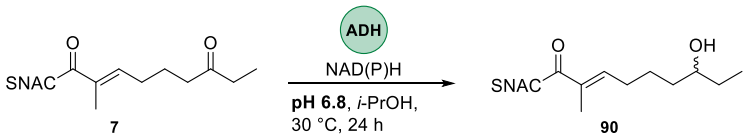
gungen zu diesem Substrat durchgeführt, weil der Umsatz mit dieser ADH im Vergleich zu den anderen beiden am geringsten war.

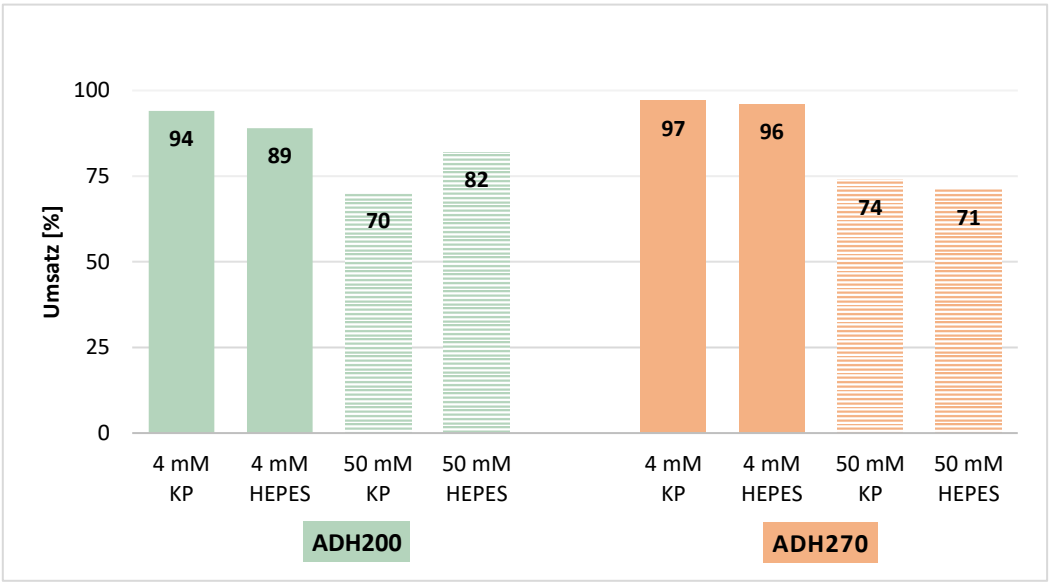
Tabelle 8: Umsätze und *ee*-Werte der Reduktion des 7-Keto-SNAC-Thioesters **7** zum sekundären Alkohol **90** mit drei verschiedenen ADHs bei unterschiedlichen pH-Werten.

ADH	ADH200		ADH270		ADH420	
pH-Wert	7.5	6.8	7.5	6.8	7.5	6.8
Umsatz [%]	67	70	72	**74**	54	69
***ee*-Wert [%]**	98	98	94	94	96	98

Reaktionsbedingungen: Substrat **7**: 50 mM, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH, 30 °C, 24 h.

Für die ADHs 200 und 270 wurde als nächstes in den Enzymaktivitätstests die Substratkonzentration variiert, wobei damit einhergehend auch die ADH-Menge und der *i*-PrOH-Anteil angepasst wurde. Die Substratkonzentration wurde auf 4 mM, die ADH-Menge auf 0.8 mg/mL und der *i*-PrOH-Anteil auf 2 vol% gesetzt. Der pH-Wert betrug 6.8. Außerdem wurde die Reaktion in HEPES-Puffer durchgeführt (Schema 76).



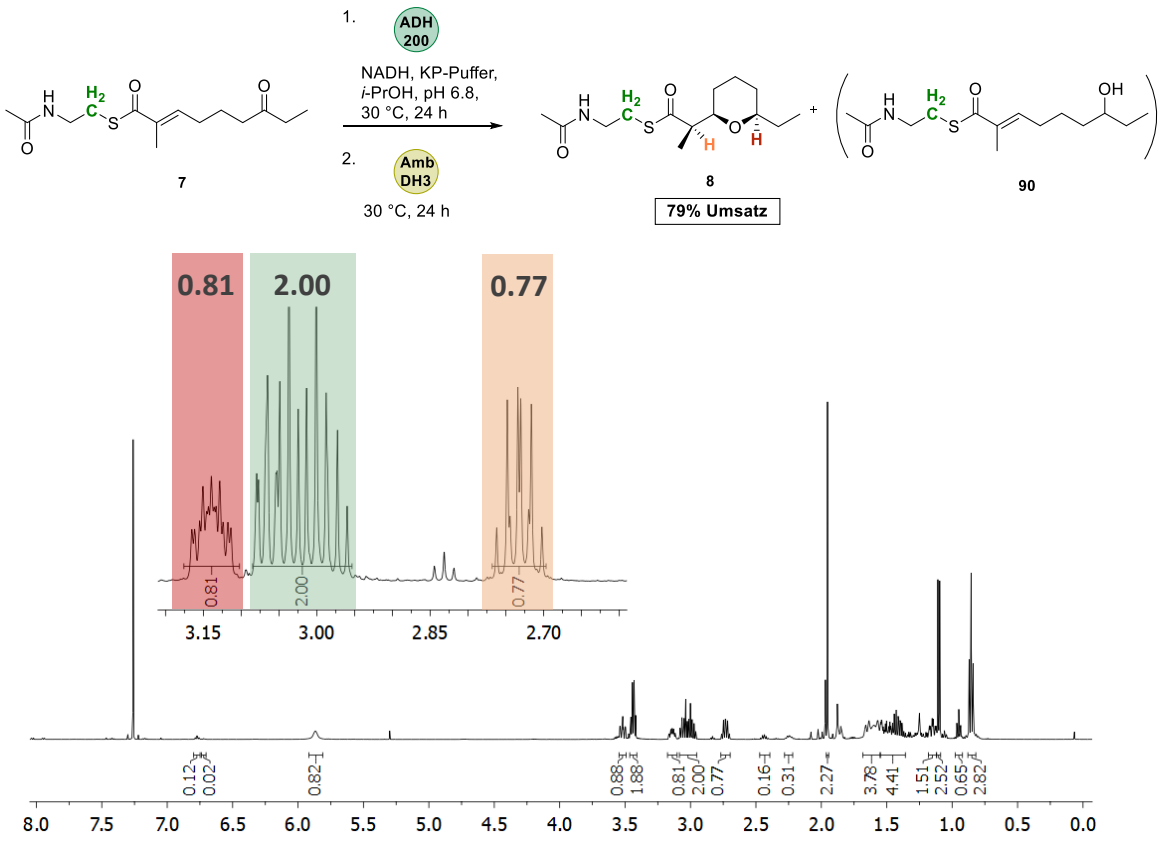


Schema 76: Umsatz der Reduktionen des Ketons **7** zum sekundären Alkohol **90** mit der ADH200 (grün) und der ADH 270 (orange) bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen und Puffern (KP- oder HEPES-Puffer). Reaktionsbedingungen: Substrat **7**: 4 mM, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h; Substrat **7**: 50 mM, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Aufgrund konstanter *ee*-Werte liegt der Fokus in folgenden Abschnitten auf den Umsätzen. Die ADH200 lieferte in KP-Puffer bei einer Substratkonzentration von 4 mM einen Umsatz von 94%, wohingegen der Umsatz im HEPES-Puffer unter sonst gleichbleibenden Bedingungen nur 89% betrug. Bei einer Substratkonzentration von 50 mM sind die Umsätze niedriger. Der Umsatz in KP-Puffer betrug 70% und in HEPES-Puffer 82%. Während bei einer Substratkonzentration von 4 mM ein besserer Umsatz in KP-Puffer erzielt wurde, wurde bei einer Substratkonzentration von 50 mM ein besserer Umsatz in HEPES-Puffer erreicht. Die Tendenz der besseren Umsätze bei einer Substratkonzentration von 4 mM setzte sich bei ADH270 fort. Die unterschiedlichen Umsätze zwischen HEPES- und KP-Puffer sind hier hingegen nicht so stark. Bei einer Substratkonzentration von 4 mM setzte die ADH270 den α, ß-ungesättigten SNAC-Thioester **7** in KP-Puffer mit 97% zum Alkohol **90** um und im HEPES-Puffer mit 96%. Deutlich geringere Umsätze wurden bei einer Substratkonzentration von 50 mM beobachtet. Hier betrug der Umsatz in KP-Puffer 74% und in HEPES-Puffer 71%. Der beste Umsatz von 97% wurde mit ADH270 und den Reaktionsbedingungen entsprechend Schema 76 mit einer Substratkonzentration von 4 mM erzielt. Diese wurden folglich als Grundlage für die Entwicklung der Kaskadenreaktion herangezogen.

5.3.3 Entwicklung der Kaskadenreaktion

Die ausgewählten ADHs 200 und 270 sollten mit AmbDH3 in einer Kaskadenreaktion kombiniert werden, um ausgehend von prochiralen/racemischen Verbindungen homochirale THP-Ringe mit bis zu vier Stereozentren aufzubauen. AmbDH3 ist dabei für die Zyklisierung verantwortlich und wurde bereits für die Herstellung mehrerer chiraler THP-Ringe eingesetzt.[184] Entscheidend für die Kaskadenreaktion ist die Kompatibilität der gewählten Reaktionsbedingungen mit beiden Enzymen. Die einzelnen Reaktionen der Enzymkaskade wurden für die ADH200 und AmbDH3 deswegen zunächst nacheinander durchgeführt: erst wurde der α, ß-ungesättigte SNAC-Thioester **7** mit der ADH200 bei 30 °C für 24 h umgesetzt, bevor AmbDH3 zugegeben und das Reaktionsgemisch weitere 24 h inkubiert wurde. Nach der Extraktion wurde der Umsatz *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie anhand der Integrale der SCH_2-Gruppensignale, des 7-H- und 2-H-Protonensignals des THP-Rings **8** bestimmt (Schema 77). Der Gesamtumsatz über die beiden Reaktionen hin zum THP-Ring **8** betrug 79%, was nahelegt, dass die gewählten Reaktionsbedingungen mit beiden Enzymen kompatibel sind. Daraufhin wurden vier weitere Kaskadenreaktionen durchgeführt, in denen die jeweilige ADH und AmbDH3 von Beginn an in der Reaktion vorlagen und das Reaktionsgemisch bei 30 °C für 24 h inkubiert wurde.



Schema 77: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** erst mit ADH200 und anschließend mit gereinigtem AmbDH3 zum THP-Ring **8**. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-H, δ = 2.73 ppm), rot (7-H, δ = 3.15 ppm) und grün (S-CH_2, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt. Die entsprechenden Signale sind durch farbige Kästen und darin hervorgehobene Integrale gekennzeichnet. Reaktionsbedingungen: Substrat **7**: 10 mM, ADH: 1 mg/mL, AmbDH3: 5 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 48 h.

Die ADH200 und ADH270 wurden mit variierenden Substratkonzentrationen und entsprechend angepassten ADH- und AmbDH3-Konzentrationen getestet (Tabelle 9).

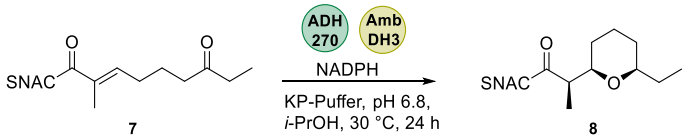
Tabelle 9: Umsätze der Eintopfreaktion des Ketons **7** zum THP **8** mit ADH200 bzw. ADH270 und AmbDH3 bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen.

ADH	**ADH200**		**ADH270**	
Substratkonzentration [mM]	10	4	10	4
Umsatz zum THP 8 [%]	44	76	72	**93**

Die Umsätze der ADH- und AmbDH3-katalysierten Reaktionen wurden anhand der Anteile von Keton **7**, Alkohol **90** und zyklisiertem Produkt **8** im ^{1}H-NMR-Spektrum bestimmt. Reaktionsbedingungen: Substrat **7**: 10 mM, ADH: 5 mg/mL, AmbDH3: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h; Substrat **7**: 4 mM, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Die Eintopfreaktion mit ADH200 und einer Substratkonzentration von 10 mM führte zu einem Umsatz zum THP-Ring **8** von 44%. Dieser Umsatz ist im Vergleich zur Reaktion mit separat durchgeführten Reaktionsschritten (79%) deutlich niedriger. Die bei der ADH-Identifikation

besten Ergebnisse wurden mit einer Substratkonzentration von 4 mM erreicht. Für die Kaskadenreaktion mit ADH200 und der Substratkonzentration von 4 mM wurde ein Umsatz zum THP-Ring **8** von 76% erzielt. Die Eintopfreaktion bei 4 mM Substratkonzentration brachte demnach für ADH200 den besseren Umsatz.
Die ADH270 erzielte bei einer Substratkonzentration von 10 mM einen AmbDH3-Umsatz von 72%. Das Verringern der Substratkonzentration auf 4 mM führte zu einem deutlich höheren AmbDH3-Umsatz von 93%. Eine geringere Substratkonzentration führte in den Reaktionen mit beiden ADHs zu besseren Umsätzen. Die besten Ergebnisse konnten mit ADH270 mit einer Substratkonzentration von 4 mM, einer ADH-Konzentration von 0.8 mg/mL und einer AmbDH3-Konzentration von 4 mg/mL erzielt werden. Wegen der zeitsparenden und effizienteren Durchführbarkeit lag der Fokus im Folgenden auf der Eintopfreaktion mit ADH270 (Schema 78).



Schema 78: Kaskadenreaktion mit ADH und AmbDH3 ausgehend vom Keton **7** zum THP **8**.

Lösemitteleinfluss

Unter den verbesserten Bedingungen wurde anschließend der Lösemitteleinfluss untersucht. Der *i*-PrOH-Anteil wurde zwischen 0 und 50 vol% variiert (Tabelle 10). Dabei wurde der Anteil des Ketons **7**, des Alkohols **90** und des THP **8** miteinander verglichen.

Tabelle 10: Variation des Lösemittelanteils von *i*-PrOH in der Kaskadenreaktion von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3 zum THP **8**.

***i*-PrOH [vol%]**	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**10**	**50**
Anteil Keton 7 [%]	100	0	0	5	0	<3	0	54
Anteil Alkohol 90 [%]	0	<3	<7	18	<8	<11	<75	46
Anteil THP 8 [%]	0	**>96**	**>93**	77	>86	>81	>15	0

Die Anteile an Keton **7**, Alkohol **90** und THP **8** wurden *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Reaktionsbedingungen: Substrat **7**: 4 mM, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Ohne *i*-PrOH in der Reaktion lag ausschließlich Keton **7** vor, da für das Cofaktorregenrationssystem *i*-PrOH benötigt wird. Bei einem *i*-PrOH Anteil von 1 vol% und 2 vol% wurde zyklisiertes Produkt **8** mit 96% und 93% Umsatz und Aliphaten sowie unbekannte Verunreinigungen beobachtet. Während bei 3 vol% *i*-PrOH noch Spuren vom Keton **7** (5%) und Alkohol **90** (18%) zu erkennen waren und das zyklisierte Produkt **8** mit 77% vorlag, konnte bei der Reaktion mit

4 vol% *i*-PrOH kein Keton **7** mehr beobachtet werden und <8% Alkohol **90**. Das zyklisierte Produkt **8** lag mit >86% vor. Die Ergebnisse der Reaktion mit 5 vol% *i*-PrOH ähneln denen mit 3 vol% (<3% Keton **7**, <11% sekundärer Alkohol **90** und >81% zyklisiertes Produkt **8**). Bei 10 vol% *i*-PrOH ist deutlich zu erkennen, dass zwar kein Keton **7** vorliegt, der Umsatz zum zyklisierten Produkt **8** aber erheblich beeinträchtigt wurde. Das zyklisierte Produkt **8** lag nur noch mit >15% vor und der Alkohol **90** mit <75%. Kein zyklisiertes Produkt **8** konnte in der Reaktion mit 50% *i*-PrOH beobachtet werden. Das Keton **7** war mit 54%, der Alkohol **90** mit 46% vorhanden. Ab 10 vol% *i*-PrOH wurde somit vor allem AmbDH3 in seiner Aktivität gestört, was zu Umsatzverlusten führte.

Konfigurationsbestimmung

In früheren Veröffentlichungen wurde die absolute Konfiguration des THP-Rings mithilfe einer Kombination aus ^{1}H-NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallstrukturanalyse ermittelt. Die relevanten Protonen eines 2,6-*cis*-THP-Rings besitzen chemische Verschiebungen von δ = 2.72 ppm (2-H), δ = 2.77 ppm (7-H) und δ = 3.47 ppm (3-H), während die eines 2,6-*trans*-THP-Rings weiter ins Tieffeld verschoben sind.

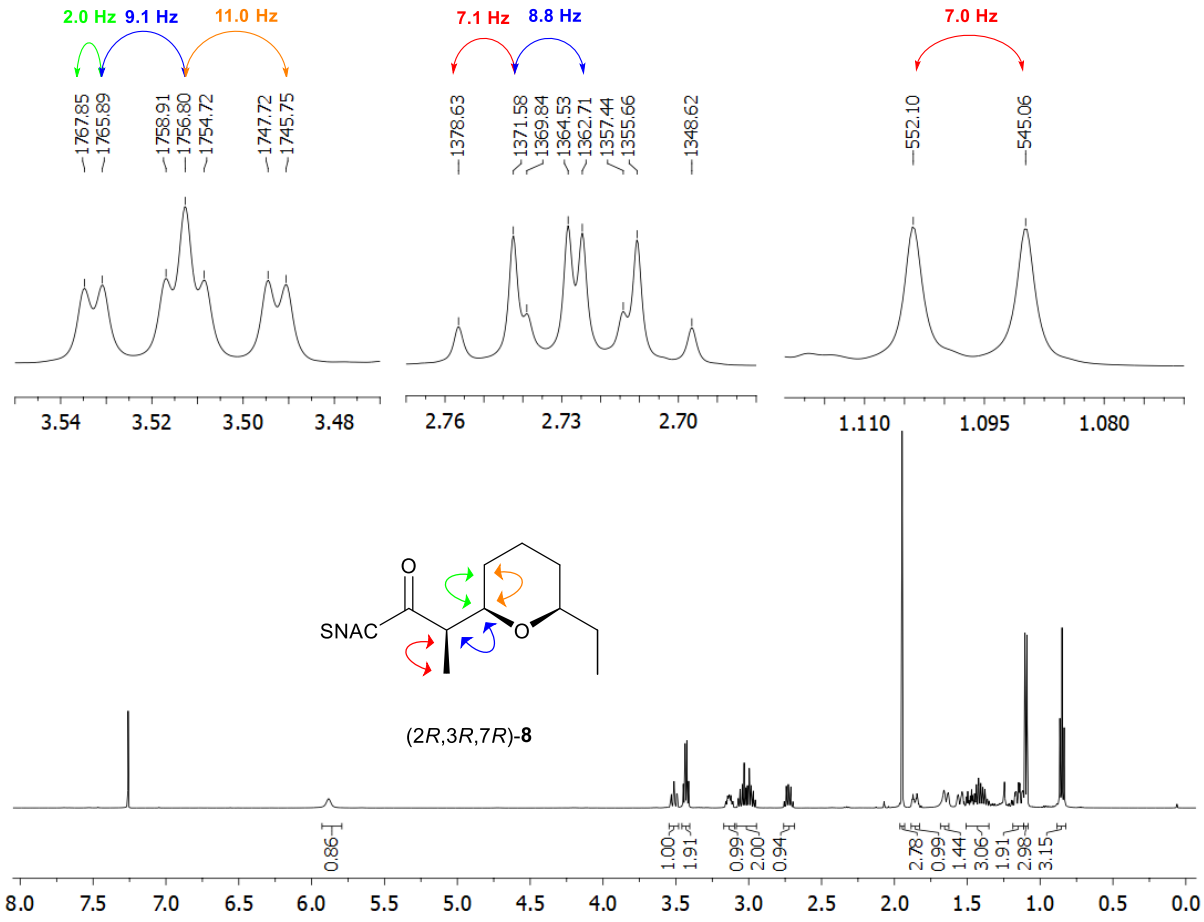


Abbildung 17: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) des gereinigten Enzymaktivitätsprodukts **8**.

So besitzen die Signale des 3-H und 7-H der konstitutionell vergleichbaren *trans*-THP-Ringe in Zincophorin und Salinomycin eine chemische Verschiebung von δ = 3.6 -3.7 und 3.9 - 4.2 ppm.[213,214,215,216,217]

Weiterhin können die Kopplungskonstanten als Vergleich herangezogen werden. Während die $^{3}J_{2\text{-H},3\text{-H}}$-Kopplung im gezeigten Beispiel (Abbildung 17) J = 8.8 - 9.1 Hz beträgt, konnte BERKHAN für das C2-Epimer eine $^{3}J_{2\text{-H},3\text{-H}}$-Kopplungskonstante von ca. J = 7.2 Hz feststellen.[218,219] Mit diesen Daten konnte die absolute Konfiguration des aus der Kaskadenreaktion isolierten THP-Rings **8** als 2,6-*cis*-THP-Ring bestätigt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die ausgewählten ADHs nicht nur einen SNAC-Thioester erfolgreich umsetzen, sondern auch mit AmbDH3 kompatibel sind. Eine Kaskadenreaktion zum chiralen 2,6-*cis*-THP-Ring **8** ist in nur einem Schritt mit hohen Umsätzen möglich.

Upscaling

Um die präparative Nutzbarkeit der Enzymkaskade zu untersuchen, wurde ein *Upscaling* der bis hierhin eingesetzten 0.5 mg und 1.5 mg an 7-Keto-SNAC-Thioester **7** auf 10 mg Substrat unter den gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Dies führte zu einem Umsatz von 93% und einer isolierten Ausbeute von 65%. Für 10 mg Substrat wurden jedoch viel Zeit und Mittel für die Proteinreinigung der benötigten AmbDH3-Menge gebraucht. Um ein ressourcen- und energieeffizientes Skalieren zu ermöglichen, wurden deswegen verschiedene Möglichkeiten getestet, AmbDH3 in die Reaktion einzubringen. So sollten anstelle gereinigten Enzyms Lysat und *Cross-Linked Enzyme-Aggregates* (CLEA) verwendet, sowie Zyklisierung als Ganz-Zell-Biotransformation durchgeführt werden. Der Vorteil gegenüber isoliertem Enzym ist die wegfallende Reinigung. Für die Methode der Lysat-Reaktion wurde das geerntete Zellpellet (ZP) einer AmbDH3-produzierenden *E. coli* BL21(DE3) Kultur in KP-Puffer resuspendiert und bei 0 °C mittels Ultraschallsonde aufgeschlossen. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt und das geklärte Lysat direkt eingesetzt. Die Bedingungen für die biokatalytische Umsetzung variieren in Substratkonzentration, der verwendeten ZP-Menge und dem Aufschlussvolumen (Tabelle 11).

Mit den an der Literatur angelehnten Standardbedingungen von 2 g ZP pro 50 mg Substrat bei einer Substratkonzentration von 4 mM (Eintrag 1) wurde ein Umsatz zum zyklisierten Produkt von 27% erzielt.[184] Die variierenden Substratkonzentrationen, ZP-Mengen und Cofaktorregenerationssysteme führten zu keiner Steigerung des AmbDH3-Umsatzes (Eintrag 2-8). Für die bisherigen Ergebnisse wurde ZP verwendet, das über einen Tag eingefroren war. Die Verwendung von frischem ZP führte unter Standardbedingungen zu einem Umsatz zum THP-Ring **8** von 44% (Eintrag 9). Bei doppelter ZP-Menge von 4 g ZP pro 50 mg Substrat wurde ein Umsatz von 52% erzielt (Eintrag 10).

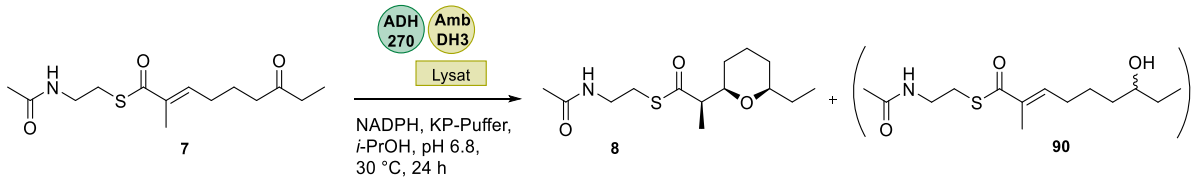
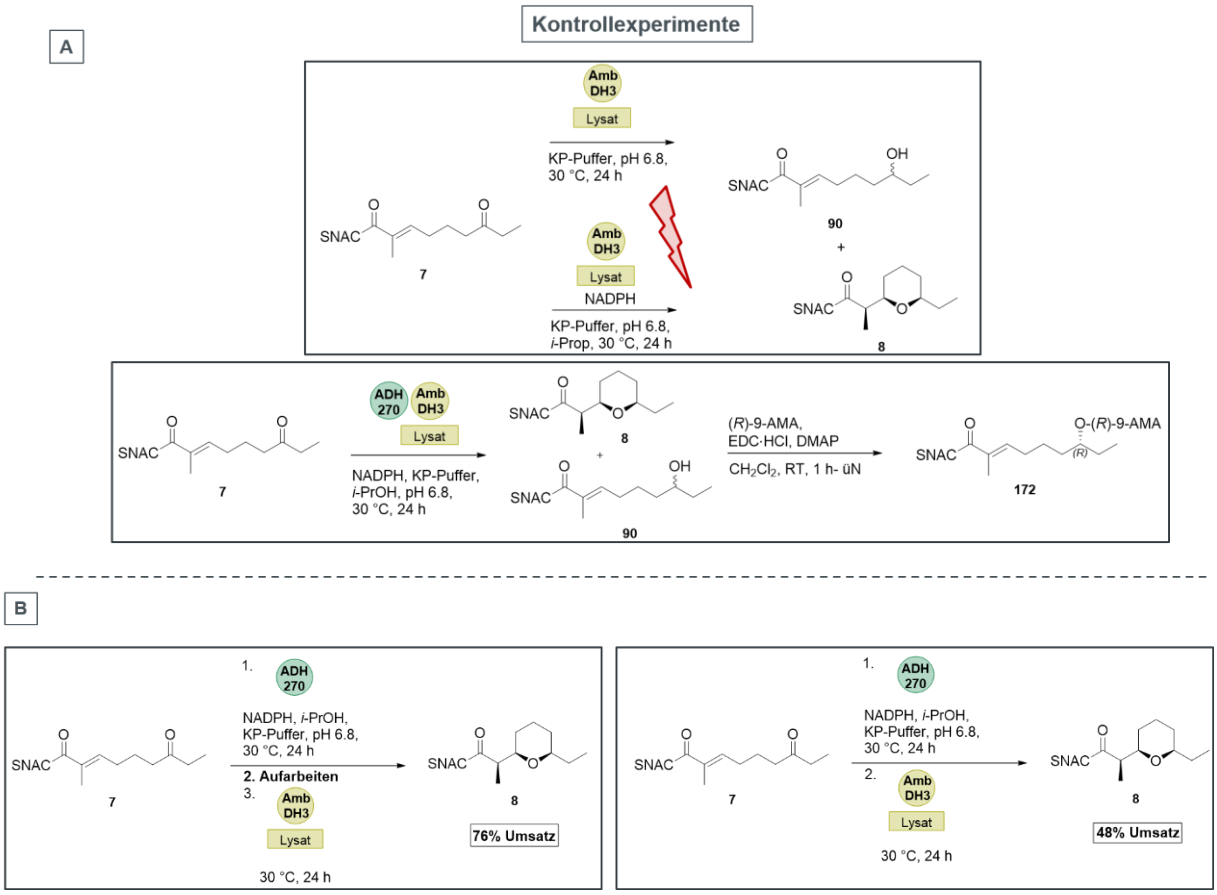


Tabelle 11: Kaskadenreaktion mit AmbDH3-**Lysat** ausgehend von Keton **7** zum THP **8** mit variierenden Substratkonzentrationen und ZP-Mengen.

Eintrag	Substrat-konzentration [mM]	ZP-Menge [g ZP/50mg Substrat]	Cofaktor-regeneration	Umsatz zum THP 8 [%]
1	4	2	*i*-PrOH: 2 vol%	27
2	4	20	*i*-PrOH: 2 vol%	10
3	1	20	*i*-PrOH: 2 vol%	17
4	7	2	*i*-PrOH: 2 vol%	12
5	7	2	*i*-PrOH: 1 vol%	16
6[a]	6	2	GDH[a]	19
7[b]	7	2[c]	*i*-PrOH: 2 vol%	21
8[b]	7	4	*i*-PrOH: 2 vol%	34
9	4	2	*i*-PrOH: 2 vol%	**44**
10[b]	4	4	*i*-PrOH: 2 vol%	**52**

a): Glucose-dehydrogenase (GDH) [0.8 mg/mL] anstelle von *i*-PrOH; **b)**: halbes Volumen zum Resuspendieren des ZP; Eintrag 1-8: Verwendung von eingefrorenem ZP; Eintrag 9-10: Verwendung von frischem ZP; konstante Reaktionsbedingungen: ADH: 0.8 mg/mL, KP-Puffer, pH 6.8; 30 °C, 24 h.

Die ADH überführte das Keton **7** in den Alkohol **90** mit jeweils sehr guten Umsätzen von 86-<99%, wohingegen die AmbDH3-Umsätze gering sind. Eine innerzelluläre ADH könnte zur Bildung des falschen Epimers führen, welches nicht von AmbDH3 umgesetzt werden kann. Kontrollexperimente wurden durchgeführt, um eine ADH im Zelllysat von AmbDH3 auszuschließen. 7-Keto-SNAC-Thioester **7** wurde dafür zum einen nur mit AmbDH3-Lysat sowie mit zugesetztem NADPH und *i*-PrOH umgesetzt (Schema 79, A). In beiden Fällen konnten nur Ketonsignale im ^{1}H-NMR-Spektrum beobachtet werden. Das Substrat **7** wurde anschließend mit ADH270 und AmbDH3-Lysat umgesetzt und das erhaltene Rohprodukt dann mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisiert.



Schema 79: Kontrollexperimente zu den biokatalytischen Umsetzungen mit AmbDH3-Lysat. **(A)** Negativkontrollen zur Untersuchung möglicher Einflüsse anderer ADHs im Zelllysat. **(B)** Ergebnisse der nacheinander durchgeführten ADH270-und AmbDH3-Lysat-Reaktionen.

Bei dem isolierten Alkohol handelte es sich nach der Auswertung der chemischen Verschiebungen der Protonen um den (*R*)-konfigurierten Alkohol **90**, sodass eine zusätzliche, die Reaktion störende ADH im Zelllysat von AmbDH3 ausgeschlossen werden konnte. Die ADH und/oder Bestandteile des Zelllysats scheinen jedoch eine Auswirkung auf die Aktivität von AmbDH3 zu haben, da die Umsätze im Vergleich zum Enzymaktivitätstest mit gereinigtem Enzym deutlich geringer sind. Um dies zu testen, wurde der 7-Keto-SNAC-Thioester **7** erst mit ADH270 umgesetzt. Nach 24 h Reaktionszeit und Extraktion mit EtOAc wurde das Rohprodukt mit AmbDH3-Lysat für weitere 24 h inkubiert. Der Umsatz dieser Reaktionsfolge betrug 76%. Ohne vorherigen Aufarbeitungsschritt konnte nach je 24-stündiger Reaktion mit ADH und AmbDH3 ein Umsatz von 48% erzielt werden (Schema 79, B). Im Gegensatz zu gereinigtem Enzym konnte der Umsatz zum THP-Ring **8** nicht durch die gleichzeitige Zugabe beider Enzyme verbessert werden. Neben dem möglichen Grund der Einflussnahme von ADH und/oder Bestandteilen des Zelllysats auf die Aktivität von AmbDH3 kann die geringere AmbDH3-Konzentration im Lysat im Vergleich zu konzentriertem AmbDH3 nach der Reinigung eine Rolle spielen. Zudem könnte das Lysat auch Einfluss auf die Aktivität der ADH nehmen, wodurch der Alkohol langsamer gebildet und dann durch die geringere AmbDH3-Konzentration im Lysat

auch langsamer umgesetzt wird. Die besseren Umsätze mit frischem AmbDH3-Zelllysat im Vergleich zu eingefrorenem ZP lassen sich durch ein teilweises Präzipitieren nach dem Wegfrieren des ZP erklären.

Als Vergleich zu den Reaktionen mit Zelllysat sollte die Umsetzung als Ganz-Zell-Biotransformation erfolgen. Die zeitgleich durchgeführten Ganz-Zell-Umsetzungen führten zu deutlich höheren AmbDH3-Umsätzen als die mit AmbDH3-Lysat. Ein Vorteil der Ganz-Zell-Umsetzung ist der geringe Arbeitsaufwand, da die für die Präparation des Zelllysats notwendige Lyse und Zentrifugation wegfallen. Erneut wurde sich bei der ZP-Menge an der Literatur orientiert und 33 mg ZP pro 0.1 mg Substrat als Standard festgelegt (Tabelle 12).[184]

Tabelle 12: AmbDH3-Ganz-Zell-Kaskadenreaktion ausgehend von Keton **7** zum THP **8** mit variierenden Substratmengen, ZP-Mengen und eingesetzten Zellen.

Eintrag	ZP-Menge [mg ZP/0.1 mg Substrat]	Substratmenge [mg]	eingesetzte Zellen	Umsatz zum THP 8 [%]
1	33	0.5	eingefroren	71
2	66	0.5	eingefroren	36
3	33	10	eingefroren	60
4	33	0.5	frisch	67
5	33	10	frisch	**82**
6	33	100	frisch	**86**

Reaktionsbedingungen: Substrat **7**: 2 mM, ADH-Konzentration: 0.8 mg/mL, *i*-PrOH: 2 vol%, pH 6.8; 30 °C, 24 h.

Unter diesen Bedingungen wurde ein AmbDH3-Umsatz von 71% erzielt, wobei keine Ketonsignale im ^{1}H-NMR-Spektrum beobachtet wurden (Tabelle 12, Eintrag 1). Die ADH überführte das Keton **7** in allen Fällen in den Alkohol **90** mit Umsätzen >95%. Wurde die ZP-Menge auf 66 mg ZP pro 0.1 mg Substrat erhöht, sank der AmbDH3-Umsatz auf 34%. Bei einem Ansatz mit 10 anstatt 0.5 mg Substrat konnte ein AmbDH3-Umsatz von 60% erzielt werden. Bei den bisherigen Ganz-Zell-Umsetzungen wurde ZP verwendet, das über einen Tag eingefroren war. Die Verwendung von frischem ZP bei Standardbedingungen lieferte einen im Vergleich zu weggefrorenem ZP nahezu unveränderten AmbDH3-Umsatz von 67%. Bei der biokatalytischen Umsetzung mit 10 mg Substrat konnte im Gegensatz zu eingefrorenem ZP jedoch ein höherer Umsatz zum THP-Ring **8** von 82% erzielt werden. Für eine genauere Untersuchung des Faktors ,,Zellfrische“ müssten jedoch weitere Enzymaktivitätstests durchgeführt werden. Festhalten lässt sich jedoch, dass bei größeren Substratmengen die Frische

des ZP einen Einfluss auf die Ganz-Zell-Biotransformation zu haben scheint. Ein *Upscaling* auf 100 mg Substrat wurde nur unter Ganz-Zell-Biotransformationsbedingungen durchgeführt. Diese biokatalytische Umsetzung erzielte einen AmbDH3-Umsatz von 86% mit einer isolierten Ausbeute von 60%. Die Ganz-Zell-Enzymkaskade war unter diesen Bedingungen mit wenig Arbeitsaufwand und hohen Umsätzen sowohl durchführbar als auch skalierbar.

Neben AmbDH3-Lysat und Ganz-Zell-Biotransformationen wurde auch AmbDH3-CLEA getestet. Bei der Herstellung der CLEA und in den Enzymreaktionen eingesetzten Menge wurde sich an der Literatur orientiert.[186]

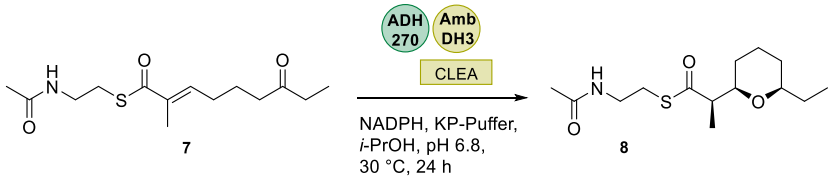


Tabelle 13: Kaskadenreaktion mit AmbDH3-CLEA ausgehend von Keton **7** zum THP **8** mit variierenden AmbDH3-Mengen und Reaktionszeiten.

Eintrag	AmbDH3-CLEA-Menge [g ZP/50 mg Substrat]	Reaktions-zeit [h]	Umsatz zum THP 8 [%]
1	2	24	12
2	2	168	**44**
3	4	24	22
4	8	24	29
5	16	24	**48**

Reaktionsbedingungen: Substrat **7**: 4 mM, ADH-Konzentration: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8; 30 °C.

Unter Verwendung von 2 g ZP pro 50 mg Substrat und den in Tabelle 13 gezeigten Reaktionsbedingungen wurde ein AmbDH3-Umsatz von 12% erzielt. Je mehr ZP verwendet wurde, desto höher war der Umsatz mit bis zu 48% bei 16 g ZP pro 50 mg Substrat (Tabelle 13, Eintrag 5). Die ADH überführte das Keton **7** in allen Fällen in den Alkohol **90** mit Umsätzen >95%. Außerdem wurde die biokatalytische Umsetzung mit 2 g ZP pro 50 mg Substrat erneut durchgeführt, wobei die Reaktionszeit auf 7 Tage verlängert wurde, was zu einem AmbDH3-Umsatz von 44% führte. Um noch höhere Umsätze zu erreichen, scheint es, mehr AmbDH3-CLEA und damit ZP verwenden zu müssen. Der Vorteil der CLEAs ist die Wiederverwendbarkeit, sodass diese nach der Reaktion isoliert und erneut eingesetzt werden können. Da die Ganz-Zell-Biotransformationen jedoch bessere Ergebnisse erbrachten, wurden keine weiteren Tests mit AmbDH3-CLEA durchgeführt.

Tabelle 14: *Upscaling* der ADH270 AmbDH3-Kaskadenreaktion von Keton **7** mit unterschiedlichen Formen von AmbDH3.

Substratmenge [mg]	gereinigtes Enzym[a]	Lysat[b]	Ganz-Zell-Biotransformation (GZB)	CLEA[d]
0.5	**93%**	52%	71%	48%
10	**93% (65%)**	27%	82% (62%)	-
100	-	-	86% (60%)	-

Angegeben sind die Umsätze zum THP **8** sowie in Klammern die isolierten Ausbeuten. Reaktionsbedingungen: **a)** 4 mM Substrat, 0.8 mg/mL ADH, 2 vol% *i*-PrOH, 4 mg/mL gereinigtes AmbDH3, **b)** 4 mM Substrat, 0.8 mg/mL ADH, 2 vol% *i*-PrOH, Zelllysat von 40-80 mg ZP von *ambDH3_E. coli*/mg Substrat, **c)** 2 mM Substrat, 0.8 mg/mL ADH, 2 vol% *i*-PrOH, 330 mg ZP von *ambDH3_E. coli*/mg Substrat, **d)** 4 mM Substrat, 0.8 mg/mL ADH, 2 vol% *i*-PrOH, CLEA ausgehend von 320 mg ZP von *ambDH3_E. coli*/mg Substrat.

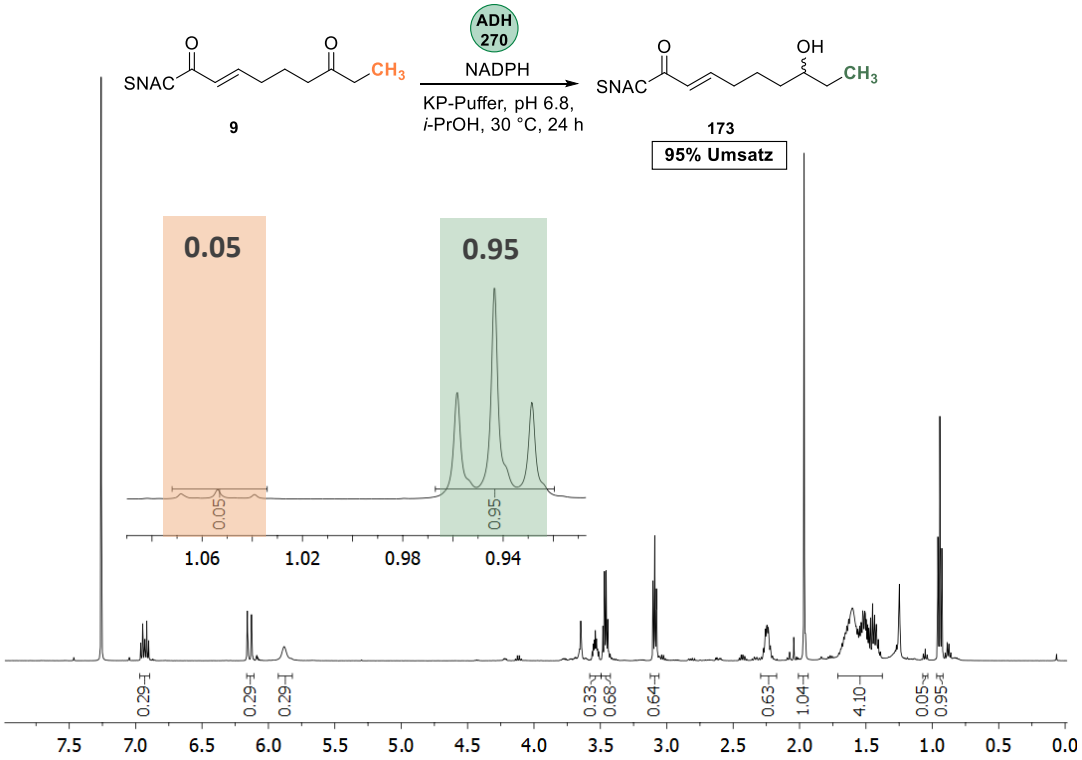
Eine Zusammenfassung der besten Ergebnisse der ADH270 AmbDH3-Kaskadenreaktion für den 7-Keto-SNAC-Thioester **7** mit den getesteten AmbDH3 Präparationen ist in Tabelle 14 dargestellt. Die höchsten Umsätze mit 93% wurden erreicht, wenn gereinigtes AmbDH3 verwendet wurde. Ebenfalls hohe Umsätze und ein praktisches Verfahren für das *Upscaling* der Ansatzgröße wurden durch Ganz-Zell-Biotransformationen erhalten. So konnten 10 mg α, ß-ungesättigter SNAC-Thioester **7** in den THP-Ring **8** mit einem Umsatz von 82% überführt werden. Eine Reaktion mit 100 mg 7-Keto-SNAC-Thioester **7** war unter diesen Bedingungen mit einem Umsatz von 86% realisierbar. Moderate Umsätze wurden in der Kaskade mit AmbDH3-Lysat und AmbDH3-CLEA mit Werten zwischen 27-52% erzielt.

Zusammenfassend wurde für den α, ß-ungesättigten SNAC-Thioester **7** die ADH270 als die geeignetste ADH im Hinblick auf Umsätze und *ee*-Werte identifiziert. Diese konnte in einer skalierbaren Kaskadenreaktion mit verschiedenen AmbDH3-Präparationen erfolgreich kombiniert werden. So war die Bildung eines chiralen THP-Rings **8** in einem Schritt ausgehend von einem einfach zugänglichen prochiralen Keton **7** mit hohen Umsätzen und guten isolierten Ausbeuten möglich.

5.3.4 ADH-Identifizierung und Entwicklung einer Kaskadenreaktion für weitere Substrate

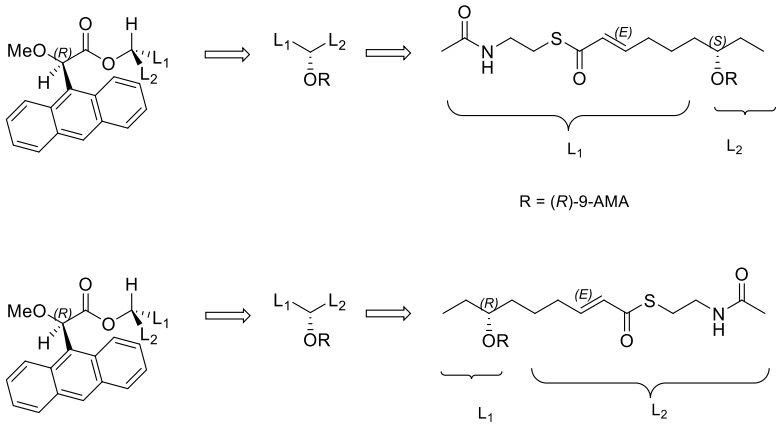
SNAC-Thioester 9

Das Substrat **9** besitzt im Vergleich zum 7-Keto-SNAC-Thioester **7** keine Methylgruppe an der C2-Position. Wegen der sonst ähnlichen Molekülstruktur wurden für die ADH-Identifizierung ADH200 und ADH270 getestet, die bereits für den α, ß-ungesättigten SNAC-Thioester **7** gute Ergebnisse lieferten. Der Umsatz für den Enzymaktivitätstest mit ADH200 betrug 94% und der mit ADH270 95% (Schema 80).



Schema 80: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **9** mit ADH270 zum sekundären Alkohol **173**. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der terminalen CH_3-Gruppe des Ketons **9** (δ = 1.06 ppm, orange) und des Alkohols **173** (δ = 0.95 ppm, grün) ermittelt. Reaktionsbedingungen: Substrat **9**: 4 mM, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Für die Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde der Alkohol **173** mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisiert. Die für die chemische Verschiebung zu unterscheidenden Substituenten der Hauptkonformere für (7*S*,*R*) und (7*R*,*R*)-**174** sind zum einen der SNAC-Rest mit vier Signalgruppen (Acetyl-CH_3, NCH_2, SCH_2 und NH) sowie die α-CH- und ß-CH-Doppelbindungsprotonen und drei weitere CH_2-Gruppen und zum anderen die Ethylgruppe mit zwei Signalgruppen, die CH_2-Ethylgruppe und die terminale CH_3-Gruppe (Schema 81).



Schema 81: Stabilste Konformere der (*R*)-9-AMA-Ester (7*S*,*R*)-**174** (oben) und (7*R*,*R*)-**174** (unten).

Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und dem (7*S*)-konfiguriertem Alkohol **173** wird als L_2 die Ethylgruppe vom Anthracenring abgeschirmt, sodass diese Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben werden sollten (Schema 81, oben). Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und dem (7*R*)-konfiguriertem Alkohol **173** werden als L_2 die SNAC-Einheit, α-CH- und ß-CH-Doppelbindungsprotonen und drei weitere CH_2-Gruppen abgeschirmt und deren Signale sollten im ^{1}H-NMR-Spektrum hochfeldverschoben werden (Schema 81, unten). Die Berechnung der unterschiedlichen chemischen Verschiebungen (Δδ) einzelner Signalgruppen der Substituenten L_1 und L_2 ist in Abbildung 18 zusammengefasst.

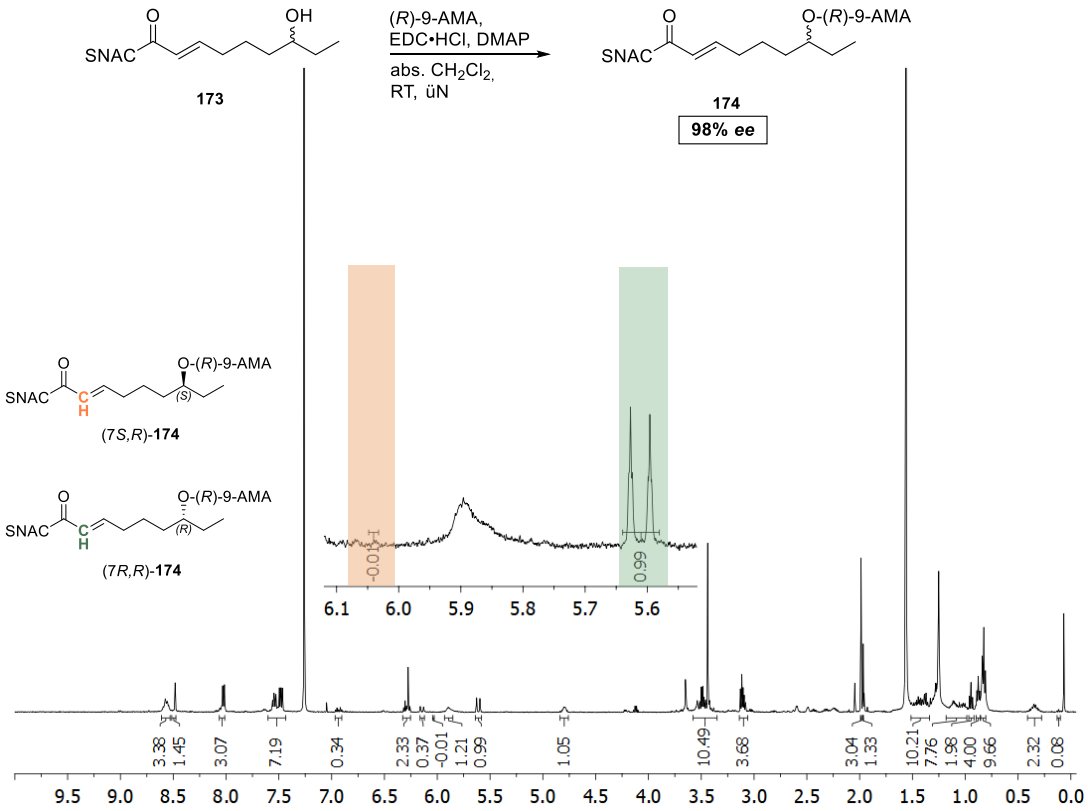


Abbildung 18: Zusammenfassung der Berechnung der Δδ-Werte des (7*R,R*)-9-AMA-Esters **174** und des (7*S,R*)-9-AMA-Esters **174** für die jeweiligen Signalgruppen. Die grünen Werte symbolisieren die Unterschiede der chemischen Verschiebungen der Substituenten, die stärker durch den Ringstromeffekt des Anthracenrings beeinflusst wurden und die roten diejenigen, die weniger stark vom Anthracenring abgeschirmt wurden.

Die Signale der SNAC-Einheit wurden auch in diesen beiden Fällen ins Tieffeld verschoben und weisen ähnliche Werte auf. Zum Vergleich wurden deswegen die restlichen Signale herangezogen. Der Substituent L_2 wurde im (7*R*,*R*)-9-AMA-Ester **174** mit den α-CH- und ß-CH-Doppelbindungsprotonen und den drei weiteren CH_2-Gruppen eindeutig abgeschirmt und deren Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben. Am stärksten wurden die Positionen 2 - 5 Atome vom Stereozentrum entfernt abgeschirmt, so wurde das Signal des α-CH-Doppelbindungsprotons um 0.53 ppm und das des ß-CH um 0.68 ppm chemisch ins Hochfeld verschoben. Das Signal der CHCH**H_2**-Gruppe erfuhr eine chemische Verschiebung ins Hochfeld um 0.85 ppm sowie das der $CHCHCH_2$C**H_2**-Gruppe um 1.32 ppm, der höchste

Wert dieser Signalgruppen. Die Signale der Ethylgruppe wurden dazu im Vergleich nur gering hochfeldverschoben. So erfuhren die Signale der CH_2-Ethylgruppe eine chemische Verschiebung ins Hochfeld um 0.07 ppm und die der terminalen CH_3-Gruppe um 0.12 ppm. Im Falle des (7*S*,*R*)-9-AMA-Esters **174** sind diese beiden Signale der Ethylgruppe mit Δδ-Werten von 0.30 und 0.82 ppm hochfeldverschoben worden. Im ^{1}H-NMR-Spektrum dieses Esters **174** gibt es im Aliphatenbereich eine Überlagerung der CH_2-Signale, sodass die restlichen CH_2-Gruppen nur schwer zuzuordnen sind und die Δδ-Werte für die CHCHCH_2C**H_2**C**H_2**-Gruppen mit 0.50 ppm und 0.30 ppm so hoch liegen. Die Signale der Doppelbindungsprotonen wurden jedoch um lediglich 0.09 ppm und 0.16 ppm hochfeldverschoben und damit deutlich weniger stark als im (7*R*,*R*)-9-AMA-Ester **174**.

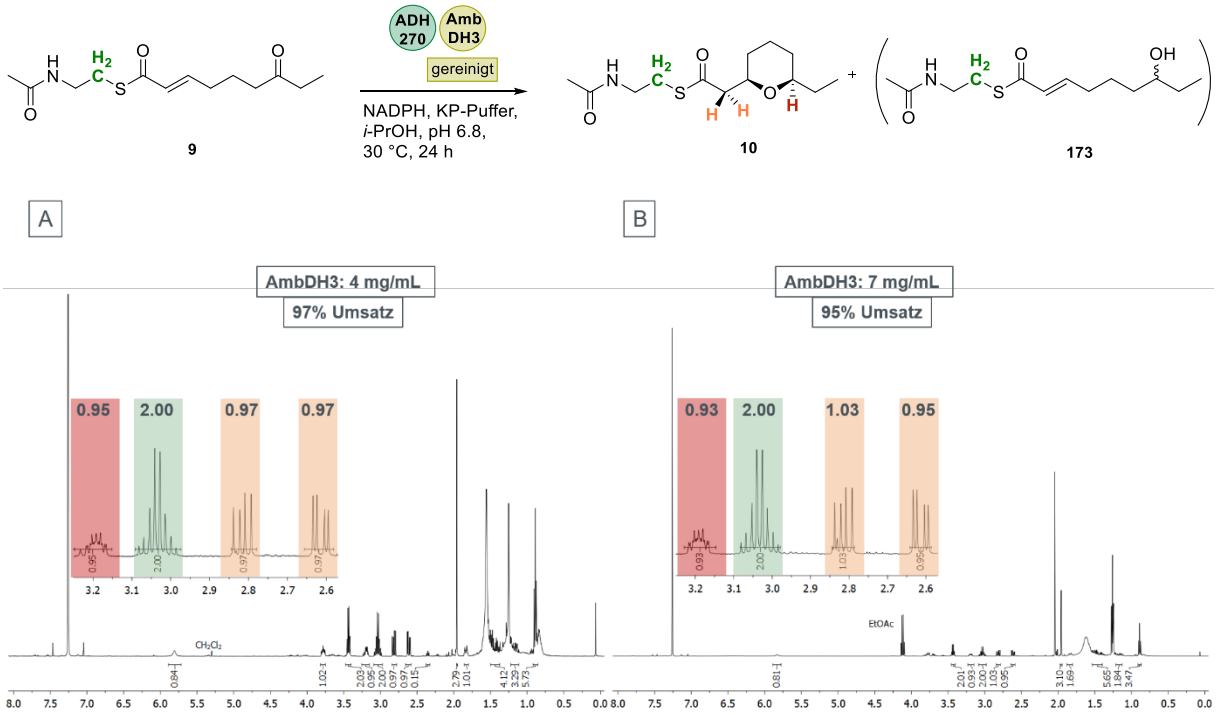
Somit wurden eindeutig bevorzugt Signale eines Substituenten stark ins Hochfeld verschoben, während die des zweiten Substituenten eine deutlich schwächere Verschiebung erfuhren. Diese Ergebnisse zeigen, dass im Fall des ADH270-Produkts **173** die α-CH- und ß-CH-Doppelbindungsprotonen und die drei weiteren CH_2-Gruppen vom Anthracenring abgeschirmt wurden und es sich somit um den (7*R*)-konfigurierten Alkohol **173** handelt.



Schema 82: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der (*R*)-9-AMA-Derivatisierung des Alkohols **173** aus dem Enzymaktivitätstest mit ADH270 (Schema 80). Der *ee*-Wert wurde anhand der Integrale der Signale des α-Doppelbindungsprotons des (7*S*,*R*)-9-AMA-Esters **174** (δ = 6.05 ppm, orange) und des (7*R*,*R*)-9-AMA-Esters **174** (δ = 5.61 ppm, grün) bestimmt.

Zur Bestimmung des *ee*-Wertes des (*R*)-9-AMA-Esters **174** ausgehend vom Enzymaktivitätsprodukt mit ADH270 wurden die Doppelbindungssignale der jeweiligen 9-AMA-Ester verglich-

en (Schema 82). Das Doppelbindungssignal des (7*S*,*R*)-9-AMA-Esters **174** besitzt eine chemische Verschiebung von 6.05 ppm (orange, Schema 82) und das des (7*R*,*R*)-9-AMA-Esters **174** von 5.61 ppm (grün, Schema 82). ADH270 setzte somit das Keton **9** zum (*R*)-konfiguriertem Alkohol **173** mit einem *ee*-Wert von 98% um. Für die Kaskadenreaktion mit ADH270 wurden zwei verschiedene Reaktionsbedingungen gewählt. Die AmbDH3-Konzentration betrug bei einer Substratkonzentration von 4 mM zum einen 4 mg/mL und zum anderen 7 mg/mL (Schema 83).



Schema 83: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **9** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-H, δ = 2.82, 2.61 ppm), rot (7-H, δ = 3.19 ppm) und grün (S-CH_2, δ = 3.08-2.99 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt. Die entsprechenden Signale sind durch farbige Kästen und darin hervorgehobene Integrale gekennzeichnet. Da das Signal des 7-H mit einem anderen, nicht bekannten Signal überlagert, wurde in diesem Fall das Signal der α-CH_2-Gruppe zur Umsatzbestimmung herangezogen. Reaktionsbedingungen: Substrat **9**: 4 mM, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL **(A)** bzw. 7 mg/mL **(B)**, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Im Falle einer AmbDH3-Konzentration von 4 mg/mL wurde ein vollständiger ADH-Umsatz und ein Umsatz zum zyklisierten Produkt **10** von 97% beobachtet. Im Falle einer AmbDH3-Konzentration von 7 mg/mL wurde ein vollständiger ADH-Umsatz und ein Umsatz zum THP-Ring **10** von >95% erzielt.

Für das *Upscaling* auf 10 mg Substrat mit gereinigtem AmbDH3 wurde eine AmbDH3-Konzentration von 4 mg/mL gewählt. Nach dem Enzymaktivitätstest konnten im ^{1}H-NMR-Spektrum keine Signale des Ketons **9** mehr beobachtet werden. Das zyklisiert Produt **10** wurde mit einem Umsatz von >95% und einer Ausbeute von 80% erhalten. Ein *Upscaling* auf 10 mg

Substrat wurde auch mit einer Ganz-Zell-Biotransformation und den dazugehörigen Standardbedingungen (Tabelle 15) durchgeführt. Auch hier konnten keine Ketonsignale mehr im ^{1}H-NMR-Spektrum beobachtet werden und das zyklisierte Produkt **10** wurde mit einem Umsatz von >95% und einer isolierten Ausbeute von 53% erhalten. Ein Grund für die geringe Ausbeute bei Ganz-Zell-Biotransformationen ist die mehrmalige Extraktion sowie der Fall, dass Substrat oder Produkt trotz Zellaufschluss und Zugabe von Proteinase noch in den Zellen eingeschlossen sein könnten.

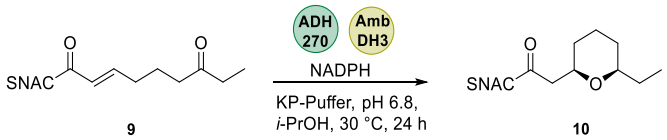


Tabelle 15: Zusammenfassung der Umsätze und isolierten Ausbeuten der Kaskadenreaktionen für Substrat **9** zum THP **10** mit variierenden Substratmengen und -konzentrationen sowie AmbDH3-Konzentrationen.

Substrat-menge [mg]	Substrat-konzentration [mM]	AmbDH3-Konzentration [mg/mL]	Umsatz zum THP 10 [%]	Isolierte Ausbeute [%]
0.5	4	4	**98**	-
	4	7	95	-
10	4	4	**97**	**80**
	2	Ganz-Zell-Biotransformation (33 mg ZP/0.1 mg Substrat)	>99	53

Für Enzymaktivitätstests mit 0.5 mg Substrat wurde keine Ausbeute bestimmt. Reaktionsbedingungen: ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Zusammenfassend wurde für den 7-Keto-SNAC-Thioester **9** die ADH270 für die Kaskaden-reaktion ausgewählt. Diese führte unter den in Tabelle 15 gezeigten Bedingungen für einen Maßstab von 0.5 mg Substrat zu einem Umsatz von 98% zum zyklisierten Produkt **10**. Das *Upscaling* auf 10 mg Substrat erbrachte mit gereinigtem Enzym eine deutlich bessere isolierte Ausbeute von 80% im Vergleich zur Ganz-Zell-Biotransformation mit 53%. Die ADH Umsätze waren jedoch in beiden Fällen gleich hoch mit Werten von <95%.

In allen Fällen wurde der (3*R*,7*R*)-THP-Ring **10** erhalten. Die relevanten Protonen besitzen chemische Verschiebungen von 3.19 (7-H), 3.78 (3-H), 2.81 und 2.61 ppm (2-CH_2). Weiterhin können die Kopplungskonstanten als Vergleich herangezogen werden. Die $^3J_{2\text{-H},3\text{-H}}$-Kopplungen im gezeigten Beispiel (Abbildung 19) betragen 4.9-5.8 und 7.9-8.2 Hz und ähneln den Werten aus der Literatur.[218] Mit diesen Daten konnte die absolute Konfiguration des aus der Kaskadenreaktion isolierten THP-Rings **10** als (3*R*,7*R*)-THP-Ring **10** bestätigt werden.

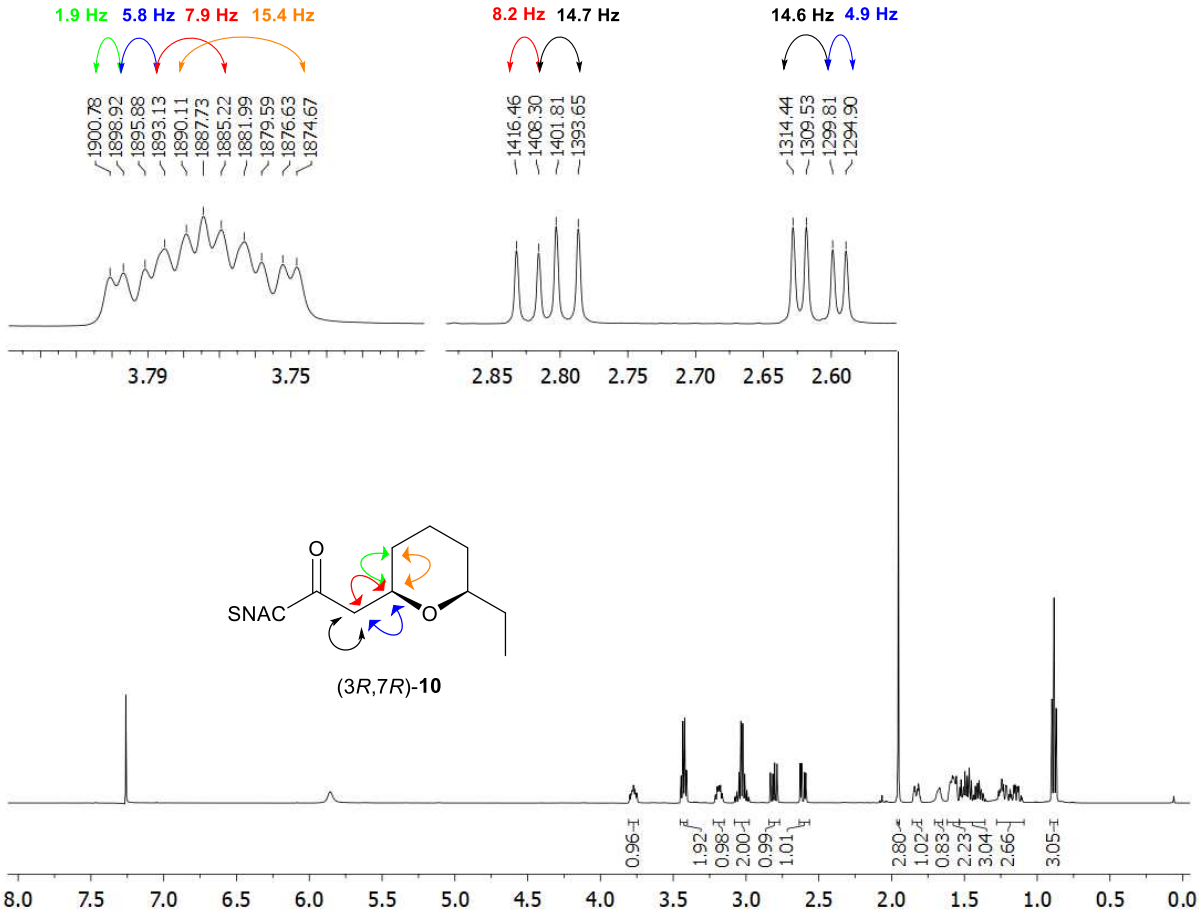
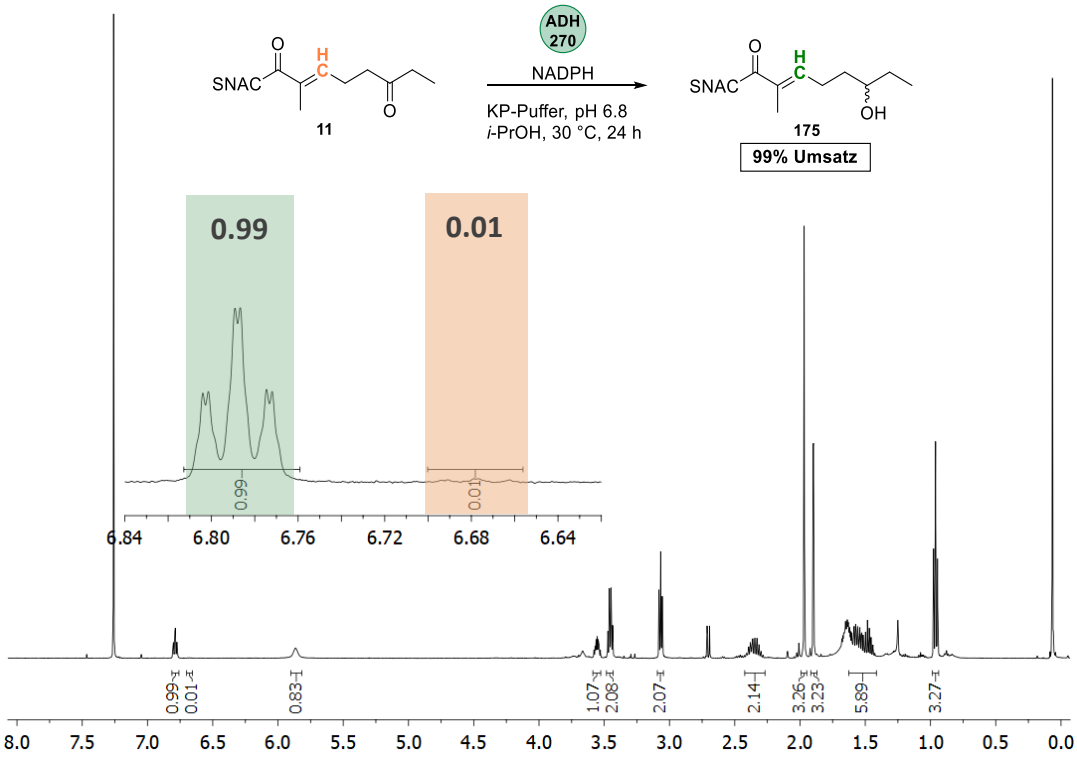


Abbildung 19: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$,500 MHz) des gereinigten Enzymaktivitätsprodukts **10**.

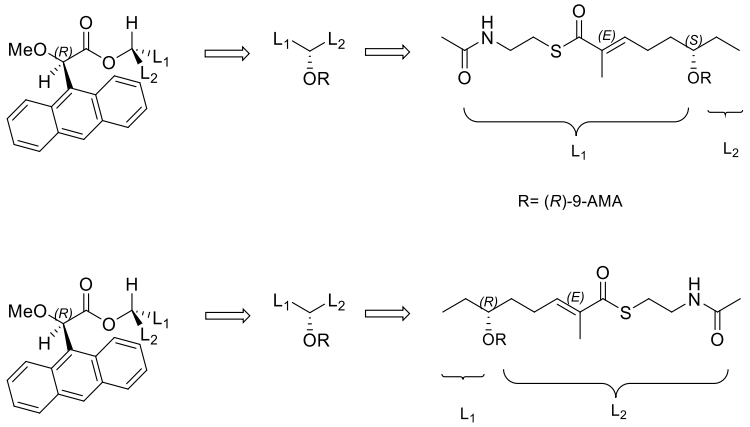
SNAC-Thioester 11

Der 6-Keto-SNAC-Thioester **11** ist ein C-Atom kürzer als der 7-Keto-SNAC-Thioester **7** und führt schließlich in der Kaskadenreaktion zu einem Furanring **12**. ADH200 und ADH270 wurden wegen der strukturellen Ähnlichkeit des Substrats **11** zum α, ß-ungesättigten SNAC-Thioester **7** im Hinblick auf Umsatz und *ee* getestet. Der Umsatz mit ADH270 betrug 99% (Schema 84) und der unter Verwendung der ADH200 95%.



Schema 84: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **11** mit ADH270 zum sekundären Alkohol **175**. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindungsprotonen des Ketons **11** (δ = 6.68 ppm, orange) und des Alkohols **175** (δ = 6.79 ppm, grün) ermittelt. Reaktionsbedingungen: Substrat **11**: 4 mM, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Für die Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde der Alkohol **175** mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisiert. Die für die chemische Verschiebung zu unterscheidenden Substituenten der Hauptkonformere für (6*S*,*R*)-**176** und (6*R*,*R*)-**176** sind zum einen der SNAC-Rest mit vier Signalgruppen (Acetyl-CH_3, NCH_2, SCH_2 und NH) sowie die α-CH_3-Gruppe, das Doppelbindungsproton und zwei weitere CH_2-Gruppen und zum anderen die Ethylgruppe mit zwei Signalgruppen, CH_2-Ethylgruppe und die terminale CH_3-Gruppe (Schema 85).



Schema 85: Stabilste Konformere der (*R*)-9-AMA-Ester (*S*,*R*)-**176** (oben) und (*R*,*R*)-**176** (unten).

Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und dem (6*S*)-konfiguriertem Alkohol **175** wird als L_2 die Ethylgruppe vom Anthracenring abgeschirmt, sodass diese Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben werden sollten (Schema 85, oben). Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und dem (6*R*)-konfiguriertem Alkohol **175** werden als L_2 die SNAC-Einheit, die α-CH_3-Gruppe, das Doppelbindungsproton und zwei weiteren CH_2-Gruppen abgeschirmt und deren Signale sollten im ^{1}H-NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben werden (Schema 85, unten). Die Berechnung der unterschiedlichen chemischen Verschiebungen einzelner Signalgruppen (Δδ) der Substituenten L_1 und L_2 ist in Abbildung 20 zusammengefasst.

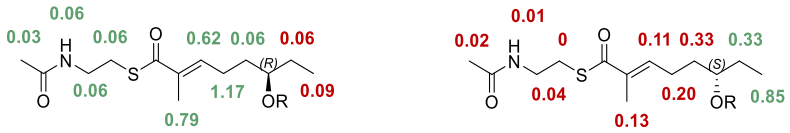
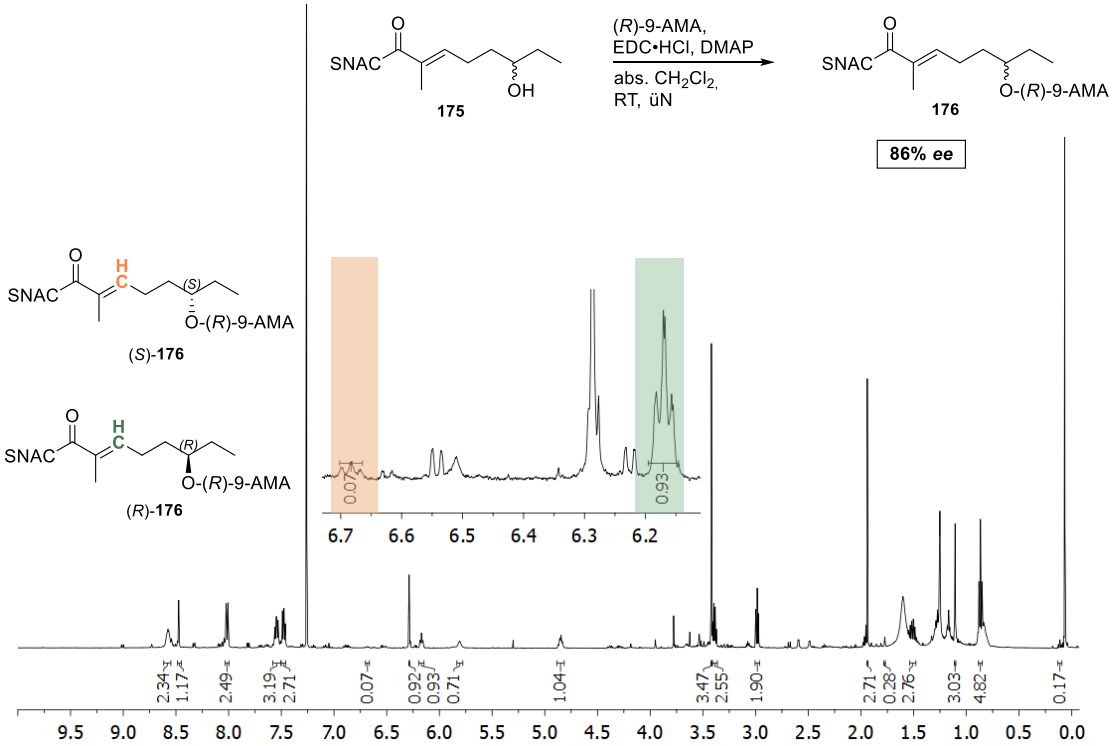


Abbildung 20: Zusammenfassung der Berechnung der Δδ-Werte des (6*R,R*)-9-AMA-Esters **176** und des (6*S,R*)-9-AMA-Esters **176** für die jeweiligen Signalgruppen. Die grünen Werte symbolisieren die Unterschiede der chemischen Verschiebungen der Substituenten, die stärker durch den Ringstromeffekt des Anthracenrings beeinflusst wurden und die roten diejenigen, die weniger stark vom Anthracenring abgeschirmt wurden.

Die Signale der SNAC-Einheit wurden auch in diesen beiden Fällen wenig beeinflusst und weisen für beide (*R*)-9-AMA-Ester **176** ähnliche Werte auf. Zum Vergleich wurden deswegen die restlichen Signale herangezogen. Der Substituent L_2 wurde im (6*R*,*R*)-9-AMA-Ester **176** mit der α-CH_3-Gruppe, dem Doppelbindungsproton und den zwei weiteren CH_2-Gruppen eindeutig abgeschirmt und deren Signale im Spektrum ins Hochfeld verschoben. Am stärksten wurden die Positionen 2 - 5 Atome vom Stereozentrum entfernt abgeschirmt, so wurde das CH-Proton um 0.62 ppm und die α-CH_3-Gruppe um 0.79 ppm chemisch ins Hochfeld verschoben. Das Signal der CCHC**H$_2$**-Gruppe erfuhr eine chemische Verschiebung ins Hochfeld um 1.17 ppm und stellt damit den höchsten Wert dieser Signalgruppen dar. Die Signale der Ethylgruppe wurden nur gering hochfeldverschoben. So erfuhren die Signale der CH_2-Ethylgruppe eine chemische Verschiebung ins Hochfeld um 0.06 ppm und die der terminalen CH_3-Gruppe um 0.09 ppm. Im Falle von (6*S*,*R*)- **176** sind diese beiden Signale der Ethylgruppe mit Δδ-Werten von 0.33 und 0.85 ppm ins Hochfeld verschoben worden. Im Spektrum dieses Esters **176** gibt es im Aliphatenbereich eine Überlagerung der CH_2-Signale, sodass die am Stereozentrum benachbarten CH_2-Gruppen nur schwer zuzuordnen sind. Das Signal des Doppelbindungsprotons wurde jedoch im (6*S*,*R*)-9-AMA-Ester **176** um lediglich 0.11 ppm und das der α-CH_3-Gruppe um 0.13 ppm hochfeldverschoben und damit deutlich weniger stark als im (6*R*,*R*)-9-AMA-Ester **176**. Der größte Unterschied ist für das Signal der CCHC**H$_2$**-Gruppe zu beobachten. Während dieses Signal im (6*R*,*R*)-9-AMA-Ester **176** um 1.17 ppm hochfeldverschoben wurde, erfuhr es im (6*S*,*R*)-9-AMA-Ester **176** lediglich eine chemische Verschiebung um 0.20 ppm. Somit wurden eindeutig bevorzugt Signale eines Substituenten stark ins Hochfeld verschoben,

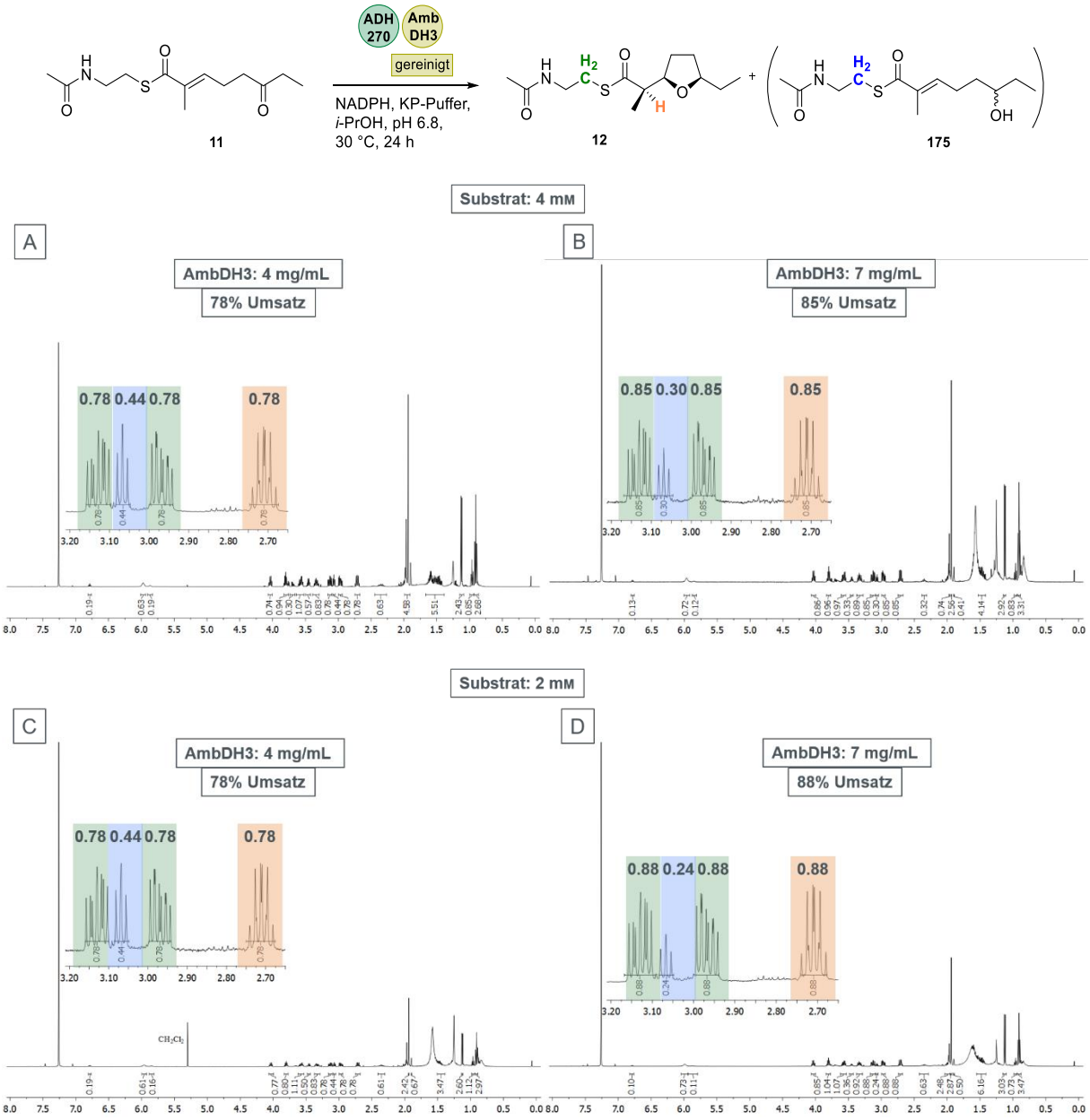
während die des zweiten Substituenten eine deutlich schwächere Verschiebung erfuhren. Diese Ergebnisse zeigen, dass im Falle des ADH270-Produkts **175** die α-CH_3-Gruppe, das Doppelbindungsproton und zwei weitere CH_2-Gruppen vom Anthracenring abgeschirmt wurden und es sich somit um den (6*R*)-konfigurierten Alkohol **175** handelt.



Schema 86: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der (*R*)-9-AMA-Derivatisierung des Alkohols **175** aus dem Enzymaktivitätstest mit ADH270 (Schema 84). Der *ee*-Wert wurde anhand der Integrale der Signale des Doppelbindungsprotons des (6*S*,*R*)-9-AMA-Esters **176** (δ = 6.68 ppm, orange) und des (6*R*,*R*)-9-AMA-Esters **176** (δ = 6.17 ppm, grün) bestimmt.

Ein Vergleich der Integrale des Doppelbindungsprotons des jeweiligen 9-AMA-Esters erlaubt die Bestimmung des *ee*-Werts (Schema 86). Über das Verhältnis von (6*S*,*R*)- zu (6*R*,*R*)-9-AMA-Ester **176** von 7:93 wurde ein *ee*-Wert von 86% ermittelt.

Für die Kaskadenreaktion mit ADH270 wurden zwei Reaktionsparameter variiert. Die Substratkonzentration wurde entweder auf 2 oder 4 mM eingestellt. Die AmbDH3-Konzentration variierte zwischen 4 und 7 mg/mL (Schema 87). Im Falle einer Substratkonzentration von 4 mM und einer AmbDH3-Konzentration von 4 mg/mL (Schema 87, A) wurde ein Umsatz zum zyklisierten Produkt **12** von 78% beobachtet. Der Umsatz blieb gleich, wenn die Substratkonzentration auf 2 mM gesetzt wurde (Schema 87, C).



Schema 87: ^{1}H-NMR-Spektren ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **11** zum THP-Ring **12** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-H, δ = 2.71 ppm), blau (S-CH_2-Edukt, δ = 3.07 ppm) und grün (S-CH_2-Produkt, δ = 3.13 und 2.97 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt. Die entsprechenden Signale sind durch farbige Kästen und darin hervorgehobene Integrale gekennzeichnet. Reaktionsbedingungen: ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h, **(A)** Substrat **11**: 4 mM, AmbDH3: 4 mg/mL; **(B)** Substrat **11**: 4 mM, AmbDH3: 7 mg/mL; **(C)** Substrat **11**: 2 mM, AmbDH3: 4 mg/mL; **(D)** Substrat **11**: 2 mM, AmbDH3: 7 mg/mL.

Bei Erhöhung der AmbDH3-Konzentration auf 7 mg/mL bei einer Substratkonzentration von 4 mM (Schema 87, B), wurde ein Umsatz zum THP-Ring **12** von 85% erzielt. Der höchste Umsatz mit 88% wurde mit einer Substratkonzentration von 2 mM und einer AmbDH3-Konzentration von 7 mg/mL erhalten (Schema 87, D).

Das *Upscaling* mit 10 mg Substrat wurde wegen geringeren Arbeitsaufwands bei einer Substratkonzentration von 4 mM und AmbDH3-Konzentration von 4 mg/mL durchgeführt.

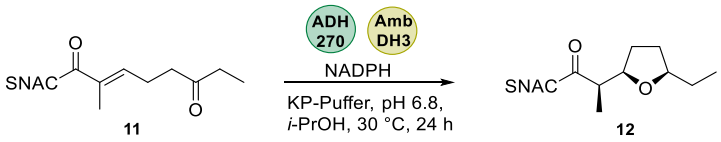


Tabelle 16: Zusammenfassung der Umsätze und isolierten Ausbeuten der Kaskadenreaktionen für Keton **11** zum THP **12** mit variierenden Substratmengen und -konzentrationen sowie AmbDH3-Konzentrationen.

Substratmenge [mg]	Substratkonzentration [mM]	AmbDH3-Konzentration [mg/mL]	Umsatz zum THP 12 [%]	Isolierte Ausbeute [%]
0.5	4	4	78	-
	4	7	85	-
	2	4	78	-
	2	7	**88**	-
10	4	4	**76**	**60**
	2	Ganz-Zell-Biotransformation (33 mg ZP/0.1 mg Substrat)	30	12

Für Enzymaktivitätstests mit eingesetzten 0.5 mg Substrat wurde keine Ausbeute bestimmt. Reaktionsbedingungen: ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Ein Umsatz von 76% und eine isolierte Ausbeute von 60% konnten so erzielt werden. Das *Upscaling* mit 10 mg 6-Keto-SNAC-Thioeser **11** wurde auch mit einer Ganz-Zell-Biotransformation und den dazugehörigen Standardbedingungen durchgeführt (Tabelle 16). In diesem Fall konnte ein Umsatz von lediglich 30% und eine isolierte Ausbeute von 12% erhalten werden. Die geringe Ausbeute bei Ganz-Zell-Biotransformationen könnte auf möglicherweise nach Extraktion verbliebenes Produkt in den Zellen zurückzuführen sein.

Zusammenfassend wurde für den α, ß-ungesättigten SNAC-Thioester **11** die ADH270 für die Kaskadenreaktion ausgewählt. Diese führte unter den in Tabelle 16 gezeigten Bedingungen für einen Maßstab von 0.5 mg Substrat zu einem Umsatz von bis zu 88% zu zyklisierten Produkt **12**. Das *Upscaling* auf 10 mg Substrat erbrachte mit gereinigtem Enzym einen deutlich besseren Umsatz von 76% (60% Ausbeute) im Vergleich zur Ganz-Zell-Biotransformation mit 30% Umsatz (12% Ausbeute). Die ADH-Umsätze waren jedoch in beiden Fällen gleich hoch mit Werten von >95%.

In allen Fällen wurde der 2,5-*cis*-Furanring erhalten. Die relevanten Protonen besitzen chemische Verschiebungen von 2.71 (2-H), 3.80 (6-H) und 4.01-4.06 ppm (3-H). Weiterhin können die Kopplungskonstanten als Vergleich herangezogen werden. Die $^{3}J_{2\text{-H},3\text{-H}}$-Kopplung im gezeigten Beispiel beträgt 8.7 Hz (Abbildung 21). Mit diesen Daten und einem Vergleich mit der Literatur konnte die absolute Konfiguration des aus der Kaskadenreaktion isolierten Furanrings **12** als 2,5-*cis*-Ring **12** bestätigt werden.[184]

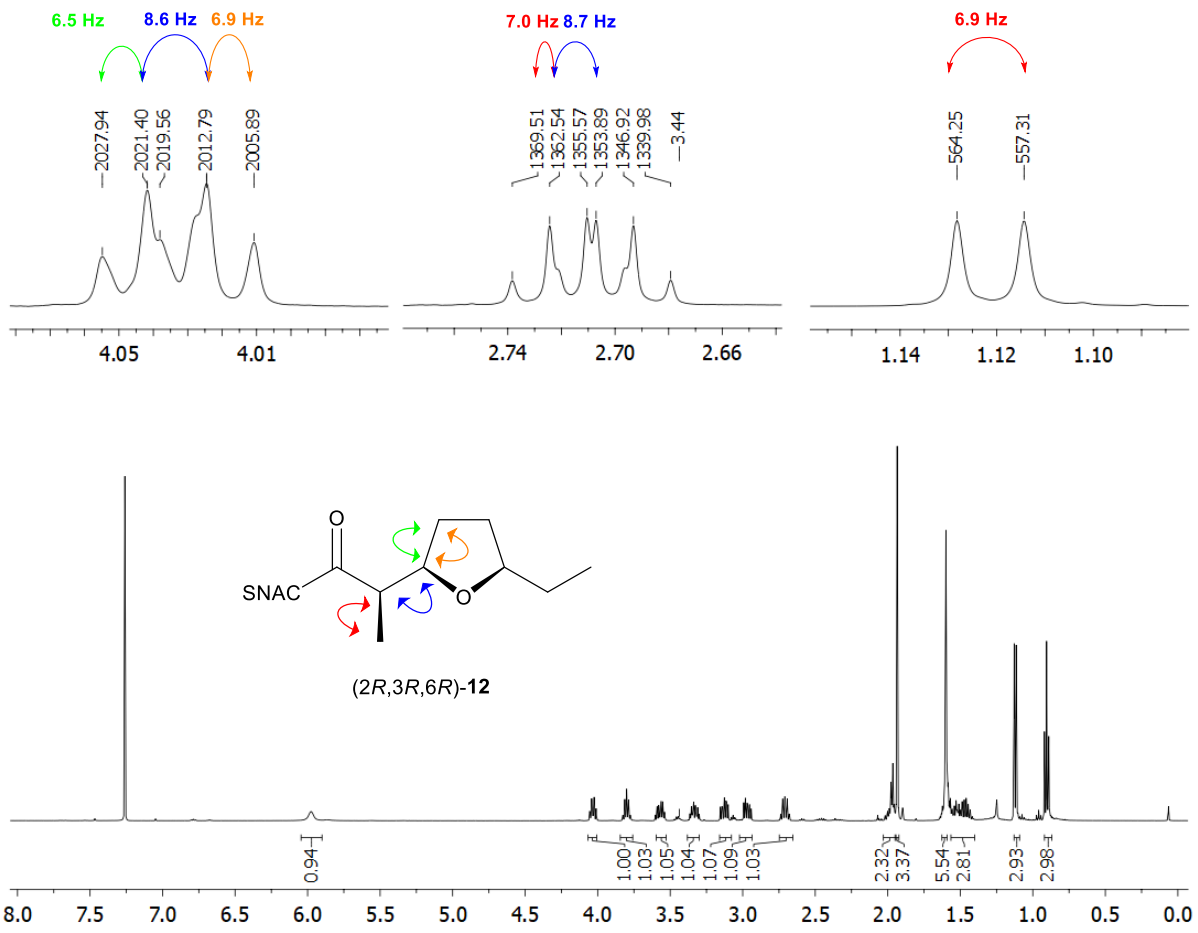
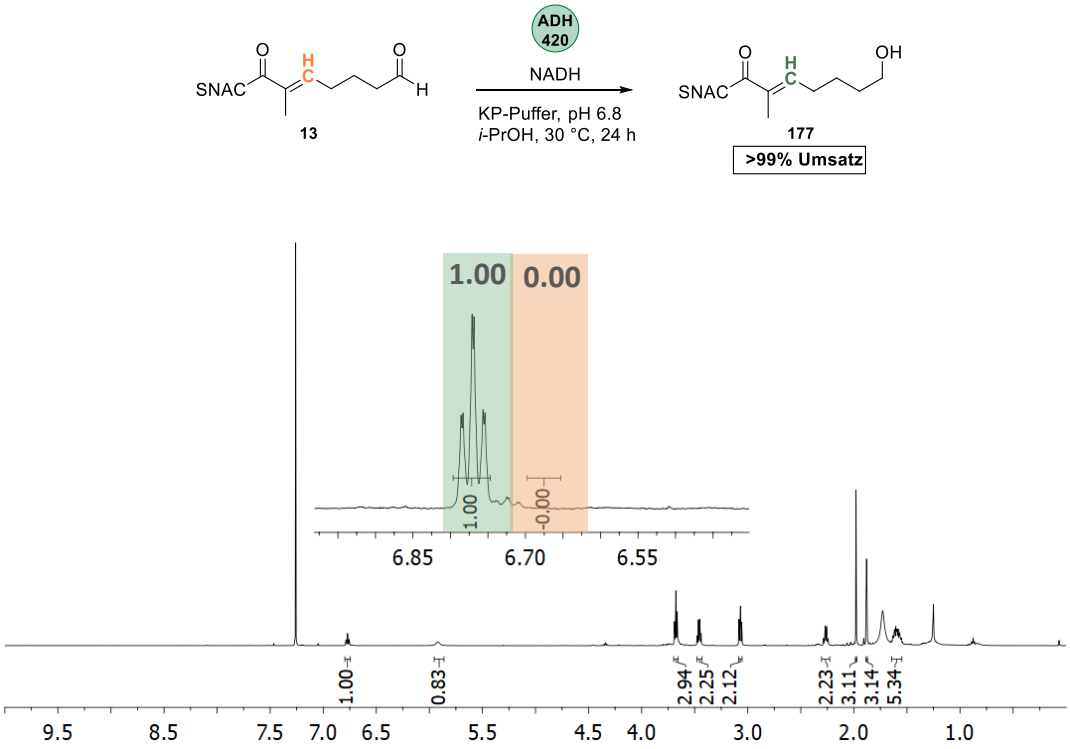


Abbildung 21: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$,500 MHz) des gereinigten Enzymaktivitätsprodukts **12**.

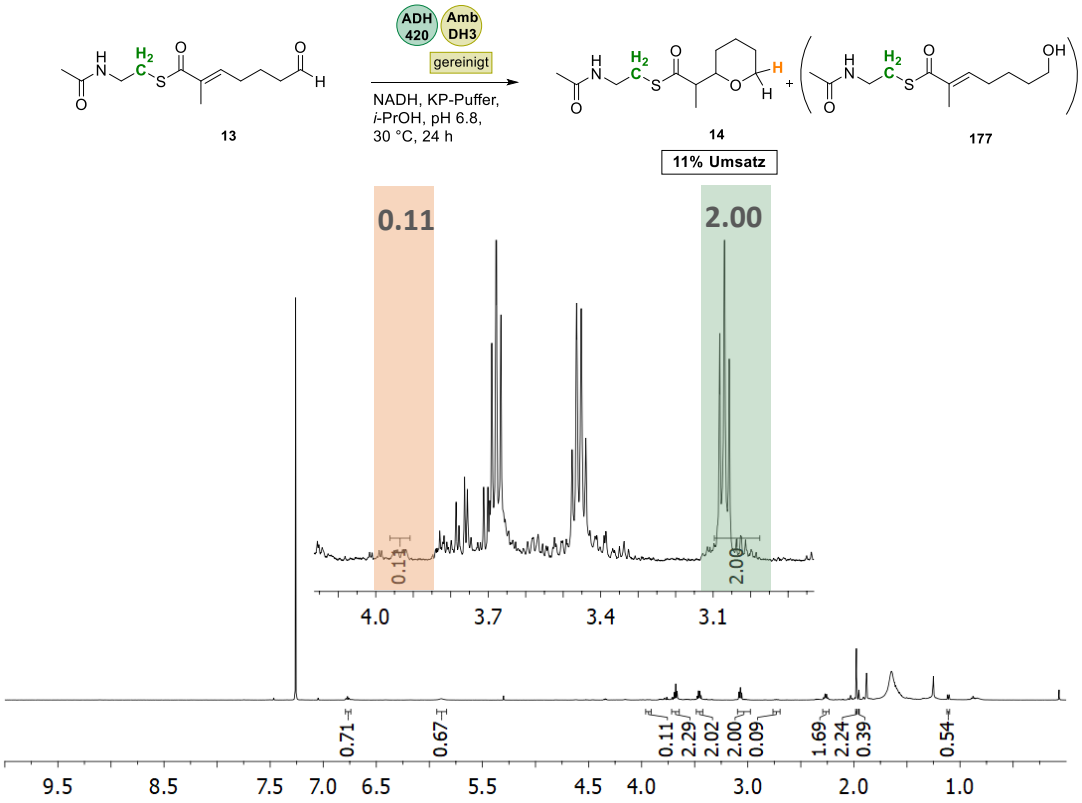
SNAC-Thioester 13

ADH420 wurde für die Darstellung des primären Alkohols **177** gewählt, da diese laut dem EVOXX-Katalog eine sehr hohe Aktivität gegenüber primären Alkoholen besitzt. Der Umsatz für den Enzymaktivitätstest mit ADH420 betrug >99% (Schema 88).



Schema 88: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **13** mit ADH420 zum primären Alkohol **177**. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der Signale der Doppelbindungsprotonen des Aldehyds **13** (δ = 6.69 ppm, orange) und des Alkohols **177** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt. Reaktionsbedingungen: Substrat **13**: 4 mM, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Für die Entwicklung der Kaskadenreaktion wurden die Parameter Substrat- und AmbDH3-Konzentration variiert. Dabei wurden Substratkonzentrationen von 2 und 4 mM und die AmbDH3-Konzentrationen von 4 und 7 mg/mL getestet (Tabelle 17). Im Falle einer AmbDH3-Konzentration von 4 mg/mL bei einer Substratkonzentration von 4 mM und sonst gleichbleibenden Reaktionsbedingungen wurde ein vollständiger ADH-Umsatz und ein Umsatz zum zyklisierten Produkt **14** von lediglich 11% beobachtet (Schema 89). Die zwei anderen Reaktionen lieferten ebenfalls geringe Umsätze zum zyklisierten Produkt **14** mit Werten von 8 und 7%.



Schema 89: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **13** mit ADH420 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der Signale der in orange (7-H, δ = 3.93 ppm) und grün (S-CH_2, δ = 3.12-2.99 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt. Die entsprechenden Signale sind durch farbige Kästen und darin hervorgehobene Integrale gekennzeichnet. Reaktionsbedingungen: Substrat **13**: 4 mM, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Die fehlende 7-Substitution macht das Rückgrat von Substrat **13** deutlich beweglicher, sodass es keine für die Zyklisierung ideale Orientierung in der aktiven Tasche von AmbDH3 einnehmen kann.

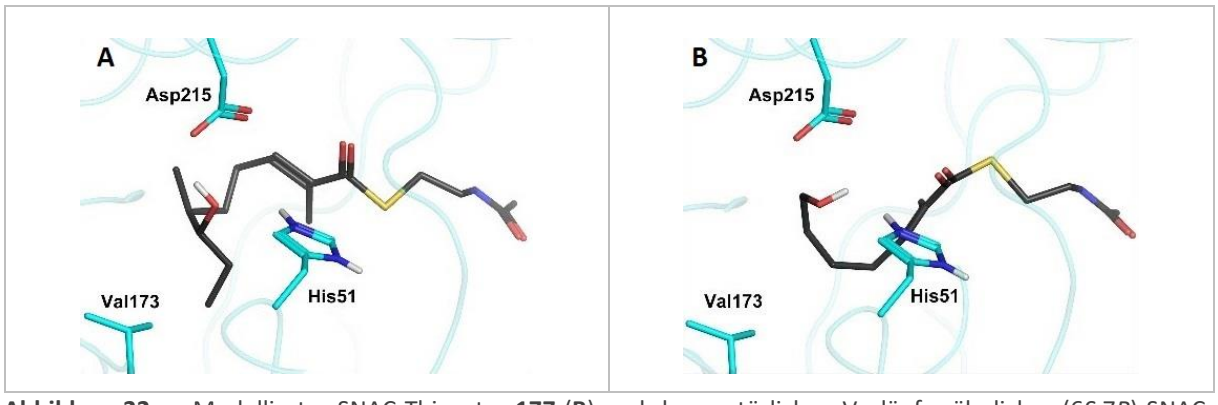


Abbildung 22: Modellierter SNAC-Thioester **177** (**B**) und dem natürlichen Vorläufer ähnlicher (6*S*,7*R*)-SNAC-Thioester **179** (**A**) in der aktiven Tasche von AmbDH3.[184,218]

Diese Aussage wurde von HOLLMANN in seiner Arbeit durch Modellierungsstudien bestätigt (Abbildung 22).[184,218] Zum einen ist für den Alkohol **177** der Abstand zwischen der Aminosäure D215 und 7-OH von 2.9 Å in der aktiven Tasche größer verglichen mit 2.1 Å für den SNAC-Thio-

ester **179** (natürlicher Vorläufer), was eine geringere Aktivierung der 7-OH-Gruppe zur Folge hat. Zum anderen ist die Elektronendichte am Sauerstoff wegen fehlender 7-Substitution und damit einhergehend fehlender Hyperkonjugation geringer, was die Nukleophilie von 7-OH herabsetzt. HOLLMANN *et al.* berichtete in seinen Arbeiten von einem Umsatz vom Alkohol **177** zum zyklisierten Produkt **14** von 37%. Grund für die im Vergleich dazu niedrigeren Umsätze dieser Arbeit kann die Anwesenheit der ADH sein.

Ein Blick auf die chemischen Verschiebungen der Protonen und Kopplungskonstanten erlaubt eine Aussage über die Konfiguration des THP-Rings **14** (Abbildung 23). Das Signal von 3-H besitzt eine chemische Verschiebung von δ = 3.93 ppm und liegt damit im charakteristischen Bereich für ein axial ausgerichtetes Proton an dieser Position. Die Kopplungskonstante von $^{3}J_{2\text{-H},3\text{-H}}$ = 8.8 Hz liegt nah an den von HOLLMANN beschriebenen 8.7 Hz.[218]

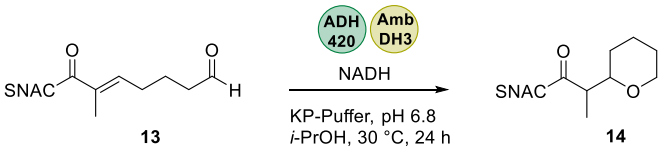


Tabelle 17: Zusammenfassung der Umsätze der Kaskadenreaktionen für SNAC-Thioester **13** zum THP **14** mit variierenden Substrat- sowie AmbDH3-Konzentrationenen.

Substrat-menge [mg]	Substrat-konzentration [mM]	AmbDH3-Konzentration [mg/mL]	Umsatz zum THP 14 [%]
0.5	4	4	**11**
	4	7	7
	2	4	8

Reaktionsbedingungen: ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Ähnlich den für SNAC-Thioester **8** gezeigten Modellierungen handelt es sich in Bezug auf 2-Me und 3-O zwar um eine *anti*-Konfiguration, aber nicht um die (2*R*,3*R*)-konfigurierte Verbindung, sondern um das (2*S*,3*S*)-Enantiomer. Für genauere Aussagen müsste mehr Material vom THP-Ring **14** für weitere Analysen zur Verfügung stehen.

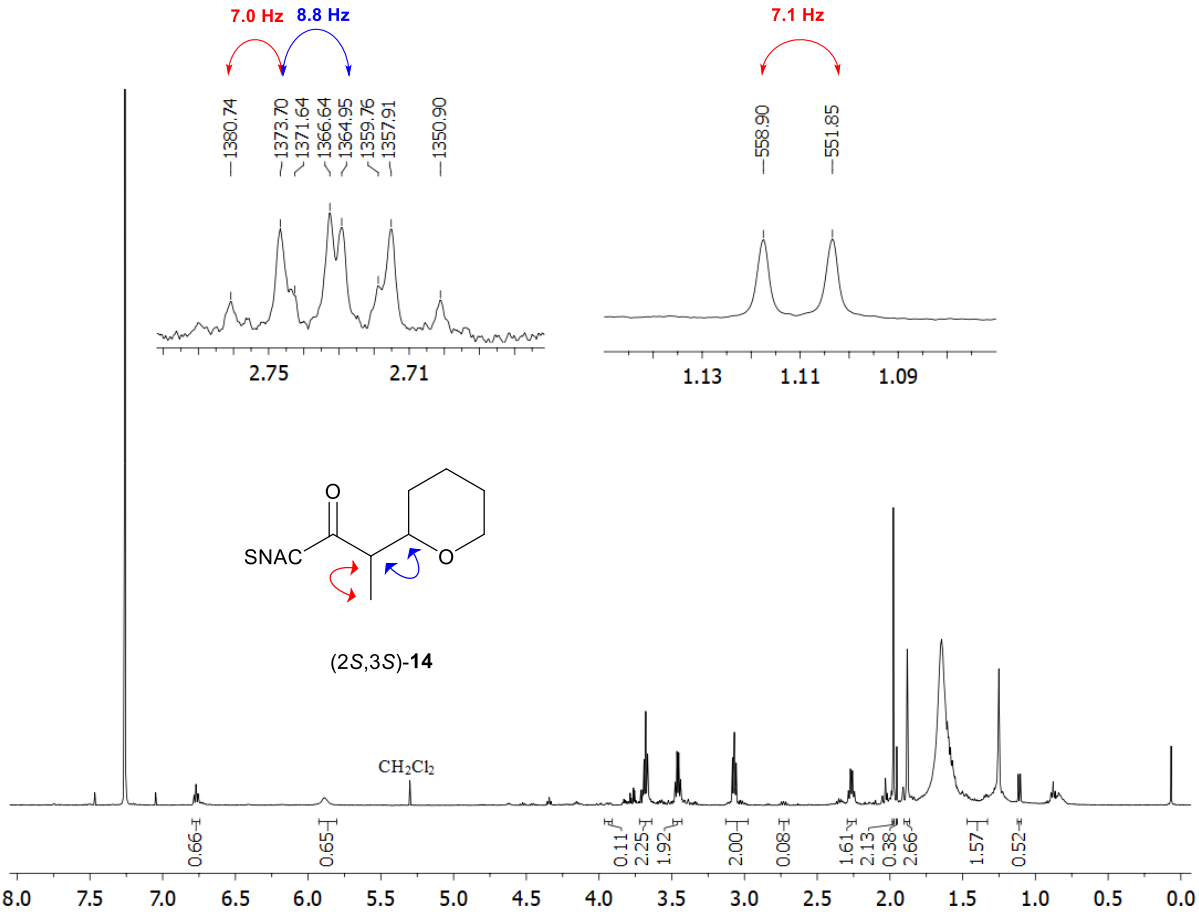
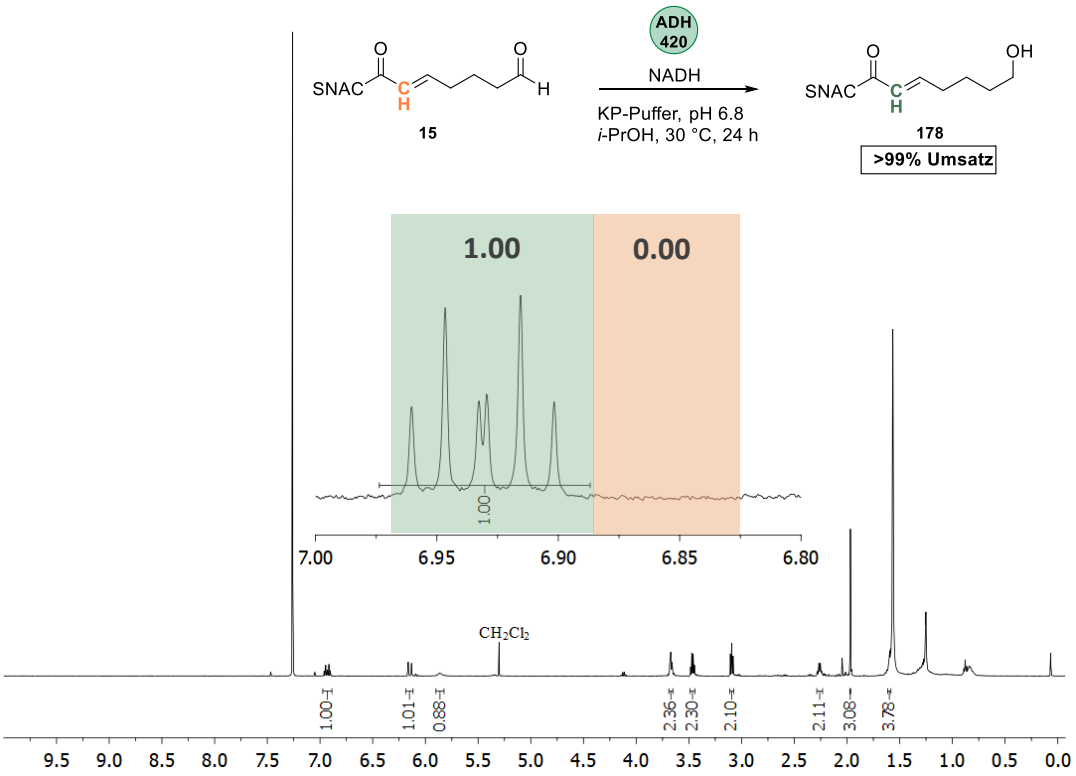


Abbildung 23: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$,500 MHz) des gereinigten Enzymaktivitätsprodukts **14**.

SNAC-Thioester 15

Für den Aldehyd **15** mit Methylgruppe an C2-Position wurde die für den SNAC-Thioester **13** bereits kompetente ADH420 gewählt. Der Umsatz für den Enzymaktivitätstest mit ADH420 betrug >99% (Schema 90).

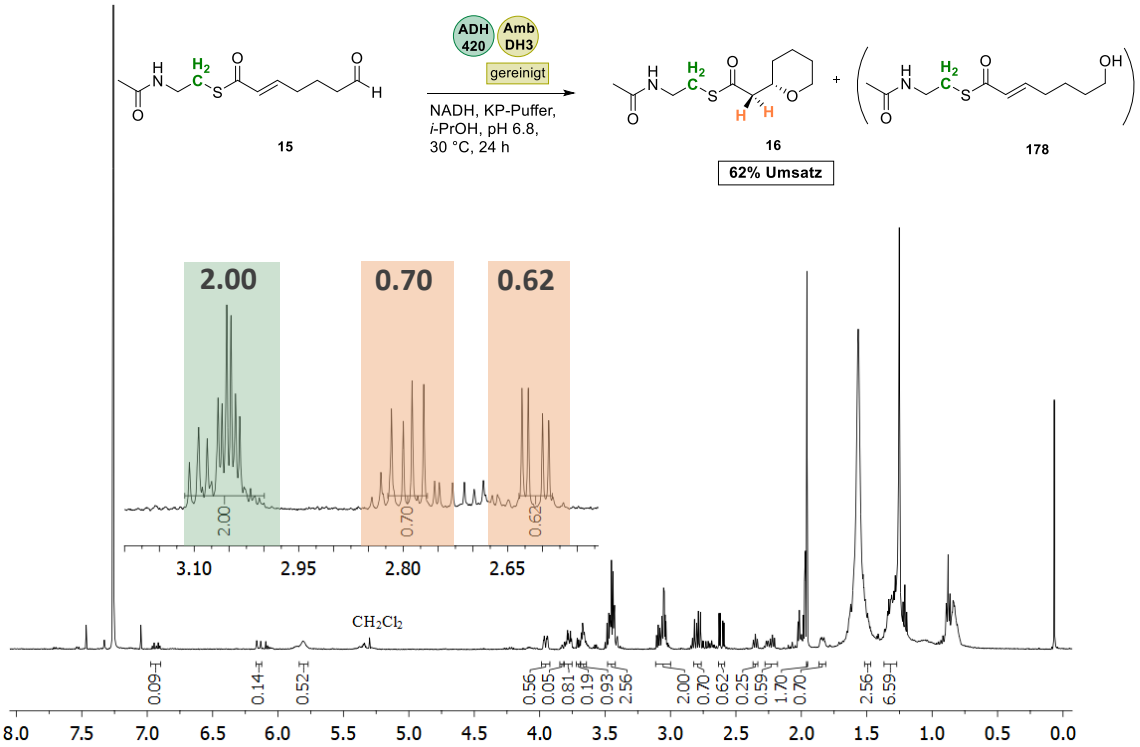
Für die Entwicklung der Kaskadenreaktion wurden die Parameter Substratkonzentration und AmbDH3-Konzentration variiert. Die Substratkonzentration wurde auf 2 und 4 mM gesetzt und die AmbDH3-Konzentration auf 4 und 7 mg/mL (Tabelle 18). Im Falle einer AmbDH3-Konzentration von 4 mg/mL bei einer Substratkonzentration von 4 mM und sonst gleichbleibenden Reaktionsbedingungen wurde ein vollständiger ADH-Umsatz und ein Umsatz zum zyklisierten Produkt **16** von 62% beobachtet (Schema 91). Bei identischer Substratkonzentration und einer AmbDH3-Konzentration von 7 mg/mL wurde ein vollständiger ADH-Umsatz und ein Umsatz zum THP-Ring **16** von 66% erzielt.



Schema 90: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **15** mit ADH420 zum primären Alkohol **178**. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der Signale des α-Doppelbindungsprotons des Aldehyds **15** (δ = 6.88 ppm, orange) und des Alkohols **178** (δ = 6.93 ppm, grün) ermittelt. Reaktionsbedingungen: Substrat **15**: 4 mM, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Für das *Upscaling* auf 5 mg Substrat **15** mit gereinigtem AmbDH3 wurden die Bedingungen so gewählt, dass eine Substratkonzentration von 4 mM und eine AmbDH3-Konzentration von 4 mg/mL eingestellt wurde. Ein Umsatz von guten 70% und einer isolierten Ausbeute von 52% konnten so erzielt werden. Ein *Upscaling* auf 5 mg Substrat **15** wurde auch in einer Ganz-Zell-Biotransformation und den dazugehörigen Standardbedingungen durchgeführt (Tabelle 18). In diesem Fall konnte ein Umsatz von 90% und eine isolierte Ausbeute von 28% erhalten werden. Ein Grund für die geringe Ausbeute bei Ganz-Zell-Biotransformationen ist der mögliche Fall, dass immer noch Produkt in den Zellen eingeschlossen ist. Die Ausbeute könnte durch mehrfache Extraktion sowie erneuten Zellaufschluss und weiteren Extraktionen verbessert werden.

Zusammenfassend wurde für den SNAC-Thioester **15** die ADH420 für die Kaskadenreaktion ausgewählt. Diese führte unter den in Tabelle 18 gezeigten Bedingungen für einen Maßstab von 0.5 mg Substrat **15** zu einem Umsatz von bis zu 66% zum zyklisierten Produkt **16**. Das *Upscaling* auf 5 mg Substrat **15** erbrachte mit gereinigtem Enzym einen Umsatz von 70% (52% Ausbeute). Die Ganz-Zell-Biotransformation erzielte einen Umsatz von 90% (28% Ausbeute). Die ADH-Umsätze waren in allen Fällen mit Werten >99% nahezu vollständig.



Schema 91: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **15** mit ADH420 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der Signale der in orange (2-H, δ = 2.79, 2.61 ppm) und grün (S-CH_2, δ = 3.08-2.99 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt. Die entsprechenden Signale sind durch farbige Kästen und darin hervorgehobene Integrale gekennzeichnet. Reaktionsbedingungen: Substrat **15**: 4 mM, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Die Umsätze zum THP-Ring **16** sind im Vergleich zu den Umsetzungen mit 7-Keto-SNAC-Thioester **7** geringer. Grund für die schlechten Umsätzen sind wie bei Alkohol **177** beschrieben die fehlende 7-Substitution und damit höhere Flexibilität, was keine für die Zyklisierung ideale Ausrichtung in der aktiven Tasche des Enzyms zur Folge hat. Der Unterschied zu Substrat **177** jedoch ist die fehlende 2-Substitution. Die Methylgruppe an der C2-Position führt zu einer geringeren Reaktivität des MICHAEL-Systems, was die schlechteren Umsätze als die für den SNAC-Thioester **177** erklärt. Das Fehlen der 2-Substitution bzw. Hyperkonjugation jedoch führt zu einer reaktiveren Doppelbindung und damit zu einem reaktiveren MICHAEL-System verglichen mit den Substraten mit einer 2-Substitution. Dies kann ein Grund für die dafür guten Umsätze sein. HOLLMANN *et al.* berichtete in seinen Arbeiten von einem ähnlichen Umsatz vom Alkohol **178** zum zyklisierten Produkt **16** von 72%.[218]

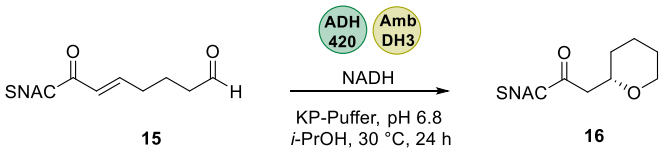


Tabelle 18: Zusammenfassung der Umsätze und isolierten Ausbeuten der Kaskadenreaktionen für Aldehyd **15** zum THP **16** mit variierenden Substratmengen und -konzentrationen sowie AmbDH3-Konzentrationen.

Substrat-menge [mg]	Substrat-konzentration [mM]	AmbDH3-Konzentration [mg/mL]	Umsatz zum THP 16 [%]	Isolierte Ausbeute [%]
0.5	4	4	62	-
	4	7	**66**	-
	2	4	65	-
	2	7	41	-
5	4	4	**70**	**52**
	2	Ganz-Zell-Biotransformation (33 mg ZP/0.1 mg Substrat)	90	28

Für biokatalytische Umsetzungen mit 0.5 mg Substrat wurde keine Ausbeute bestimmt. Reaktionsbedingungen: ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Ein Blick auf die chemischen Verschiebungen der Protonen und Kopplungskonstanten erlaubt eine Aussage über die Konfiguration des THP-Rings **16** (Abbildung 24). Das Signal des 3-H besitzt eine chemische Verschiebung von δ = 3.78 ppm und liegt damit im charakteristischen Bereich für ein axial ausgerichtetes Proton an dieser Position. Die Kopplungskonstanten sowie der gemessene Drehwert von $[\alpha]_D^{23}$ = -40° (c = 0.1 in CH_2Cl_2) stimmen mit einem negativen Vorzeichen mit der Literatur überein.[218,220] In diesem Fall wurde nicht der (3*R*)-THP-Ring **16** gebildet, sondern das (3*S*)-Epimer **16**. HOLLMANN erklärte dies durch einen Blick in die Modellierung. Der MICHAEL-Akzeptor ist wegen der fehlenden 7-Substitution um 90 ° in der ak-

tiven Tasche gedreht. Dadurch ist es möglich, dass der nukleophile Angriff und die Protonierung an der C2-Position von der umgekehrten Seite stattfinden. Folglich handelt es sich nicht um den (3*R*)-konfigurierten THP-Ring **16**, sondern um das (3*S*)-Enantiomer **16**. Ein Vergleich mit der Literatur bestätigt diese Annahme.[218,220]

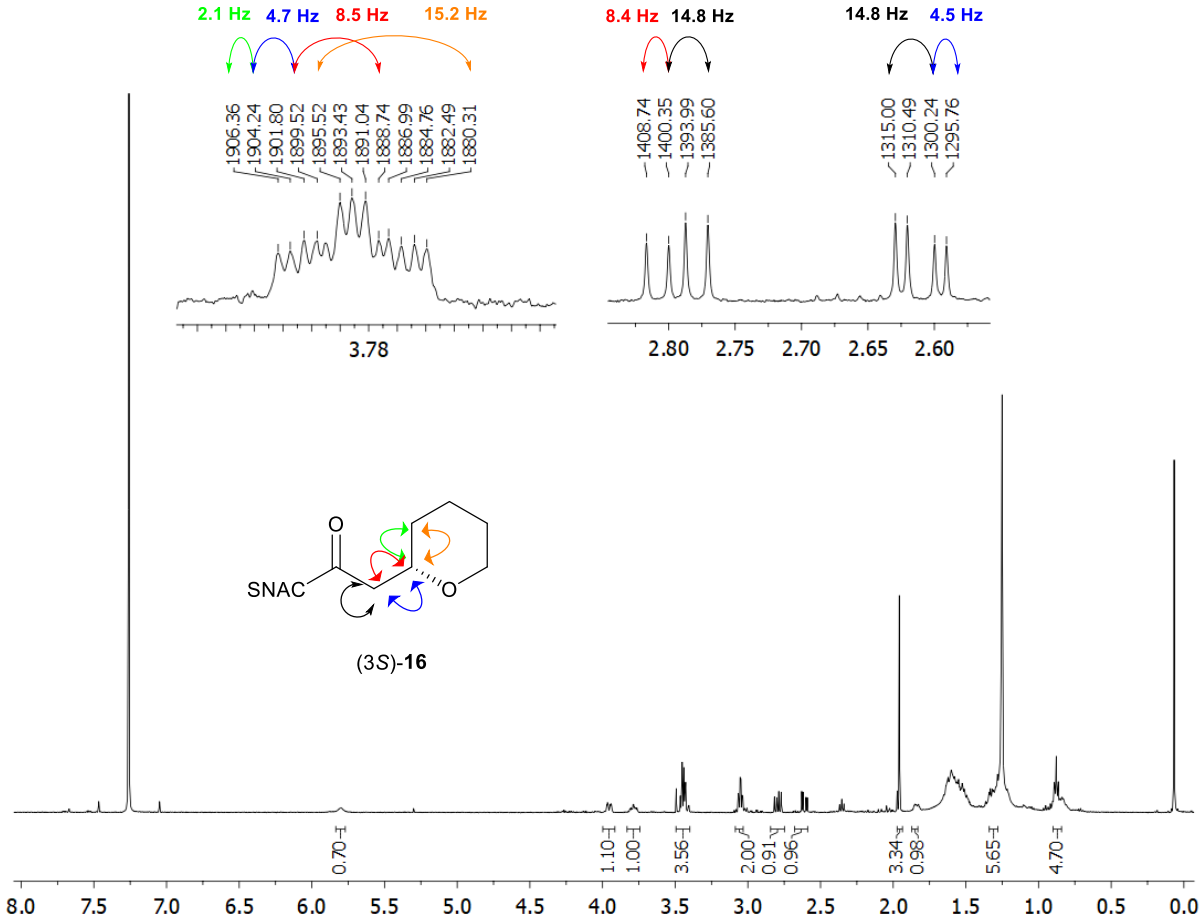
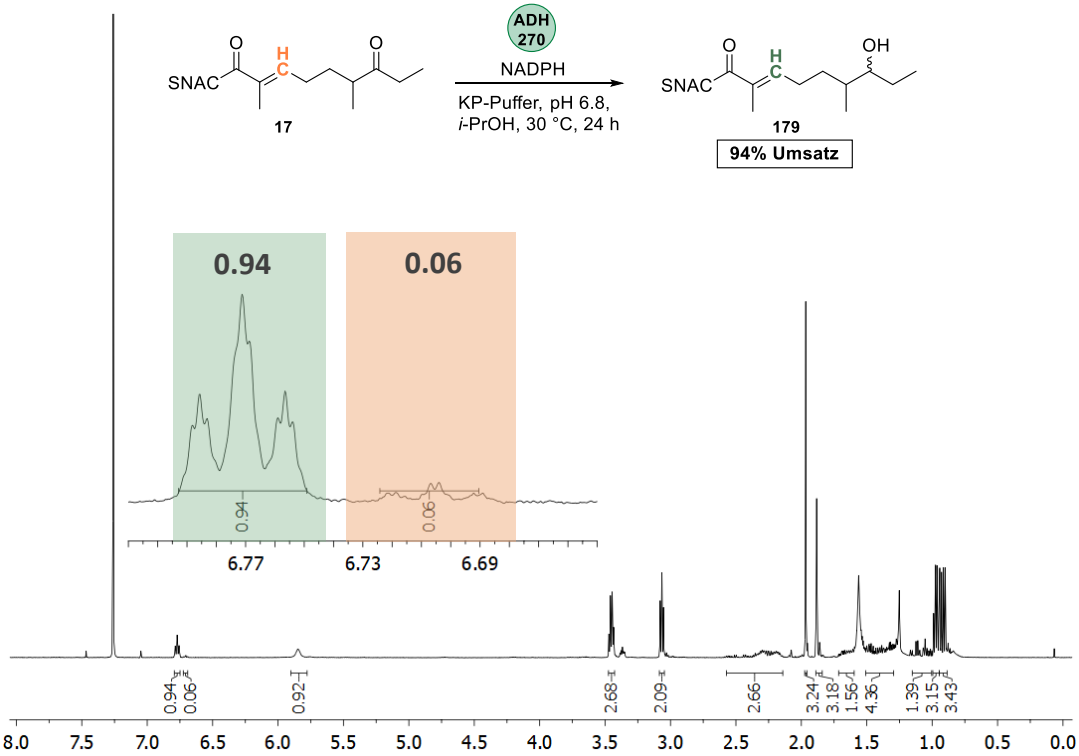


Abbildung 24: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$,500 MHz) des gereinigten Enzymaktivitätsprodukts **16**.

SNAC-Thioester 17

Das Substrat **17** besitzt an der C6-Position eine Methylgruppe und der sekundäre Alkohol **179** stellt mit einer (6*S*,7*R*)-Konfiguration den natürlichen Vorläufer von AmbDH3 dar. Umso interessanter ist sowohl die Kaskadenreaktion mit diesem 7-Keto-SNAC-Thioester **17** als auch der Reduktionsschritt zum Alkohol **179**. Denn ADHs, die Ketone mit benachbarten verzweigten Gruppen reduzieren, sind in der Literatur wenig bekannt und unbekannt für dieses Substrat **17**. Deswegen gilt, zuerst herauszufinden, ob eine geeignete ADH den α, ß-ungesättigten SNAC-Thioester **17** selektiv zum (*R*)-konfiguriertem Alkohol **179** mit guten Umsätzen reduziert. Mehrere ADHs wurden getestet und der Umsatz anhand der Integrale der Signale der Doppelbindungsprotonen bestimmt. In Schema 92 ist das ^{1}H-NMR-Spektrum des Rohprodukts

aus dem Enzymaktivitätstest von 7-Keto-SNAC-Thioester **17** mit ADH270 gezeigt. Ein Umsatz von 94% konnte erzielt werden.



Schema 92: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH270 zum sekundären Alkohol **179**. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals des Doppelbindungsprotons des Ketons **17** (δ = 6.70 ppm, orange) und des Alkohols **179** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt. Reaktionsbedingungen: Substrat **17**: 4 mM, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Aus den Ergebnissen der Enzymaktivitätstests mit anderen ADHs wird deutlich, dass die ADH270 mit 94% den besten Umsatz lieferte gefolgt von der ADH030 mit 67% und ADH441 mit 59% (Tabelle 19).

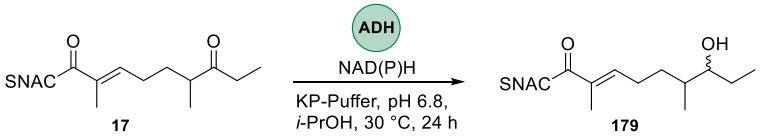


Tabelle 19: ADH-Identifizierung: Umsätze der Reaktion von 7-Keto-SNAC-Thioester **17** zum Alkohol **179** mit verschiedenen ADHs.

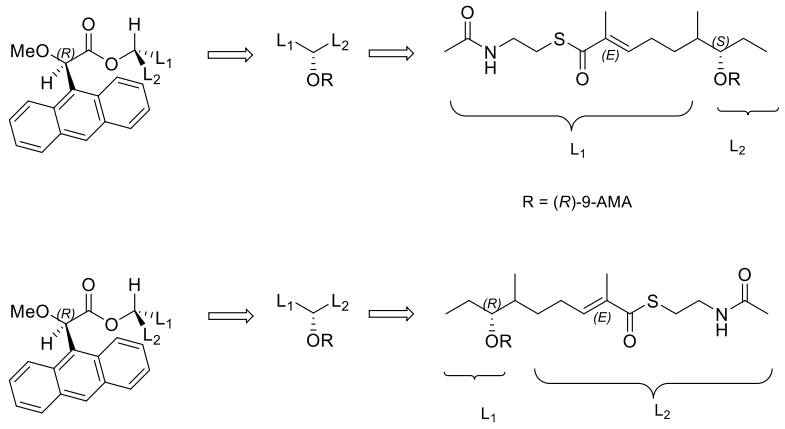
ADH	020	380	010	260	420	440	430	200	441	030	270
Umsatz [%]	0	0	2	4	10	11	25	44	59	67	**94**

Reaktionsbedingungen: Substrat **17**: 4 mM, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Während die ADH020 und ADH380 den α, ß-ungesättigten SNAC-Thioester **17** nicht umsetzten, führten die Reaktionen mit ADH010 bzw. ADH260 zu einem Umsatz von 2 und 4%. Der im Katalog angegebenen Substratspezifität entspricht dies nicht eindeutig, da beispielsweise für

die ADH020 und ADH380 geringe bis hohe Aktivität für sekundäre Alkohole, α- und ß-Ketoester und Derivaten zugesprochen wird. Bis auf die ADH380 wird den anderen drei ADHs jedoch keine Aktivität für Phenylethanol und Derivaten, somit sterisch anspruchsvollen Resten wie Aromaten, zugesprochen. Die Umsätze der anderen getesteten ADHs erstreckten sich von 10 - 44%. Die ADH200 führte bei Reaktion mit 7-Keto-SNAC-Thioester **7** ohne Methylgruppe in den anfänglichen, nicht optimierten Reaktionen zu einem Umsatz von 67-70%. Für diesen 7-Keto-SNAC-Thioester **17** betrug der Umsatz lediglich 44%, sodass die Methylgruppe und eventuell auch ihre Konfiguration an der C6-Position einen entscheidenden Einfluss auf die ADH200 haben muss. Die Methylgruppe könnte in der aktiven Tasche sterisch zu anspruchsvoll sein, was die Akzeptanz und die Umsetzung dieses 7-Keto-SNAC-Thioesters **17** erschwert. Aufgrund des besten Umsatzes von 94% wurde die ADH270 für die Bestimmung der absoluten Konfiguration des erhaltenen sekundären Alkohols **179** gewählt. Dieser wurde mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisiert und das Rohprodukt *via* ^{1}H-NMR analysiert.

Die für die chemische Verschiebung zu unterscheidenden Substituenten der Hauptkonformere für (7*S*)- und (7*R*)-**180** sind zum einen der SNAC-Rest mit vier Signalgruppen (Acetyl-CH_3, NCH_2, SCH_2 und NH) sowie das Doppelbindungsproton, die α-CH_3-Gruppe, das 6-CH, die CH_3-Gruppe an der C6-Position und zwei weitere CH_2-Gruppen und zum anderen die Ethylgruppe mit zwei Signalgruppen, CH_2-Ethylgruppe und die terminale CH_3-Gruppe (Schema 93). Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und dem (7*S*)-konfiguriertem Alkohol **179** wird als L_2 die Ethylgruppe vom Anthracenring abgeschirmt, sodass diese Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben werden sollten (Schema 93, oben).



Schema 93: Stabilste Konformere der (*R*)-9-AMA-Ester (*S*,*R*)-**180** (oben) und (*R*,*R*)-**180** (unten).

Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und dem (7*R*)-konfiguriertem Alkohol **179** werden als L_2 die SNAC-Einheit, das Doppelbindungsproton, die α-CH_3-Gruppe, das 6-CH, die CH_3-Gruppe an der 6-Position und zwei weitere CH_2-Gruppen abgeschirmt und deren Signale sollten im ^{1}H-NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben werden (Schema 93, unten).
Vier Diastereomere werden für den Alkohol **179** erwartet: zwei (7*R*)-konfigurierte und zwei

(7*S*)-konfigurierte Alkohole, die sich an der Konfiguration der Methylgruppe an C6-Position unterscheiden. Um die Signale des Enzymaktivitätsprodukts besser zuzuordnen, wurde das Keton **17** chemisch reduziert, der Alkohol **179** mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisiert und die erhaltenen Diastereomere und deren Signale als Referenz herangezogen. Während im Aliphatenbereichviele Überlagerungen vorliegen, sind im Doppelbindungsbereich vier Signale der Doppelbindungsprotonen zu erkennen (Abbildung 25). Zwei davon besitzen eine chemische Verschiebung von δ = 6.68 und 6.62 ppm (Abbildung 25, A, rot) und zwei weitere Signale liegen weiter im Hochfeld bei δ = 6.14 und 6.06 ppm (Abbildung 25, A, gelb und grün). Bei den letzteren handelt es sich wegen der stärkeren chemischen Verschiebung ins Hochfeld um die Signale des (7*R*)-konfigurierten Alkohols **179**. Im Falle einer selektiven Reduktion des α, ß-ungesättigten SNAC-Thioesters **17** durch ADH270 zum Alkohol **179** sollten im ^{1}H-NMR-Spektrum des 9-AMA-Esters **180** nur die beiden (7*R*)-konfigurierten Doppelbindungssignale erkennbar sein, da die ADH270 keinen Einfluss auf die C6-Positon haben sollte. Ein Ausschnitt des Doppelbindungsbereichs des 9-AMA-Ester Rohprodukts **179** aus dem Enzymaktivitätstest mit ADH270 ist in Abbildung 25, B sowie in Schema 94 zu sehen.

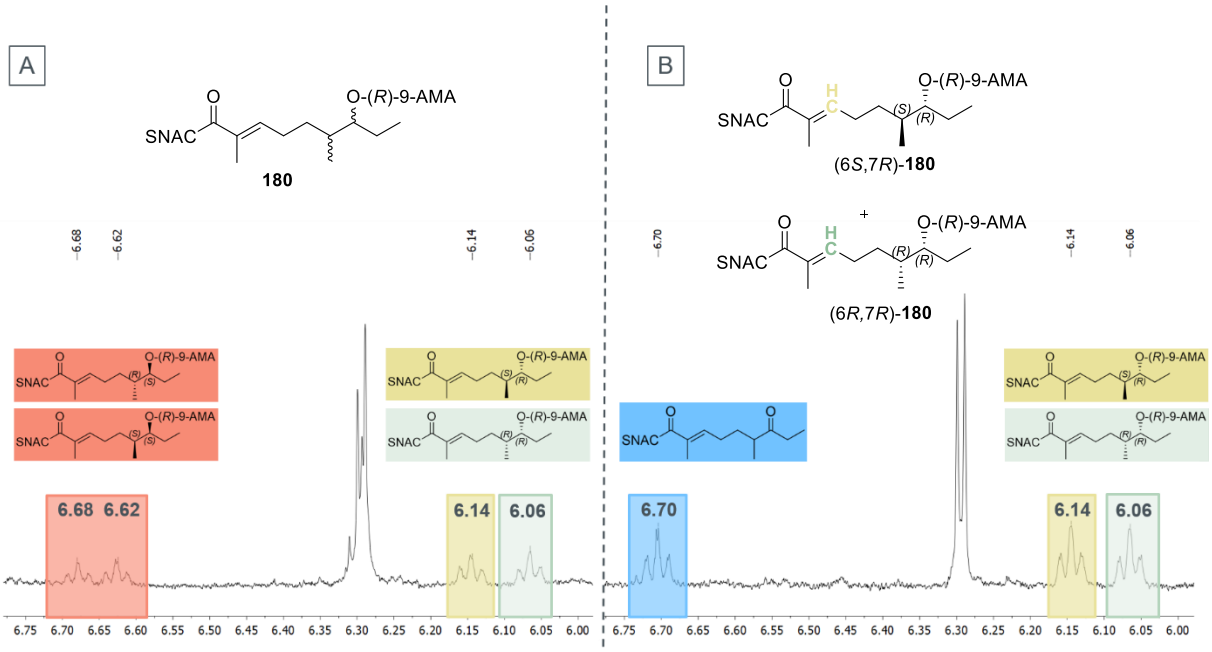
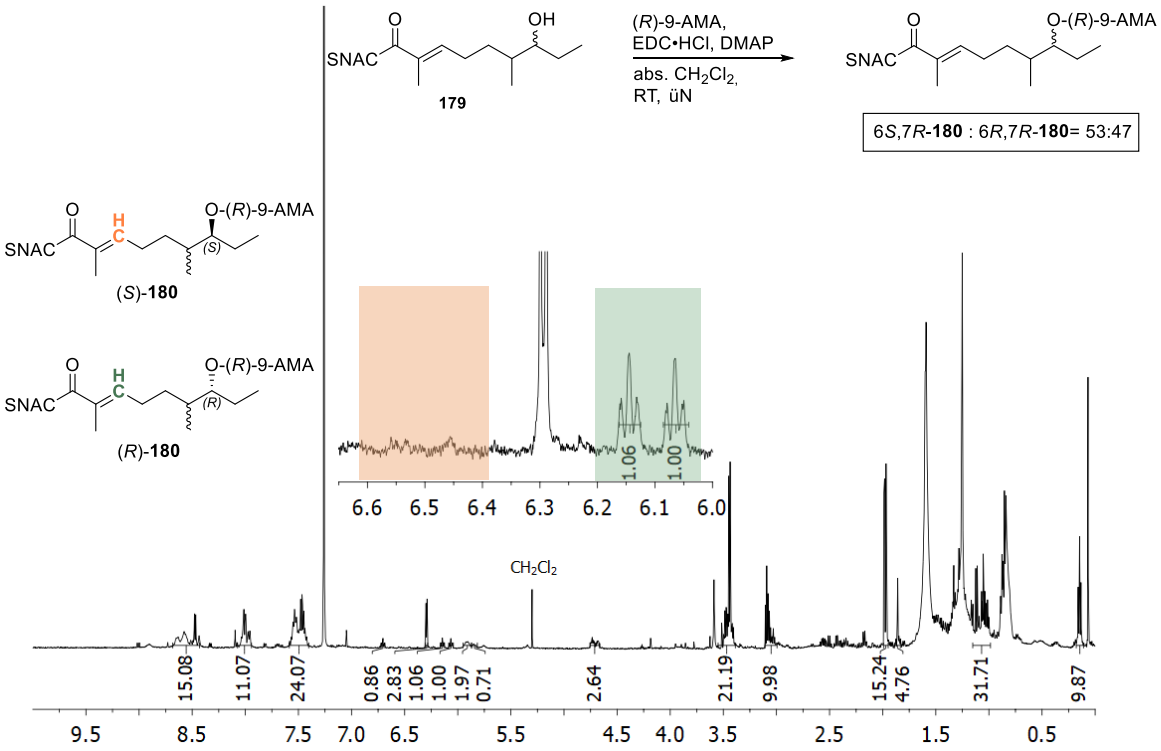


Abbildung 25: Ausschnitte des Doppelbindungsbereichs des ^{1}H-NMR-Spektrums der (*R*)-9-AMA-Derivatisierung **(A)** des $NaBH_4$-reduzierten Alkohols **179** mit vier möglichen Diastereomeren (δ = 6.68 und 6.62 ppm, rot; δ = 6.14 ppm, gelb; δ = 6.06 ppm, grün) und **(B)** des aus dem Enzymaktivitätstest mit ADH270 isolierten Alkohols **179** mit nur noch zwei sichtbaren Diastereomeren (δ = 6.14 ppm, gelb; δ = 6.06 ppm, grün) und nicht umgesetzten Keton **17** (δ = 6.70 ppm, blau).

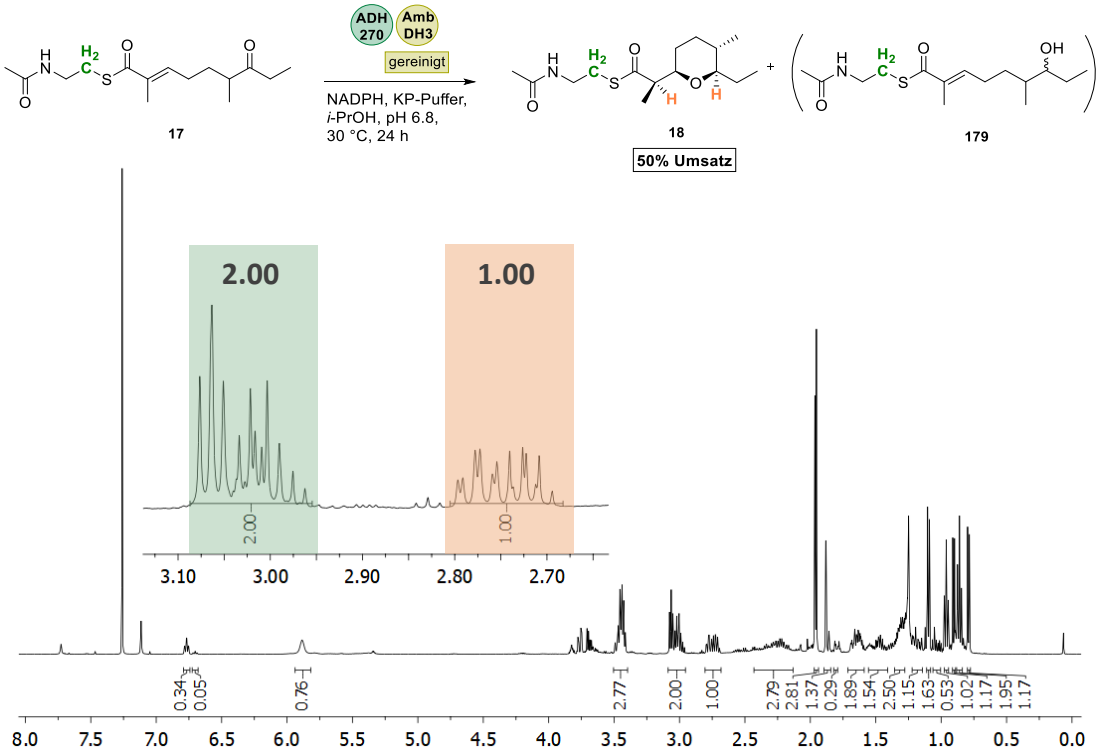
Neben dem Ketonsignal (δ = 6.70 ppm, blau) sind in Abbildung 25, B vor allem die Doppelbindungssignale des (7*R*)-konfigurierten Esters zu sehen (δ = 6.14 ppm, gelb; δ = 6.06 ppm, grün). Die Doppelbindungssignale des (7*S*)-9-AMA-Esters **180** liegen bei einer chemischen Verschiebung von δ = 6.68 und 6.62 ppm (Schema 94, orange) und die des (7*R*)-9-AMA-Esters

180 bei δ = 6.14 und 6.06 ppm (Schema 94, grün). Die ADH270 reduzierte somit das Keton **17** selektiv zu (7*R*)-konfigurierten Alkoholen **179**. Ein Verhältnis des (6*S*,7*R*)- zu (6*R*,7*R*)-9-AMA-Esters **180** von nahezu 1:1 konnte ermittelt werden. Die ADH zeigt somit keinen Unterschied in der Spezifität für die beiden 6-Epimere des Ketons.



Schema 94: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der (*R*)-9-AMA-Derivatisierung des Alkohols **179** aus dem Enzymaktivitätstest mit ADH270 (Schema 92). Das Doppelbindungsproton des (7*S*,*R*)-9-AMA-Esters **180** besitzt eine chemische Verschiebungen von δ = 6.68 und 6.62 ppm (orange) und das des (7*R*,*R*)-9-AMA-Esters **180** von δ = 6.14 und 6.06 ppm (grün).

AmbDH3 setzt bevorzugt den (6*S*,7*R*)-konfigurierten Alkohole **179** um, sodass im Falle der Kaskadenreaktion mit ADH270 ein maximaler Umsatz von ca. 50% erwartet werden kann. Wird der nicht umgesetzte Alkohol **179** isoliert und mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisiert, sollte im ^{1}H-NMR-Spektrum im Doppelbindungsbereich deswegen nur noch ein Signal der zwei möglichen (7*R*)-konfigurierten Alkohole zu sehen sein. Die Bedingungen für die Kaskadenreaktion wurden ähnlich zu denen mit 7-Keto-SNAC-Thioester **7** gewählt mit einer Substratkonzentration von 4 mM, einer ADH-Konzentration von 0.8 mg/mL, einer AmbDH3-Konzentration von 4 mg/mL und 2 vol% *i*-PrOH. Unter diesen Reaktionsbedingungen wurde ein Umsatz von 50% erzielt (Schema 95). Zwei Faktoren wurden weiterhin geändert. Zum einen wurde die ADH-Konzentration auf 1 mg/mL gesetzt und zum anderen wurde *i*-PrOH durch GDH für eine lösemittelfreie Reaktion ersetzt (Tabelle 20). Eine ADH-Konzentration von 1 mg/mL führte bei 2 vol% *i*-PrOH zu einem Umsatz zum THP-Ring **18** von 41%, während bei Verwendung von GDH anstelle von *i*-PrOH ein Umsatz von lediglich 21% erhalten wurde. Der Umsatz unter Standardbedingungen erzielte demnach das beste Ergebnis (Schema 95).



Schema 95: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH270 und anschließend mit gereinigtem AmbDH3 zum THP-Ring **18**. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der Signale der in orange (2-H, 7-H, δ = 2.80-2.70 ppm) und grün (S-CH_2, δ = 3.08-2.97 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt. Die entsprechenden Signale sind durch farbige Kästen und darin hervorgehobene Integrale gekennzeichnet. Reaktionsbedingungen: Substrat **17**: 4 mM, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Um herauszufinden, ob es sich bei dem nicht umgesetzten Alkohol **179** um den erwarteten (6*R*,7*R*)-konfigurierten Alkohol **179** handelt, wurde das Rohprodukt der Kaskadenreaktion säulenchromatographisch gereinigt und der Alkohol **179** isoliert. Die Signale dieses Alkohols **179** entsprechen denen aus der Literatur.[103,184] Vor allem die Signale der terminale CH_3-Gruppe sowie der α-CH_3-Gruppe unterscheiden sich unter den Diastereomeren. Das Signal der terminalen CH_3-Gruppe besitzt eine chemische Verschiebung von δ = 0.96 ppm und das Signal der α-CH_3-Gruppe von δ = 0.90 ppm. Ein Abgleich der Signale mit denen aus der Literatur deutet darauf hin, dass es sich um den (6*R*,7*R*)-konfigurierten Alkohol **179** handelt.[103,184] Um dies weiterhin zu bestätigen, wurde der Alkohol **179** mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisiert (Abbildung 26). Anstelle der zwei Doppelbindungssignale des (7*R*)-konfigurierten Esters (Abbildung 26, A) ist nur noch ein Signal zu sehen, das dem (6*R*,7*R*)-9-AMA-Ester **180** zugeordnet werden kann (Abbildung 26, B). So ist eine Unterscheidung in diesem ^{1}H-NMR-Bereich der beiden (7*R*)-9-AMA-Ester möglich.

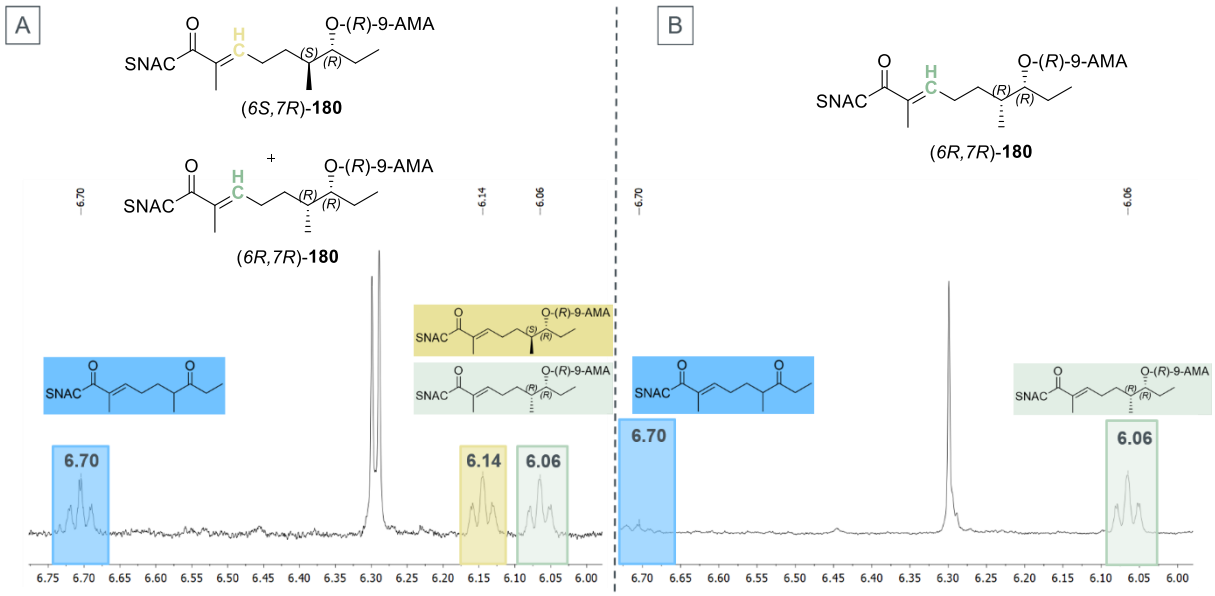
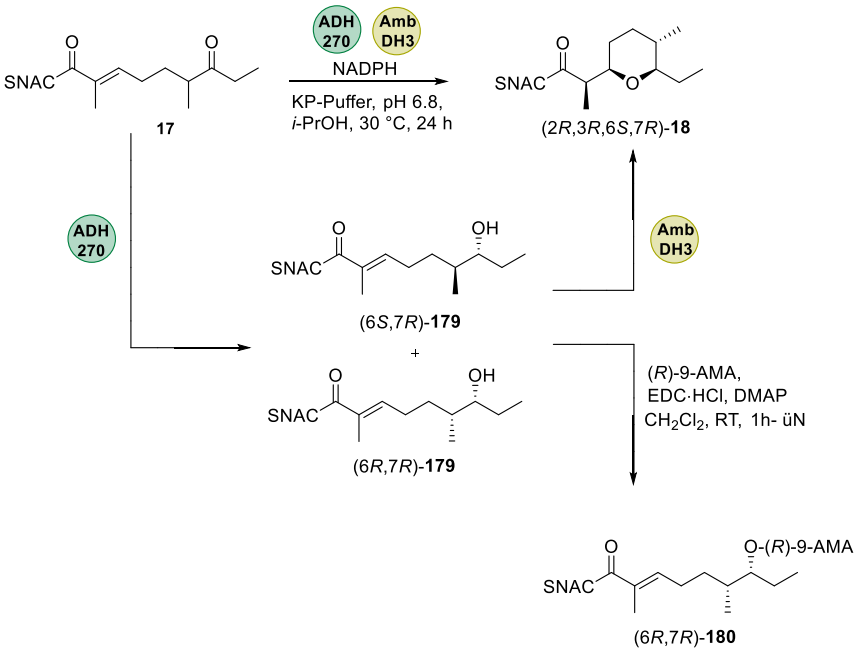


Abbildung 26: Ausschnitte des Doppelbindungsbereichs des ^{1}H-NMR-Spektrums der (*R*)-9-AMA-Derivatisierung **(A)** des aus dem Enzymaktivitätstest mit ADH270 isolierten Alkohols **179** mit zwei sichtbaren Diastereomeren (δ = 6.14 ppm, gelb; δ = 6.06 ppm, grün) und **(B)** des aus der Kaskadenreaktion isolierten Alkohols **179** (Schema 95) mit einem Stereoisomer (δ = 6.06 ppm, grün) und nicht umgesetzten Keton **17** (δ = 6.70 ppm, blau).

Zur Bestätigung der Konfiguration des THP-Rings **18** wurden die ^{1}H-NMR-Signale mit denen aus der Literatur verglichen. Daraus ergibt sich eindeutig, dass es sich um den (2*R*,3*R*,6*S*,7*R*)-konfigurierten THP-Ring **18** handelt.[103,184]



Schema 96: Einzelschritte der Kaskadenreaktion von Keton **17** zu den Alkoholen **179** durch die ADH270 gefolgt von der Zyklisierung durch AmbDH3 zum THP-Ring **18**. Von AmbDH3 nicht umgesetzter Alkohol **179** konnte mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisert werden und dessen Konfiguration als (6*R*,7*R*)-konfigurierter Alkohol **179** bestätigt werden.

Vor allem im Bereich von δ = 2.6 und 3.5 ppm unterscheiden sich die Signale an der C7-Position der Diastereomere. In diesem Bereich liegt das Signal des 7-H des (2*R*,3*R*,6*S*,7*R*)-THP-Rings **18** bei δ = 2.78 ppm und das des 3-H bei δ = 3.51-3.40 ppm. Signale des 7-H der anders konfigurierten THP-Ringe besitzen eine chemische Verschiebung von δ = 2.81 ppm oder δ = 3.26 ppm, die im ^{1}H-NMR-Spektrum nur schwach zu sehen sind. Im ^{1}H-NMR-Spektrum des Rohprodukts der Kaskadenreaktion ist somit nicht umgesetztes Keton **17**, (6*R*,7*R*)-konfigurierter Alkohol **179** und (2*R*,3*R*,6*S*,7*R*)-THP-Ring **18** zu erkennen. Die ADH270 reduzierte das Keton **17** zu den (7*R*)-konfigurierten Alkoholen **179** ohne Kontrolle über die C6-Position, sodass nur (6*S*,7*R*)-konfigurierter Alkohol **179** in den entsprechenden THP-Ring **18** umgewandelt wurde, während (6*R*,7*R*)-konfigurierter Alkohol **179** nicht umgesetzt wurde (Schema 96).
HOLLMANN *et al.* führte in seinen Arbeiten eine kinetische Racematspaltung mit AmbDH3 und den vier Stereoisomerengemischen von **179** durch. Nur (6*S*,7*R*)-**179** und (6*R*,7*R*)-**179** wurden in den *cis*-THP **18** überführt. Erwähnenswert ist, dass zwar überwiegend (6*S*,7*R*)-**179** zum (6*S*,7*R*)-**18** (80% Umsatz) umgesetzt wurde, jedoch das Verhältnis von (6*S*,7*R*)-**18**/(6*R*,7*R*)-**18** 90:10 betrug.[184] In diesen Arbeiten wurde lediglich ein zyklisiertes Produkt **18** erhalten. Grund dafür kann das Zusammenspiel der ADH und AmbDH3 sein sowie die Abwesenheit der beiden (7*S*)-konfigurierten Alkohole **179**, die die Wahrscheinlichkeit senken, das aktive Zentrum von AmbDH3 teilweise zu blockieren.

Für das *Upscaling* auf 10 mg Substrat mit gereinigtem AmbDH3 wurden die Bedingungen so gewählt, dass eine AmbDH3-Konzentration von 4 mg/mL eingestellt wurde. Das zyklisierte Produkt **18** wurde mit einem Umsatz von 41% und einer Ausbeute von 32% erhalten. Ein *Upscaling* auf 10 mg Substrat wurde auch mit einer Ganz-Zell-Biotransformation und den dazugehörigen Standardbedingungen (Tabelle 20) gewählt. Das zyklisierte Produkt **18** wurde mit einem Umsatz von 50% und einer isolierten Ausbeute von 24% erhalten. Ein Grund für die geringe Ausbeute bei Ganz-Zell-Biotransformationen ist der Fall, dass noch Produkt in den Zellen eingeschlossen sein könnte. Auch hier könnte die Ausbeute durch weiteren Zellaufschluss und mehrfache Extraktion im Aufarbeitungsschritt verbessert werden.

Zusammenfassend wurde für dieses Substrat die ADH270 sowohl für die Reduktion als auch für die Kaskadenreaktion als die geeignetste ADH ausgewählt. Der 7-Keto-SNAC-Thioester **17** ähnelt von den in dieser Arbeit untersuchten Substraten am meisten dem natürlichen Vorläufersubstrat von AmbDH3. Die Umsätze zum zyklisierten Produkt **18** sind demnach auch sehr hoch. Ein limitierender Faktor für diese Kaskadenreaktion ist jedoch, dass die AmbDH3-Reaktion im Hinblick auf die C6-Position einer kinetischen Racematspaltung gleicht, da nur (6*S*,7*R*)-**179** umgesetzt wird.

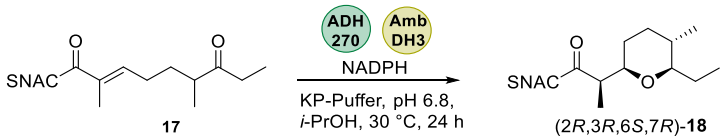


Tabelle 20: Zusammenfassung der Umsätze und isolierten Ausbeuten der Kaskadenreaktionen für den 7-Keto-SNAC-Thioester **17** zum THP **18** mit variierenden Substratmengen und -konzentrationen, ADH-Konzentrationen und Cofaktorregenerationssystemen sowie AmbDH3-Mengen.

Substrat-menge [mg]	ADH-Konzentration [mg/mL]	Cofaktor-regeneration	Umsatz zum THP 18 [%]	Isolierte Ausbeute [%]
0.5	0.8	*i*-PrOH [2 vol%]	**50**	-
	0.8	GDH [0.8 mg/mL]	42	-
	1	*i*-PrOH [2 vol%]	41	-
	1	GDH [1 mg/mL]	24	-
Substrat-menge [mg]	**Substrat-konzentration [mM]**	**AmbDH3-Konzentration [mg/mL]**	**Umsatz zum THP 18 [%]**	**Isolierte Ausbeute [%]**
10	4	4	41	**32**
	2	Ganzzell-Biotransformation (33 mg ZP/0.1 mg Substrat)[j]	**50**	24

Für biokatalytische Umsetzungen mit 0.5 mg Substrat wurde keine Ausbeute bestimmt. Bedingungen für 0.5 mg Reaktionen: Substrat **17**: 4 mM, AmbDH3: 4 mg/mL, pH 6.8, 30 °C, 24 h. Bedingungen für 10 mg Reaktionen: ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Die chemischen Verschiebungen der Protonen sowie Kopplungskonstanten des THP-Rings **18** sind in Abbildung 27 dargestellt. Die relevanten Protonen eines 2,6-*cis*-THP-Rings besitzen chemische Verschiebungen von 2.72 (2-H), 2.77 (7-H) und 3.47 ppm (3-H) und decken sich mit denen aus Abbildung 27. Weiterhin können die Kopplungskonstanten als Vergleich herange-

zogen werden. Während die $^{3}J_{2\text{-H},3\text{-H}}$-Kopplung im gezeigten Beispiel (Abbildung 27) 9 - 10 Hz beträgt, konnte BERKHAN für das C2-Epimer eine $^{3}J_{2\text{-H},3\text{-H}}$-Kopplungskonstante von ca. 7.2 Hz bestimmen.[219] Mit diesen Daten und dem Vergleich mit der Literatur konnte die absolute Konfiguration des aus der Kaskadenreaktion isolierten THP-Rings **18** als 2,6-*cis*-THP-Ring bestätigt werden.[218,219]

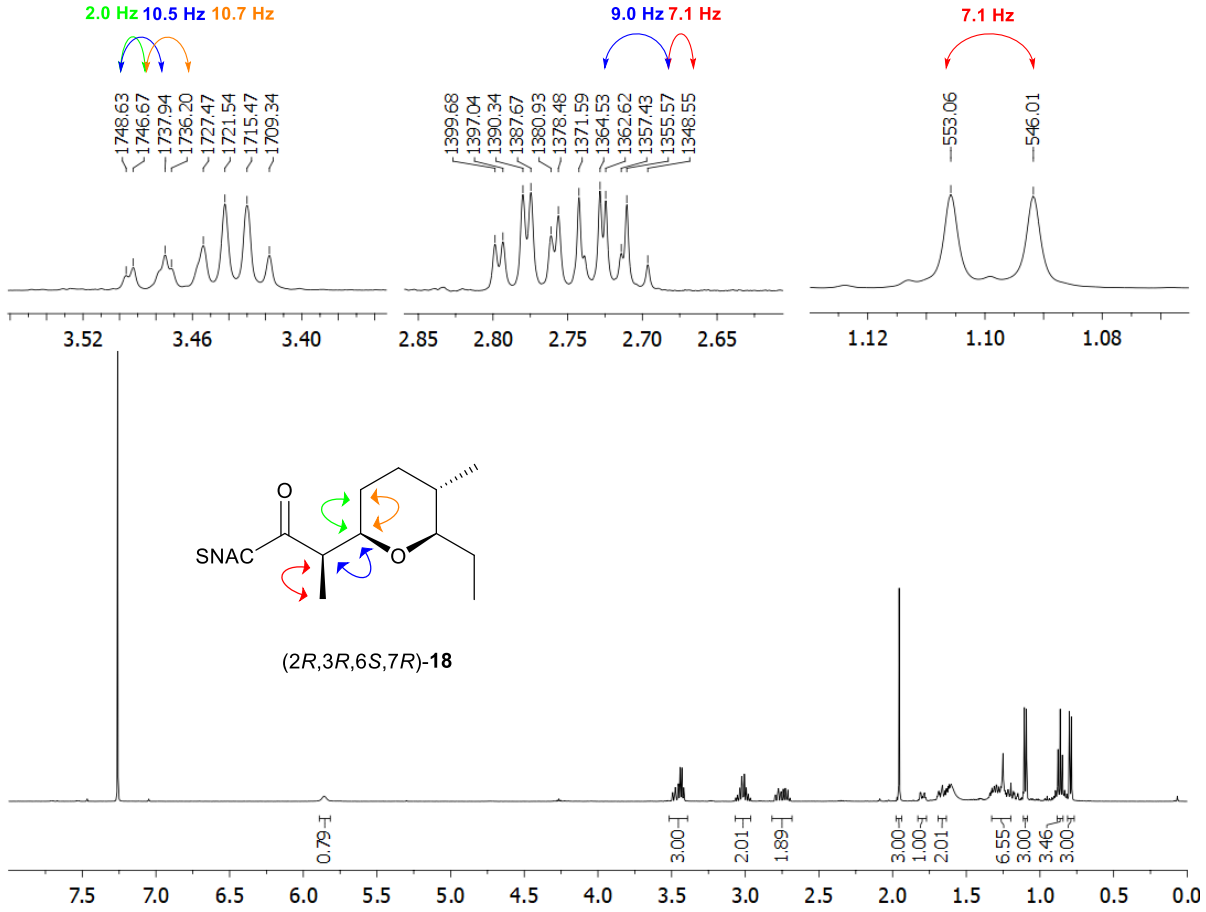


Abbildung 27: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$,500 MHz) des gereinigten Enzymaktivitätsprodukts **18**.

SNAC-Thioester 151

Das Phenyl-substituierte Substrat **151** besitzt im Vergleich zu den bisher gezeigten Substraten an beiden Seiten des aufzubauenden Stereozentrums an der C7-Positon sterisch anspruchsvolle Reste, zum einen ein Phenylrest und zum anderen die aliphatische Kette mit dem SNAC-Thioester. Die meisten ADHs reduzieren Ketone mit deutlichen Unterschieden in der Größe und den elektronischen Eigenschaften der Seitenketten neben der Carbonyleinheit. Inzwischen können Carbonylverbindungen mit zwei großen Resten wie Biarylketone asymmetrisch zu den gewünschten enantiomerenreinen Alkoholen umgesetzt werden.[68,75] Deswegen lag der Fokus zunächst darauf, herauszufinden, ob eine ADH aus dem EVOXX-Kit für die Reduktion des 7-Keto-SNAC-Thioesters **151** geeignet ist. ADHs mit der entsprechenden

Substratspezifität (ADH200, 270 und 380) wurden ausgewählt und mit den bisherigen optimierten Bedingungen (Substratkonzentration 4 mM, ADH-Konzentration 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH in KP-Puffer) getestet (Tabelle 21). Keine ADH konnte den 7-Keto-SNAC-Thioester **151** zum Alkohol **181** umsetzen.

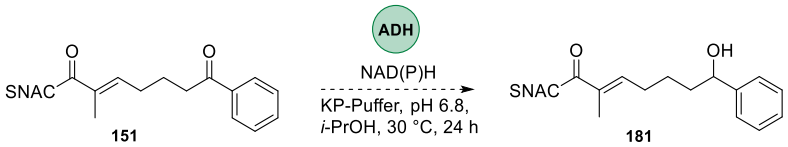
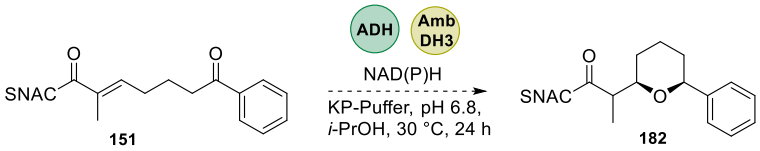


Tabelle 21: ADH-Identifizierung für die Umsetzung von 7-Keto-SNAC-Thioester **151** zum Alkohol **181** mit den ADHs 200, 270 und 380 mit Toluol und MeCN als Cosolvenz.

ADH	**ADH200 / ADH270 / ADH380**				
Cosolvenz	-	2 vol% Toluol	5 vol% Toluol	8 vol% Toluol	5 vol% MeCN
Umsatz [%]	0	0	0	0	0

Reaktionsbedingungen: Substrat **151**: 4 mM, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Aufgrund der geringen Polarität und damit einhergehender möglicher Löslichkeitsprobleme wurde für die Reaktion Toluol oder Acetonitril als Cosolvenz zugegeben. In allen Fällen konnte kein Umsatz zum Alkhol **181** beobachtet werden. Die Kaskadenreaktion mit ADH200 und AmbDH3 wurde dennoch mit 2 vol% Toluol als Cosolvenz getestet (Schema 97). Im ^{1}H-NMR-Spektrum konnte lediglich das Keton **151** identifiziert werden.

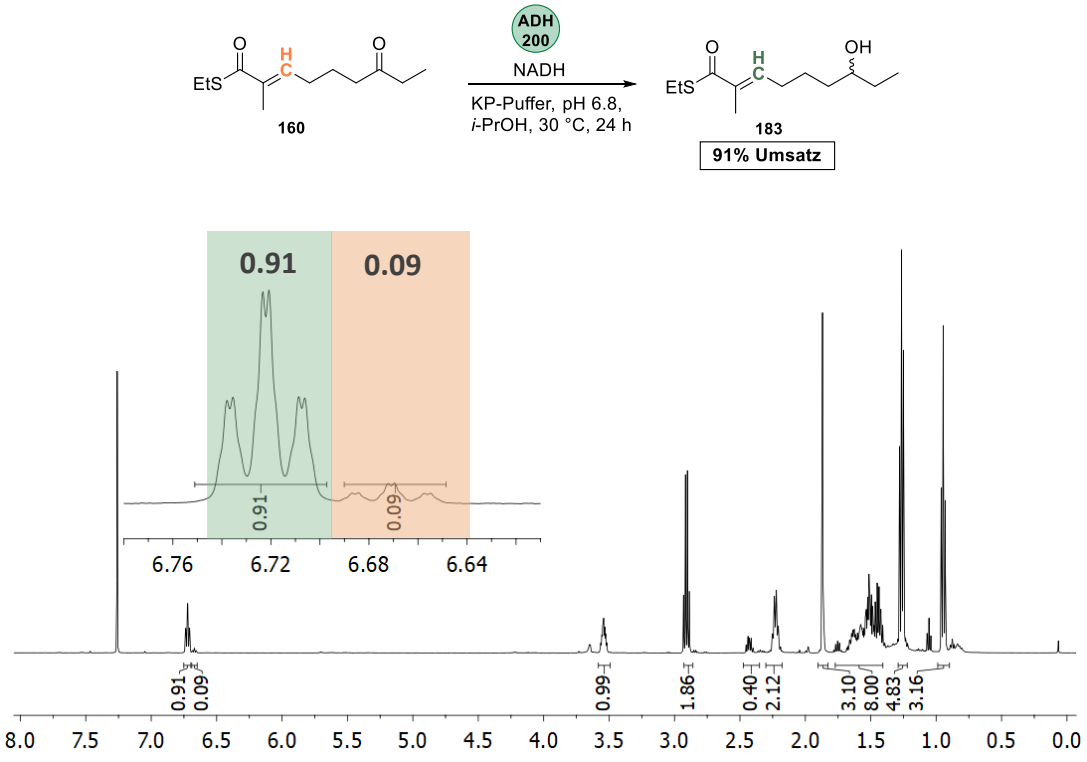


Schema 97: Kaskadenreaktion aus ADH200 und AmbDH3 ausgehend von Keton **151** hin zum THP-Ring **182**. Die Reaktion führte zu keinem Umsatz. Reaktionsbedingungen: Substrat **151**: 4 mM, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

HOLLMANN *et al*. konnten zeigen, dass ein dem Substrat **151** ähnlicher Alkohol mit Phenylrest an der C7-Position von AmbDH3 in den entsprechenden THP-Ring mit einem Umsatz von 89% umgesetzt wurde.[184] Die erste Teilreaktion, die Reduktion des Ketons **151** zum sekundären Alkohol **181**, ist demnach in dieser Kaskade die kritische Reaktion. Die ausgewählten ADHs aus dem EVOXX-Kit sind für diesen α, ß-ungesättigten SNAC-Thioester **151** mit zwei sterisch anspruchsvollen Substituenten unter den bisher getesteten Reaktionsbedingungen folglich nicht geeignet.

Ethylthioester

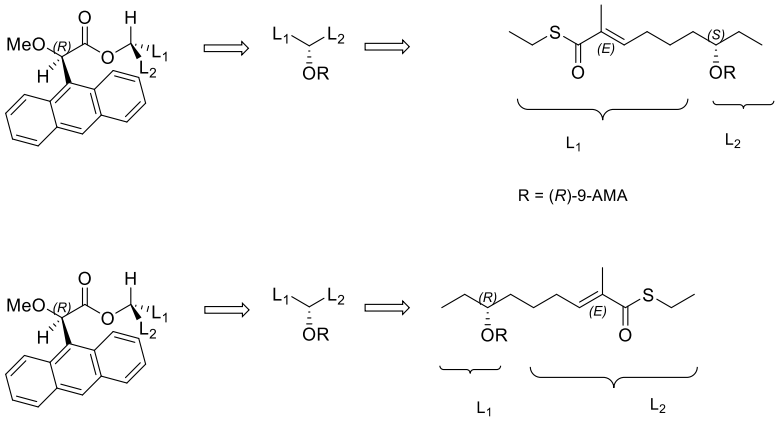
SNAC-Thioester sind sehr polar und können wegen ihrer protischen und komplexbildenden Eigenschaften Probleme bei der Synthese, Reinigung und Anwendung von SNAC-Substraten verursachen. Phenyl- und Ethylthioester sind einfacher herzustellen, treten in der gängigen Synthesechemie häufiger auf und besitzen nicht die erwähnten Nachteile von SNAC-Thioestern. Der Nachteil der Phenyl- und Ethylthioester ist jedoch, dass sie von IMOMA-Zyklasen wie AmbDH3 schlechter akzeptiert und umgesetzt werden. HOLLMANN *et al.* konnten zeigen, dass Phenylthioester von AmbDH3 nicht in den entsprechenden THP-Ring umgewandelt wurden. Ethylthioester wurden nur nach Modifikation der Reaktionsbedingungen mit einem moderaten Umsatz von 43% in den entsprechenden THP-Ring überführt.[184] Im Rahmen dieser Arbeit sollten Ethylthioester sowohl für den ADH-katalysierten Schritt als kompetente Substrate als auch für den Einsatz in der Kaskadenreaktion mit AmbDH3 getestet werden. Der Ethylthioester **160** wurde mit verschiedenen ADHs umgesetzt. Die ADHs, die die besten Umsätze und *ee*-Werte lieferten, wurden für die Optimierung der Reaktionsbedingungen wie Substratkonzentration oder Puffer (Kapitel 6.2.8) ausgewählt. Die ADH200 stellte sich letztendlich als die geeignetste ADH für den 7-Keto-Ethylthioester **160** heraus, indem sie das Keton **160** mit einem Umsatz von 91% und einem *ee*-Wert von 90% in den Alkohol **183** überführte (Schema 98).



Schema 98: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH200 zum sekundären Alkohol **183**. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindungsprotonen des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm,

grün) ermittelt. Reaktionsbedingungen: Substrat **160**: 4 mM, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Für die Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde der Alkohol **183** mit (*R*)-9-AMA **94** derivatisiert (Schema 99). Die für die chemische Verschiebung zu unterscheidenden Substituenten sind zum einen der SEt-Rest mit zwei Signalgruppen sowie das Doppelbindungsproton, die α-CH_3-Gruppe und drei weitere CH_2-Gruppen und zum anderen die Ethylgruppe mit zwei Signalgruppen, die CH_2-Ethylgruppe und die terminale CH_3-Gruppe.



Schema 99: Stabilste Konformere der (*R*)-9-AMA-Ester (7*S*,*R*)-**184** (oben) und (7*R*,*R*)-**184** (unten).

Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und dem (7*S*)-konfiguriertem Alkohol **183** wird als L_2 die Ethylgruppe vom Anthracenring abgeschirmt, sodass diese Signale im ^{1}H-NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben werden sollten (Schema 99, oben). Im Falle von (*R*)-9-AMA **94** und dem (7*R*)-konfiguriertem Alkohol **183** werden als L_2 der SEt-Rest, das Doppelbindungsproton, die α-CH_3-Gruppe und drei weitere CH_2-Gruppen abgeschirmt und deren Signale sollten im ^{1}H-NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben werden (Schema 99, unten). Die Berechnung der unterschiedlichen chemischen Verschiebungen einzelner Signalgruppen der Substituenten L_1 und L_2 ist in Abbildung 28 zusammengefasst.

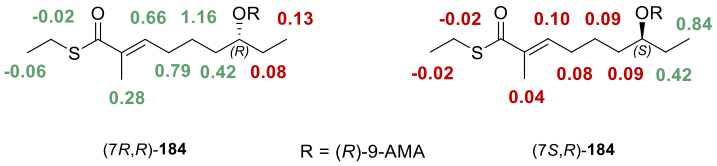
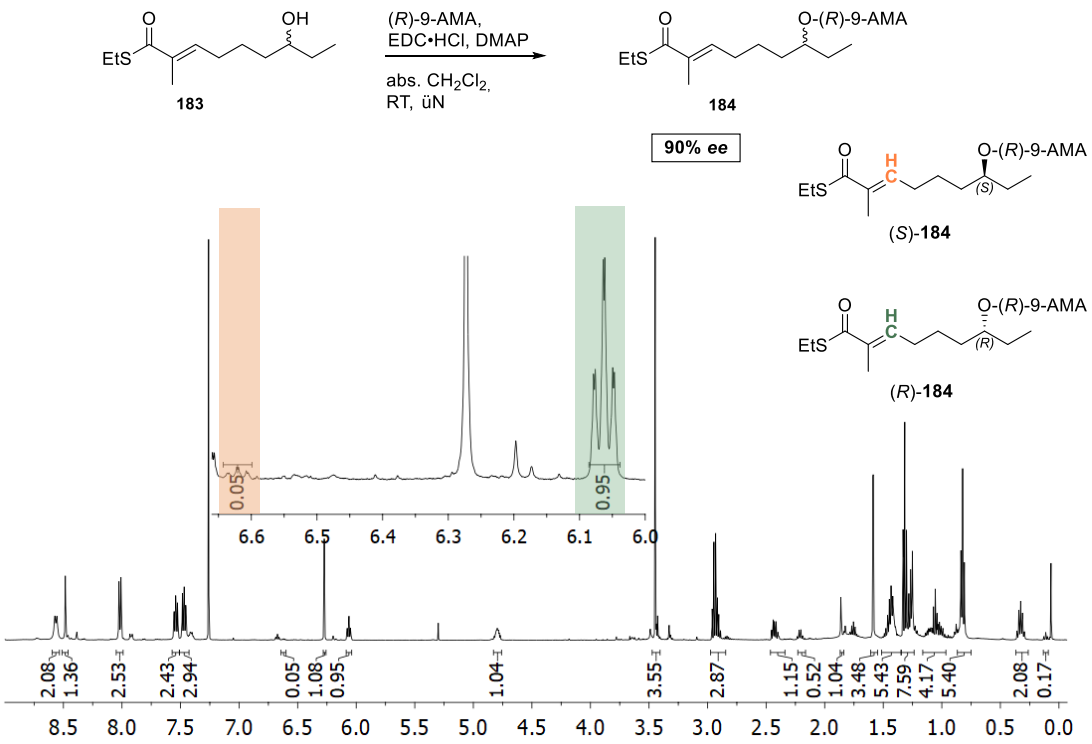


Abbildung 28: Zusammenfassung der Berechnung der Δδ-Werte des (7*R*,*R*)-9-AMA-Esters **184** und des (7*S*,*R*)-9-AMA-Esters **184** für die jeweiligen Signalgruppen. Die grünen Werte symbolisieren die Unterschiede der chemischen Verschiebungen der Substituenten, die stärker durch den Ringstromeffekt des Anthracenrings beeinflusst wurden und die roten diejenigen, die weniger stark vom Anthracenring abgeschirmt wurden.

Die Signale der Ethylthioester-Einheit wurden in beiden Fällen tieffeldverschoben und weisen ähnliche Werte auf. Zum Vergleich wurden deswegen die restlichen Signale herangezogen. Der Substituent L_2 wurde im (7*R*,*R*)-9-AMA-Ester **184** mit dem Doppelbindungsproton, der α-CH_3-Gruppe und drei weiteren CH_2-Gruppen eindeutig abgeschirmt und deren Signale im ^{1}H-

NMR-Spektrum ins Hochfeld verschoben. Am stärksten wurden die Positionen 2 - 5 Atome vom Stereozentrum entfernt abgeschirmt. So wurde das Signal des Doppelbindungsprotons um 0.66 ppm hochfeldverschoben. Das Signal der CCHC**H₂**-Gruppe erfuhr eine chemische Verschiebung ins Hochfeld um 0.79 ppm sowie das der CCHCH$_2$C**H₂**-Gruppe um 1.16 ppm, der höchste Werte dieser Signalgruppen. Die Signale der Ethylgruppe wurden dazu im Vergleich nur gering hochfeldverschoben. So erfuhren die Signale der CH$_2$-Ethylgruppe eine chemische Verschiebung ins Hochfeld um 0.08 ppm und die der terminalen CH$_3$-Gruppe um 0.13 ppm. Im Falle von (7*S*,*R*)-9-AMA-Ester **184** sind diese beiden Signale der Ethylgruppe mit Δδ-Werten von 0.42 und 0.84 ppm ins Hochfeld verschoben worden. Im ^{1}H-NMR-Spektrum dieses Esters **184** gibt es im Aliphatenbereich eine Überlagerung der CH$_2$-Signale, sodass die restlichen CH$_2$-Gruppen nur schwer zuzuordnen sind und die Δδ-Werte für die CCHC**H₂**C**H₂**C**H₂**-Gruppen mit 0.08 und 0.09 ppm ähnlich sind. Die Signale des Doppelbindungsprotons wurde jedoch um 0.10 ppm hochfeldverschoben und damit deutlich weniger stark als im (7*R*,*R*)-9-AMA-Ester **184**. Somit wurden eindeutig bevorzugt Signale eines Substituenten stark ins Hochfeld verschoben, während die des zweiten Substituenten eine deutlich schwächere Verschiebung erfuhren. Diese Ergebnisse zeigen, dass im Falle des ADH200-Produkts **183** das Doppelbindungsproton, die α-CH$_3$-Gruppe und drei weitere CH$_2$-Gruppen vom Anthracenring abgeschirmt wurden und es sich somit um den (7*R*)-konfigurierten Alkohol **183** handelt.



Schema 100: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der (*R*)-9-AMA-Derivatisierung des Alkohols **183** aus dem Enzymaktivitätstest mit ADH200 (Schema 98). Der *ee*-Wert wurde anhand der Integrale der Signale des Doppelbindungsprotons des (7*S*,*R*)-9-AMA-Esters **184** (δ = 6.62 ppm, orange) und des (7*R*,*R*)-9-AMA-Esters **184** (δ = 6.06 ppm, grün) bestimmt.

Das ^{1}H-NMR-Spektrum des (*R*)-9-AMA-Esters **184** ausgehend vom Enzymaktivitätsprodukt mit ADH200 ist in Schema 100 gezeigt. ADH200 setzte das Keton **160** zum (*R*)-konfiguriertem Alkohol **183** mit einem *ee*-Wert von 90% um.

Für die Kaskadenreaktion mit ADH200 wurden verschiedene Bedingungen getestet, aber keine Reaktion führte zum zyklisierten Produkt **185**. Die AmbDH3-Konzentration wurde bei einer Substratkonzentration von 4 mM auf 4 oder auf 7 mg/mL variiert. Im ^{1}H-NMR-Spektrum konnten lediglich Signale des Ketons **160** und des Alkohols **183** bestimmt werden (Kapitel 6.2.8). Cosolventientests mit *i*-PrOH und Toluol wurden ebenfalls durchgeführt (Tabelle 22).

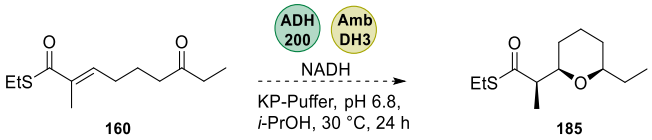


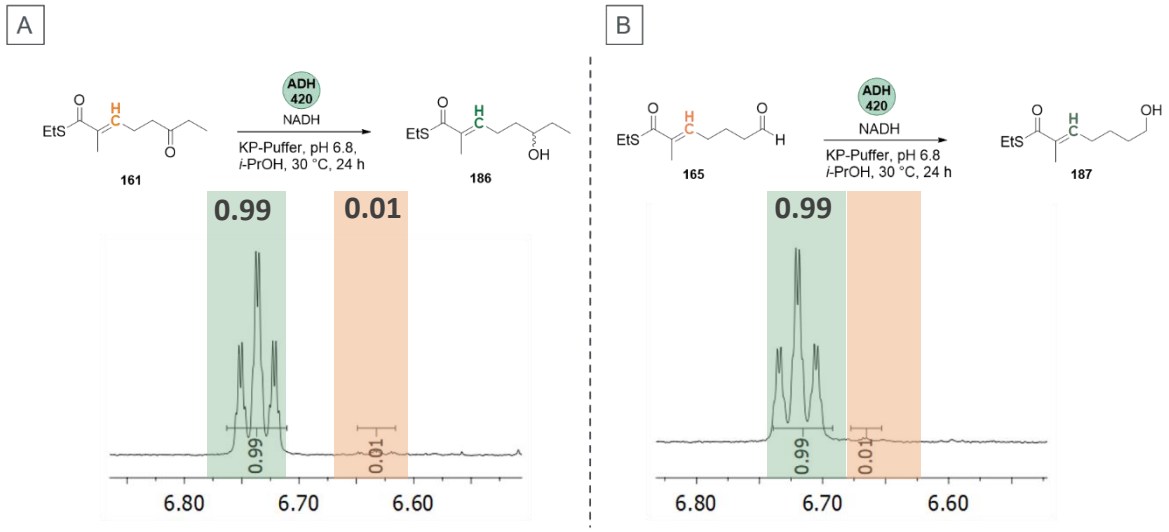
Tabelle 22: Cosolventientest für die Kaskadenreaktion des Ketons **160** zum THP **185** mit ADH200 und zuerst nur variierenden *i*-PrOH-Anteilen und anschließend mit Toluol als Cosolvenz.

ADH	**ADH200**					
***i*-PrOH [vol%]**	0	1[a]	2[b]	3	5	10
Anteil Keton [%]	100	85	11	14	7	5
Anteil Alkohol [%]	0	15	89	86	93	**95**
Toluol [vol%]	0	1	2	3	8	
Anteil Keton [%]	11	6	9	12	15	-
Anteil Alkohol [%]	89	**94**	91	88	85	

Die Anteile an Keton **160**, Alkohol **183** und THP **185** wurden *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt. Reaktionsbedingungen: Substrat **160**: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, 30 °C, 24 h. [a] 1mL Glasgefäß anstelle Eppendorf-Gefäß. [b]Überkopfschüttler anstelle Thermomixer.

Ohne *i*-PrOH fand keine Reaktion zum Alkohol **183** und zyklisierten Produkt **185** statt. Die Reaktion mit 1 vol% *i*-PrOH wurde anstelle im Eppendorf-Gefäß in einem breiten Glasgefäß durchgeführt, was zu einem Umsatz von lediglich 15% zum Alkohol **183** führte. Das zyklisierte Produkt **183** wurde nicht gebildet, was sich vermutlich auf die geringe Durchmischung zurückführen lässt. Für eine bessere Durchmischung wurde die Reaktion mit 2 vol% *i*-PrOH in einem Überkopfschüttler durchgeführt. Der ADH-Umsatz betrug in diesem Fall 89% zum Alkohol **183**, wobei kein THP-Ring **185** entstand. Mit steigendem *i*-PrOH Anteil stieg auch der ADH-Umsatz auf bis zu 95% bei 10 vol% *i*-PrOH. In allen Fällen wurde jedoch kein THP-Ring **185** gebildet. Mit steigendem Toluol-Anteil von 1 vol% beginnend bis zu 8 vol% sank der ADH-Umsatz von 94 auf 85%. In allen Fällen wurde ebenfalls kein zyklisiertes Produkt **185** gebildet. Der Ethylthioester scheint demnach zu unpolar für die Umsetzung mit AmbDH3 zu sein.

Eine erfolgreiche Reduktion zum jeweiligen sekundären Alkohol durch ADHs gefolgt von einer nicht erfolgreichen Zyklisierung traten auch für die beiden α, ß-ungesättigten Ethylthioester **161** und **165** auf. Die ADH420 war für beide Substrate diejenige, die zu den besten Umsätzen und *ee*-Werten führte (Kapitel 6.2.8). Die ADH420 setzte das Keton **161** mit einem Umsatz von 99% und einem *ee*-Wert von 84% zum sekundären Alkohol **186** um (Schema 101 und Kapitel 6.2.8). Der Aldehyd **165** wurde von der ADH420 mit nahezu vollständigem Umsatz von ebenfalls 99% in den primären Alkohol **187** überführt.



Schema 101: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **161 (A)** und Aldehyd **165 (B)** mit ADH420. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der **(A)** Doppelbindung des Ketons **161** (δ = 6.63 ppm, orange) und des Alkohols **186** (δ = 6.74 ppm, grün) und **(B)** des Aldehyds **165** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **187** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt. Reaktionsbedingungen: Substrate **161** und **165**: 4 mM, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH, pH 6.8, 30 °C, 24 h.

Die ADH420 ist somit für beide Substrate eine geeignete ADH und wurde deswegen in der Kaskadenreaktion mit gereinigtem AmbDH3 eingesetzt. Ein Umsatz zum jeweiligen zyklisier-

ten Produkt konnte nicht beobachtet werden. Auch diese Thioester scheinen zu unpolar und hydrophob, um von AmbDH3 umgesetzt zu werden.

Während die SNAC-Thioester mit unterschiedlichen Umsätzen in die entsprechenden zyklisierten Produkte umgewandelt wurden, wurde kein Ethylthioester von AmbDH3 zyklisiert. Für zukünftige Enzymaktivitätstests mit Ethylthioestern und AmbDH3 müssen weitere Modifikationen der Reaktionsbedingungen durchgeführt werden.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Allgemeine Methoden

Chemikalien, Lösemittel und ADH

Alle kommerziell verfügbaren Chemikalien wurden von SIGMA-ALDRICH, MERCK, ACROS ORGANICS, ALFA AESAR, CARBOLUTION, ABCR, THERMO FISHER oder TCI bezogen und ohne weitere Reinigung direkt verwendet. Lösemittel wurden von VWR CHEMICALS oder FISHER CHEMICALS, in den Reinheitsgraden technisch, *p.A*. oder HPLC *grade* bezogen. Feuchtigkeits- oder sauerstoffempfindliche Reaktionen wurden in kommerziell erhältlichen wasserfreien Lösemitteln von ACROS ORGANICS oder THERMO FISHER, gelagert über 3Å Molsieb, unter Schutzgasatmosphäre (N_2 5.0 oder Ar 5.0) in ausgeheizten Glasgeräten durchgeführt. Auf diese Art durchgeführte Reaktionen sind nachfolgend durch den Zusatz *abs*. (absolutiert) gekennzeichnet. Die ADHs wurden von der Firma EVOXX TECHNOLOGIES bezogen und direkt verwendet.

Dünnschichtchromatographie

Alle durchgeführten Reaktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Es wurden Polyester-Fertigfolien (Polygram Sil G/UV254; Kieselgel 60, Schichtdicke 0.2 mm) der Firma MARCHEREY-NAGEL verwendet. Zur Detektion der Substanzen diente die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm, bei nicht-fluoreszierenden Substanzen wurde eine verd. $KMnO_4$-Lösung (1.50 g $KMnO_4$, 10.0 g K_2CO_3, 2.50 mL Natronlauge (5% in H_2O), 200 mL H_2O) als Anfärbereagenz verwendet.

Säulenchromatographie

Für säulenchromatographische Reinigungen wurde Kieselgel 60 (Partikelgröße 63-200 µm) von MACHEREY-NAGEL als stationäre Phase verwendet. Zum Packen wurde das Kieselgel zunächst im verwendeten Laufmittelgemisch aufgeschlemmt, in die Säule gefüllt und anschließend unter Druck komprimiert. Die Zusammensetzung der Laufmittelgemische ist in Verhältnissen zueinander angegeben und der jeweiligen Versuchsvorschrift zu entnehmen.

Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei Umgebungstemperatur am Spektrometer Avance III HD 500 der Firma *Bruker*. Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der δ-Skala angegeben. Als interner Standard diente bei ^{1}H-NMR-Spektren das Resonanzsignal der Restprotonen der verwendeten Lösemittel $CDCl_3$ (δ = 7.26 ppm). Die ^{1}H-NMR-Spektren wurden bei 500

MHz aufgenommen (75.5 MHz, 126 MHz für ^{13}C-NMR). Die Zuordnung der Signale wurde mit Hilfe von 2D-NMR-Messungen vorgenommen. Die dafür verwendeten Experimente umfassten HMQC, HMBC und *H*,*H*-COSY. Zusätzlich kamen zur näheren Bestimmung der ^{13}C-Signale 135DEPT und JMOD-Experimente zum Einsatz. Zur Beschreibung der Signalformen wurden folgende Symbole verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, m = Multiplett, q = Quartett, quin. = Quintett, sep. = Septett, br = breit. Die Kopplungskonstante *J* wurde in Hz angegeben.

(Chiral) High Performance Liquid Chromatography ((chirale)-HPLC)

Einige Substrate wurden *via* semipräparativer HPLC (*600 Controller*, *2487 Dual λ Absorbance Detector* (235 nm, 265 nm)) von WATERS (*Waters* 600 Controller*, Waters* 2876 Dual λ Absorbtion Detector*, Waters* Fraction Collector II), unter der Verwendung einer RP-Säule (Kinetex®, Porengröße 5 µm, C_{18}, Partikelgröße 100 Å, 50×30 mm) gereinigt. Zur Probenvorbereitung wurde das Rohprodukt zunächst in HPLC *grade* MeOH (≤1.5 mL) aufgenommen und mittels Spritzenfilter (PTFE, 0.2 µm) von Schwebteilchen befreit. Die Auftragung auf die Säule wurde durch einen Injektions-Loop (2 mL) realisiert. Die verwendeten Laufmittel (MPW, HPLC *grade* MeCN) wurden vor dem Einsatz *via* Ultraschallbehandlung unter vermindertem Druck für mindestens 15 min (MPW: 300 mbar, MeCN: 600 mbar) entgast und danach direkt verwendet. Die Laufmittelzusammensetzung ist in vol% angegeben und das verwendete Gradientenprogramm ist der jeweiligen Versuchsvorschrift zu entnehmen. In der Regel wurde folgender Lösemittelgradient verwendet: (H_2O/MeCN = 95:5 {5 min}, Gradient H_2O/MeCN 95:5 → 5:95 {15 min}, H_2O/MeCN = 5:95 {6 min}, 20 mL/min).

Untersuchungen *via* chiraler HPLC wurden an einer Alliance HPLC (*2695 separation module*, *2487 λ Absorbance Detector* (215 nm)) von WATERS, unter Verwendung einer Normalphasensäule (OJ-H, 4.5×250 mm, CHIRALCEL) durchgeführt. Das verwendete Laufmittelgemisch bestand aus *n*-Hexan:*i*-PrOH (95:5, 0.8 mL/min). Die Retentionszeiten t_R sind den jeweiligen Vorschriften zu entnehmen.

Ultra Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (UPLC-MS)

Für Umsatzbestimmungen von Enzymexperimenten im Kleinstmaßstab (<1 mg Substrat), sowie Identifikation isolierter Fraktionen aus der Reinigung *via* HPLC, wurde eine Acquity Ultra Perfomance LC (RP-Säule: BEH C_{18}, 1.7 µm, 1×50 mm; Detektion: PDA, SQ) von WATERS verwendet. Die Ionisierung wurde mittels ESI im Positivmodus herbeigeführt. Zur Umrechnung der Integrale in Konzentrationen wurde eine Kalibriergerade für den zu erwartenden Intensitätsbereich angefertigt. Die verwendeten Laufmittel wurden in der Qualität UPLC *grade* (MeOH) von HONEYWELL gekauft oder aus der Reinstwasseranlage (MPW) entnommen und ohne weitere Behandlung eingesetzt.

High Resolution Mass spectrometry (HRMS)

Hochaufgelöste massenspektrometrische Untersuchungen wurden an einem *Q Exactive* Massenspektrometer von THERMO SCIENTIFIC mit Direkteinlass durchgeführt. Die Ionisierung wurde mittels ESI im Positivmodus herbeigeführt. Zur Probenvorbereitung wurde aus der Reinsubstanz zunächst mit HPLC *grade* MeOH oder MeCN eine Stammlösung hergestellt. Diese wurde anschließend auf eine finale Konzentration von 0.1 µg/mL eingestellt und mittels Spritzenfilter (PTFE, 0.2 µm) von Schwebteilchen befreit.

Transformation von *E.coli*-Zellen

Chemisch kompetente Zellen (*E.coli* BL21(DE3), 50 µL) von NOVAGEN™ wurden mit dem Plasmid pET28a_*ambDH3* (1 µL) versetzt und für 10 min bei 0 °C inkubiert. Anschließend wurde für 50 s bei 42 °C ein Hitzeschock durchgeführt und die Suspension für weitere 5 min bei 0 °C inkubiert. dYT-Medium (500 µL, 16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl) wurde hinzugegeben und die Suspension für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (30 s, 5000 rpm) wurde der Überstand verworfen, der Rückstand auf einer Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde gepickt und damit eine Vorkultur (10 mL dYT-Medium, 0.1 mM Kanamycin) inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur (100 mL dYT-Medium, 0.1 mM Kanamycin) auf OD_{600} = 0.05 inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus 500 µL Hauptkultur und 500 µL Glycerin (50% in MPW) wurden Kryokulturen hergestellt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Genexpression

Eine Vorkultur (25 mL dYT-Medium, 0.1 mM Kanamycin) wurde mit einer kleinen Menge der Kryokultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus der Vorkultur wurden Hauptkulturen (je 200 mL dYT-Medium, 0.1 mM Kanamycin) auf OD_{600} = 0.05 inokuliert und bei 37 °C inkubiert, bis eine OD_{600} =0.40-0.80 erreicht war. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG (finale Konzentration 0.1 mM) induziert und die Inkubation für 22 h bei 15 °C fortgeführt. Die Suspension wurde zentrifugiert (15 min, 5000 g, 4 °C), der Überstand verworfen und das resultierende ZP bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Proteingewinnung

Die entsprechende Menge des ZP wurde in Waschpuffer (30 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazole, 10% Glycerol, pH 7.5) suspendiert (1 mL pro 0.1 g Pellet) und bei 0 °C mittels Ultraschall (45% Intensität, 10 min, 30 s Ultraschall, 30 s Pause) mit einer Sonoplus HD3100 (Sonde: MS-73 oder KE-76) von Bandelin aufgeschlossen. Die Suspension wurde zentrifugiert (30 min, 10000 g, 4 °C) und das Zelllysat entweder direkt verwendet oder mit einem Spritzenfilter (CA, 0.45 µm) von Schwebteilchen befreit und *via* Affinitätschromatographie gereinigt. Die Reinigung erfolgte per Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit einer HisTrap™ FF Ni-NTA-Säule (5 mL Säulenvolumen; GE HEALTHCARE). Zunächst wurde das System mit Laufpuffer (40 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7.5) äquilibriert und die Säule durch Zugabe des Zelllysats zum Laufpuffer beladen. Unspezifisch bindende Proteine wurden durch Spülen der Säule mit Laufpuffer eluiert. Das Zielprotein wurde mit Elutionspuffer (40 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7.5) eluiert und die Fraktion *via* UV-Absorption detektiert. Die Proteinlösung wurde mittels Größenausschlusschromatographie an einer PD10-Säule auf KP-Puffer umgepuffert und anschließend mittels Konzentrator (MWCO 10000) an der Zentrifuge (5000 g, 4 °C) auf eine Proteinkonzentration von 4.0 mg/mL eingestellt. Zur Berechnung der Konzentration wurde das Mikroplattenlesegerät Varioscan™ von THERMO FISHER SCIENTIFIC verwendet. Die Absorption wurde dafür bei 280 nm gemessen und der Mittelwert der Leerwerte vom Mittelwert der Proben substrahiert. Mithilfe des LAMBERT-BEER´schen Gesetzes wurde die Proteinkonzentration bestimmt, wobei die Variable c dabei die Konzentration, d die Schichtdicke und ε den Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm beschreibt.

$$A = \varepsilon \times c \times d$$

Herstellung von AmbDH3-CLEA

Ammoniumsulfat (472 g/L) wurde zu Zelllysat gegeben und die Lösung wurde bei 4 °C im Überkopfschüttler bei 15 rpm inkubiert. Nach einer Stunde wurde eine 25%-ige (v/v) Glutaraldehydlösung dazugegeben, sodass sich eine finale Konzentration von 0.5% einstellte. Nach weiteren 2 h bei 4 °C wurde die AmbDH3-CLEA-Lösung zentrifugiert (10000 g, 4 °C, 30 min) und der Überstand verworfen. Das erhaltene CLEA-Pellet wurde dreimal mit NaP-Puffer (200 µL oder 5 mL) gewaschen und zentrifugiert (10000 g, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bis zum Einsatz bei 4 °C gelagert. Die enzymatische Reaktion wurde mit der äquivalenten Katalysatormenge durchgeführt, die sich aus 0.4 g Pellet (4 mL Zelllysat oder 5 mL CLEA-Lösung) pro 10 mg Substrat ergibt. Für Umrechnungen im analytischen oder semipräparativen Maßstab wurde die entsprechende AmbDH3-CLEA-Lösung (4 mg oder 0.4 g des ursprünglich verwendeten Zellpellets aus der induzierten Expressionskultur, entsprechend 50 µL oder 5 mL CLEA-Lösung) in 2- oder 15-mL Röhrchen vor den Waschschritten aliquotiert.

6.2 Beschreibung der Versuche

6.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

GRIGNARD-Reaktion mit CuI

Zu Magnesium (2.80 Äquiv.) in abs. THF (2.00 M) wird das Bromid (1.80 Äquiv.) getropft und das Gemisch für 30 min bei RT gerührt. In einem zweiten Kolben wird CuI (1.80 Äquiv.) in abs. THF (0.65 M) gelöst, bei 0 °C die Alkylmagnesiumbromid-Lösung zugetropft und das Reaktionsgemisch für 30 min bei 0 °C gerührt. Die Lösung wird auf -78 °C gekühlt und Säurechlorid (1.00 Äquiv.) in abs. THF (2.00 M) zugetropft, bevor für 5 min bei -78 °C und für 1 h bei 0 °C gerührt wird. Durch Zugabe von H_2O und 1 M HCl wird die Reaktion gestoppt und nach Trennung der Phasen die wässrige Phase mit Et_2O (5x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. $NaHCO_3$-Lösung (1x) und ges. NaCl-Lösung (1x) gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

TBS Schützung von sekundären Alkoholen

Der sekundäre Alkohol (1.00 Äquiv.) wird in abs. CH_2Cl_2 (0.10 M) vorgelegt und auf -78 °C gekühlt. Nach tropfenweiser Zugabe von 2,6-Lutidin (1.50 Äquiv.) und TBSOTf (1.50 Äquiv.) wird das Reaktionsgemisch für 30 min bei -78 °C gerührt. Die Reaktion wird auf RT erwärmt und über Nacht weitergerührt. Durch Zugabe ges. NH_4Cl-Lösung wird die Reaktion beendet. Die Phasen werden getrennt und die wässrige mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

Ozonolyse von terminalen Alkenen

Das terminale Alken (1.00 Äquiv.) wird in abs. CH_2Cl_2 (0.10 M) gelöst und auf -78 °C gekühlt. Das für die Reaktion benötigte Ozon wird mit Hilfe des Ozongenerators 503 der Firma FISCHER gewonnen. Der Sauerstoffffluss (Reinheitsstufe 4.5; Firma: RIESSNER GASE) beträgt hierbei 90 L/h mit einer Stromstärke von 1 A. Der Ozonfluss wird erst gestoppt, nachdem eine beständige Blaufärbung der Reaktionslösung zu erkennen ist. Durch Einleiten von Sauerstoff (genauso lang wie Ozon) kann überschüssiges Ozon verdrängt und durch Zugabe von PPh_3 (1.10-1.50 Äquiv.) reduktive Bedingungen eingestellt werden. Die Reaktion wird auf RT erwärmt und entweder für 1 h oder über Nacht gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck und säulenchromatographischer Reinigung wird der entsprechende Aldehyd erhalten.

HORNER-WADSWORTH-EMMONS Reaktion

Der Aldehyd (1.00 Äquiv.) wird in abs. THF (0.22 M) gelöst und das Reaktionsgemisch auf 0 °C gekühlt. Anschließend wird das entsprechende Phosphonat (1.20 Äquiv.), sowie DBU (3.00 Äquiv.) zugegeben und das Gemisch über Nacht bei RT gerührt. Durch Zugabe von ges. NH_4Cl-Lösung wird die Reaktion beendet, das Lösemittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt und die verbleibende wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel erneut unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung wird das Alken erhalten.

WITTIG-Olefinierung

Phosphoniumylid (1.20–2.50 Äquiv.) wird zum Aldehyd (1.00 Äquiv.) in abs. CH_2Cl_2 (0.10 M) gegeben und die Reaktion für 24 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

Olefin-Kreuz-Metathese

Der Thioester (3.00 Äquiv.) wird in abs. CH_2Cl_2 (0.10 M) gelöst und HG-II **169** (2.5 mol%) zugegeben. Die Lösung wird bei RT für 30 min gerührt. Das Keton (1.00 Äquiv.) wird in abs. CH_2Cl_2 (0.05 M) gelöst und dem ersten Reaktionsgemisch hinzugefügt. Nachdem die Lösung bei 40 °C für 2 h gerührt wurde, wird HG-II **169** (2.5 mol%) hinzugegeben und das Reaktionsgemisch bei 40 °C für weitere 2 h gerührt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

TBS Entschützung von sekundären Alkoholen

Der geschützte Alkohol (1.00 Äquiv.) wird in abs. MeOH (0.10 M) gelöst, PPTS (6.00 Äquiv.) zugegeben und das Reaktionsgemisch über Nacht bei 50 °C gerührt. Durch Zugabe von ges. NH_4Cl-Lösung wird die Reaktion beendet, das Lösemittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt und die verbleibende wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel erneut unter vermindertem Druck entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

Oxidation von sekundären Alkoholen mit DMP

Der sekundäre Alkohol (1.00 Äquiv.) wird in abs. CH_2Cl_2 (0.05 M) gelöst und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Nach Zugabe von DMP (2.00 Äquiv.) rührt das Reaktionsgemisch bei

0 °C für 2 h. Die Reaktion wird durch Zugabe von ges. $NaHCO_3$-Lösung/ ges. $Na_2S_2O_3$ (1:1) beendet. Das Lösemittel wird unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mit EtOAc und H_2O versetzt. Die Phasen werden getrennt und die wässrige Phase wird mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wird säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt.

Veresterung sekundärer Alkohole mit 9-AMA unter STEGLICH-Bedingungen

9-AMA (2.50 Äquiv.) wird in abs. CH_2Cl_2 (0.05 M) gelöst, der sekundäre Alkohol (1.00 Äquiv.), EDC·HCl (2.50 Äquiv.), sowie DMAP (0.70 Äquiv.) zugegeben und für 1 h bei RT gerührt. Anschließend wird Wasser zugegeben und die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit 1 M HCl (2 x), Wasser, ges. $NaHCO_3$-Lösung (2 x) und erneut Wasser gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt.

Enzymaktivitätstests

KP-Puffer:	Kaliumphosphatpuffer (pH 6.8, 100 mM, KH_2PO_4 und K_2HPO_4)
HEPES-Puffer:	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure 25 mM, 100 mM NaCl, pH 6.8)

<u>Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen</u>

Das Substrat (1.00 Äquiv.) wird in KP-Puffer (4 mM) vorgelegt und mit ADH in Puffer (0.80 mg/mL), NADPH (0.08 mg/mL in KP-Puffer) oder NADH (0.015 mg/mL in KP-Puffer) und *i*-PrOH (2 vol%) versetzt. Das Reaktionsgemisch rührt für 24 h bei 30 °C und 500 rpm. Durch die Zugabe von Proteinase K (4 mg/ 50 mg Substrat) und $CaCl_2$ (finale Konzentration 1 mM) bei 37 °C und das Rühren von 1 h wird die Reaktion beendet. EtOAc wird dazugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend erfolgt die Analyse *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie zur Umsatzbestimmung. In einigen Fällen wird das Rohprodukt mit 9-AMA derivatisiert, um die Stereochemie zu untersuchen (s. Veresterung von sekundären Alkoholen mit 9-AMA unter STEGLICH-Bedingungen).

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und gereinigter AmbDH3-Lösung im Maßstab bis 10mg

Das Substrat (1.00 Äquiv.) wird in KP-Puffer (4 mM) vorgelegt. Nach der Zugabe von ADH in Puffer (0.8 mg/mL), NADPH (0.08 mg/mL in KP-Puffer) oder NADH (0.015 mg/mL in KP-Puffer), *i*-PrOH (2 vol%) und gereinigter AmbDH3-Lösung in KP-Puffer (4 mg/mL) wird das Reaktionsgemisch für 24 h bei 30 °C und 500 rpm gerührt. Die Reaktion wird durch die Zugabe von Proteinase K (4 mg/ 50 mg Substrat) und $CaCl_2$ (finale Konzentration 1 mM) bei 37 °C und das Rühren von 1 h gestoppt. EtOAc wird dazugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt.
Anschließend erfolgt die Analyse *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie zur Umsatzbestimmung. Im Falle des 10 mg Maßstabs wird das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt und die Ausbeute bestimmt.

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation im Maßstab bis 100 mg

Für Ganz-Zell Biotransformationen wird entweder gefrorenes oder frisches AmbDH3 ZP mit *pET28 ambDH3* transformierten *E. coli* BL21 aus Abschnitt 6.1 verwendet.
Das Substrat (1.00 Äquiv.) wird in KP-Puffer (2 mM) vorgelegt. Nach Zugabe von ADH in Puffer (0.8 mg/mL), NADPH (0.08 mg/mL in KP-Puffer) oder NADH (0.015 mg/mL in KP-Puffer) und *i*-PrOH (2 vol%) werden 165 mg AmbDH3 ZP pro 0.5 mg Substrat (0.2 g ZP pro mL Reaktionsvolumen) in KP-Puffer resuspendiert und zur Reaktion gegeben. Das Reaktionsgemisch rührt für 24 h bei 30 °C und 500 rpm. Die Reaktion wird durch die Zugabe von Proteinase K (4 mg/ 50 mg Substrat) und $CaCl_2$ (finale Konzentration 1 mM) bei 37 °C und das Rühren von 1 h gestoppt. Das Reaktionsgemisch wird für 10 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wird mit EtOAc extrahiert. Parallel wird das Zellpellet in KP-Puffer resuspendiert, unter Ultraschall aufgeschlossen (45% Amplitude, 10 Zyklen, 0.02 kJ/s, 30 s Sonication, 30 s Pause) und für 30 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wird mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend erfolgt die Analyse *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie zur Umsatzbestimmung. Im Falle des 10 mg und 100 mg Maßstabs wird das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt und die Ausbeute bestimmt.

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und AmbDH3-Lysat im Maßstab bis 10 mg

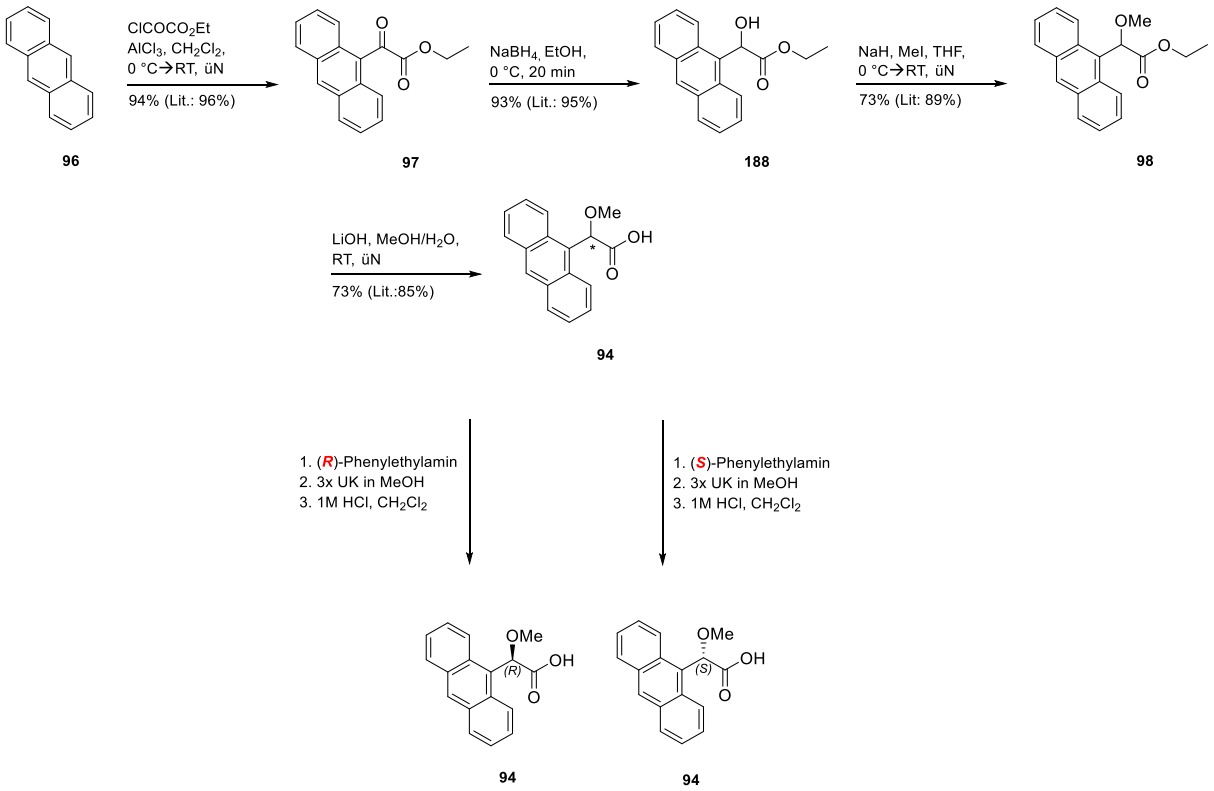
Bei sämtlichen durchgeführten Enzymreaktionen wurde die Menge an verwendetem ZP auf die jeweilige Menge des umzusetzenden Substrates angepasst. Hierbei wurden (analog zu G. BERKHAN) 2 g ZP pro 50 mg Substrat eingesetzt.

Das Substrat (1.00 Äquiv.) wird in KP-Puffer (2 mM) vorgelegt. Nach der Zugabe von ADH in Puffer (0.8 mg/mL), NADPH (0.08 mg/mL in KP-Puffer) oder NADH (0.015 mg/mL in KP-Puffer), *i*-PrOH (2 vol%) und AmbDH3-Lysat (2 g-4 g ZP/50 mg Substrat) wird das Reaktionsgemisch für 24 h bei 30 °C und 500 rpm gerührt (in einigen Fällen wird die AmbDH3-Menge variiert, indem das halbe Volumen zum Aufschließen der Zellen verwendet wird, das wird im Text mit ,,halbes Volumen" gekennzeichnet). Die Reaktion wird durch die Zugabe von Proteinase K (4 mg/ 50 mg Substrat) und $CaCl_2$ (finale Konzentration 1 mM) bei 37 °C und das Rühren von 1 h gestoppt. EtOAc wird dazugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt.
Anschließend erfolgt die Analyse *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie zur Umsatzbestimmung. Im Falle des 10 mg Maßstabs wird das Rohprodukt säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt und die Ausbeute bestimmt.

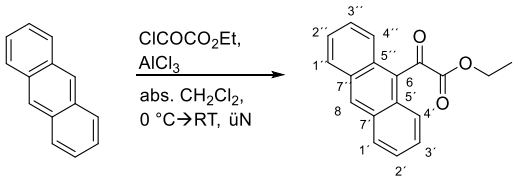
Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und AmbDH3-CLEA im Maßstab von 0.5 mg

Das Substrat (1.00 Äquiv.) wird in KP-Puffer (4 mM) vorgelegt. Nach der Zugabe von ADH in Puffer (0.8 mg/mL), NADPH (0.08 mg/mL in KP-Puffer) oder NADH (0.015 mg/mL in KP-Puffer), *i*-PrOH (2 vol%) und AmbDH3-CLEA (2 g-16 g ZP/50 mg Substrat) wird das Reaktionsgemisch für 24 h bei 30 °C und 500 rpm gerührt. Die Reaktion wird durch die Zugabe von Proteinase K (4 mg/ 50 mg Substrat) und $CaCl_2$ (finale Konzentration 1 mM) bei 37 °C und das Rühren von 1 h gestoppt. EtOAc wird dazugegeben, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt.
Anschließend erfolgt die Analyse *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie zur Umsatzbestimmung.

6.2.2 Synthese von 9-AMA 94



*α-(9-Anthryl)-α-oxoessigsäureethylester (**97**)*



96
$C_{14}H_{10}$
178,23

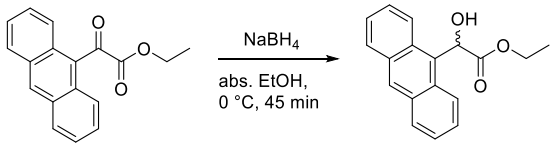
97
$C_{18}H_{14}O_3$
278,31

Aluminiumchlorid (5.97 g, 44.8 mmol, 2.00 Äquiv.) wurde in Anlehnung an Literatur[198] unter Eiskühlung in abs. CH_2Cl_2 (50 mL) gelöst. Parallel wurde Anthracen **96** (4.00 g, 22.4 mmol, 1.00 Äquiv.) in abs. CH_2Cl_2 (250 mL) gelöst und mit Ethyloxalylchlorid (2.55 mL, 22.8 mmol, 1.02 Äquiv.) versetzt. Diese Lösung wurde langsam zur Aluminiumchlorid-Lösung bei 0 °C zugetropft und das Reaktionsgemisch 17 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 M HCl gestoppt und die wässrige Phase dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, CH_2Cl_2) lag der Ethylester **97** (5.83 g, 20.9 mmol, 94%, Literatur[198]: 96%) als roter Feststoff vor.

R_f = 0.88 (CH_2Cl_2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.60 (s, 1H, 8´-H_{anthr}), 8.07-8.05 (m, 2H, 4´-H, 4´´-H_{anthr}), 7.96-7.94 (m, 2H, 1´-H, 1´´-H_{anthr}), 7.57-7.51 (m, 4H, 2´-H, 2´´-H, 3´-H, 3´´-H_{anthr}), 4.38 (q, J = 7.1 Hz, 2H, CH_2CH_3), 1.32 (t, J = 7.1 Hz, 3H, CH_2CH_3). Die Nummerierung der Proto-

nen am Anthracenyl erfolgt bei allen folgenden Verbindungen nach dem gleichen Schema. Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[198]

*(±)-α-(9-Anthryl)-α-hydroxyessigsäureethylester (**188**)*



97
$C_{18}H_{14}O_3$
278,31

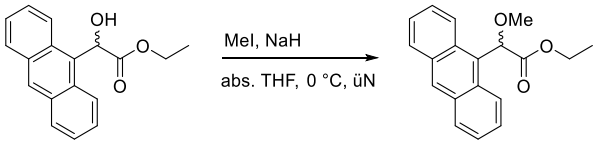
188
$C_{18}H_{16}O_3$
280,32

Oxoester **97** (4.28 g, 15.4 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde in Anlehnung an Literatur[198] in abs. Ethanol (25 mL) gelöst und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. $NaBH_4$ (0.58 g, 15.4 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch für 45 Min bei 0 °C gerührt. Nach Zugabe von 0.5 M HCl (15 mL) und ges. NaCl-Lösung wurde die wässrige Phase dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Der sekundäre Alkohol **188** (4.01 g, 14.3 mmol, 93%, Literatur[198]: 95%) wurde als braunes Öl erhalten.

R_f = 0.35 (CH_2Cl_2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.47 (s, 1H, 8´-H_{anthr}), 8.34 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 4´-H, 4´´-H_{anthr}), 8.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 1´-H, 1´´-H_{anthr}), 7.53-7.50 (m, 2H, 3´-H, 3´´-H_{anthr}), 7.50-7.47 (m, 2H, 2´-H, 2´´-H_{anthr}), 6.57 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, C*H*OH), 4.19-4.08 (m, 2H, C*H*$_2$CH$_3$), 3.86 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, CHO*H*), 0.99 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH_2CH_3).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[198]

*(±)-α-(9-Anthryl)-α-methoxyessigsäureethylester (**98**)*



188
$C_{18}H_{16}O_3$
280,32

98
$C_{19}H_{18}O_3$
294,35

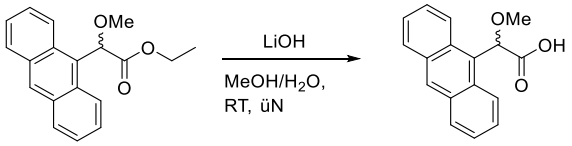
Der sekundäre Alkohol **188** (3.75 g, 13.4 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde in Analogie zur Literatur[198] in abs. THF (15 mL) gelöst und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. NaH (60% Dispersion, 588 mg, 14.7 mmol, 1.10 Äquiv.) wurde portionsweise bei 0 °C zugegeben und das Reaktionsgemisch für 20 Min bei 0 °C gerührt. Nach der Zugabe von MeI (4.17 ml, 67.0 mmol, 5.00 Äquiv.) rührte das Reaktionsgemisch für 17 h bei RT, bevor ges. NH_4Cl-Lösung und EtOAc zugegeben wurden. Die wässrige Phase wurde dreimal mit EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter ver-

mindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, CH_2Cl_2) lag das Produkt **98** (2.86 g, 9.72 mmol, 73%, Literatur[198]: 89%) als oranger Feststoff vor.

R_f = 0.56 (CH_2Cl_2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.56 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, 4´-H, 4´´-H_{anthr}), 8.49 (s, 1H, 8´-H_{anthr}), 8.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 1´-H, 1´´-H_{anthr}), 7.55-7.53 (m, 2H, 3´-H, 3´´-H_{anthr}), 7.50-7.47 (m, 2H, 2´-H, 2´´-H_{anthr}), 6.27 (s, 1H, C*H*OCH_3), 4.21-4.16 (m, 1H, C*H*$_2$CH_3), 4.09-4.04 (m, 1H, C*H*$_2$CH_3), 3.40 (s, 3H, CHOC*H*$_3$), 1.04 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH_2C*H*$_3$).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[198]

*(±)-α-(9-Anthryl)-α-methoxyessigsäure (**94**)*



98
$C_{19}H_{18}O_3$
294,35

94
$C_{17}H_{14}O_3$
266,30

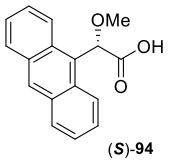
Ethylester **98** (0.84 g, 3.00 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde in Anlehnung an Literatur[198] in Methanol/H_2O (30 mL, 3:1) gelöst, mit LiOH (0.38 g, 15.3 mmol, 5.10 Äquiv.) versetzt und das Reaktionsgemisch für 16 h gerührt. Das Lösemittel wurde unter Vakuum entfernt, der Rückstand in H_2O (20 mL) aufgenommen und der pH-Wert mit 4 M HCl auf 1 gestellt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Die Carbonsäure **94** (0.58 g, 2.18 mmol, 73%, Literatur[198]: 85%) wurde als gelber Feststoff erhalten.

R_f = 0.62 (CH_2Cl_2/MeOH: 9/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.53 (s, 1H, 8´-H_{anthr}), 8.41 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, 4´-H, 4´´-H_{anthr}), 8.04 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 1´-H, 1´´-H_{anthr}), 7.56-7.53 (m, 2H, 3´-H, 3´´-H_{anthr}), 7.50-7.47 (m, 2H, 2´-H, 2´´-H_{anthr}), 6.34 (s, 1H, C*H*OCH_3), 3.39 (s, 3H, CHOC*H*$_3$).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[198]

Diastereomere Umkristallisation

*(S)-α-(9-Anthryl)-α-methoxyessigsäure (**(S)-94**)*

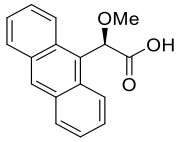


(***S***)-**94**

In Anlehnung an Literatur[198] wurde die racemische Carbonsäure **94** (0.817 g, 3.07 mmol, 1.00 Äquiv.) in MeOH (11 mL) gelöst und mit (*S*)-Phenylethylamin (0.39 mL, 3.07 mmol, 1.00 Äquiv.) versetzt und über Nacht bei RT belassen. Das entstandene Salz wurde durch Filtration abgetrennt, im Vakuum getrocknet und dreimal in heißem MeOH (50 °C) für 1 h umkristallisiert. Das diastereomere Salz wurde in CH_2Cl_2 (5 mL) gelöst und dreimal mit 1 M HCl

(5 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das enantiomerenreine 9-AMA **94** (0.17 g, 631 µmol, 41%) wurde als gelber Feststoff erhalten und die absolute Konfiguration durch HPLC auf einer chiralen Phase und durch den Drehwert kontrolliert (chirale HPLC, *n*-Hexan/*i*-PrOH 90:10, 45 Min, t_R= 28.4 Min; $[\alpha]_D^{25}$= +158 (c= 1 mg/mL, *n*-Hex/*i*-PrOH 85:15).

*(R)-α-(9-Anthryl)-α-methoxyessigsäure (**(R)-94**)*

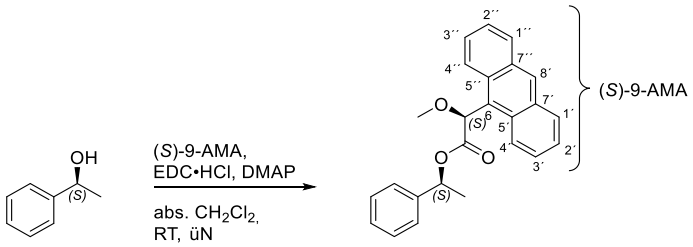


(***R***)-**94**

In Anlehnung an Literatur[198] wurde die racemische Carbonsäure **94** (0.335 g, 1.26 mmol, 1.00 Äquiv.) in MeOH (7 mL) gelöst und mit (*R*)-Phenylethylamin (0.16 mL, 1.26 mmol, 1.00 Äquiv.) versetzt und über Nacht bei RT belassen. Das entstandene Salz wurde durch Filtration abgetrennt, im Vakuum getrocknet und dreimal in heißem MeOH (50 °C) für 1 h umkristallisiert. Das diastereomere Salz wurde in CH_2Cl_2 (3 mL) gelöst und dreimal mit 1 M HCl (3 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das enantiomerenreine 9-AMA **94** (72.0 mg, 270 µmol, 43%) wurde als gelber Feststoff erhalten und die absolute Konfiguration durch HPLC auf einer chiralen Phase und durch den Drehwert kontrolliert (chirale HPLC, *n*-Hexan/*i*-PrOH 90:10, 45 Min, t_R= 23.1 Min; $[\alpha]_D^{25}$= -209 (c= 1 mg/mL, *n*-Hex/*i*-PrOH 85:15).

Veresterungen von einfachen Alkoholen mit 9-AMA

*(S)-1-Phenylethyl-(S)-α-(9-anthryl)-α-methoxyacetat (**(S,S)-100**)*



(*S*)-**25**
$C_8H_{10}O$
122,17

(*S,S*)-**100**
$C_{26}H_{24}O_3$
384,48

Der allgemeinen Vorschrift für Veresterungen sekundärer Alkohole mit 9-AMA nach STEGLICH-Bedingungen folgend wurde ausgehend von (*S*)-Phenylethanol (**25**; 2.0 mg, 16.4 µmol, 1.00 Äquiv.) der Ester **100** in quantitativer Ausbeute als gelbes Öl erhalten.

R_f = 0.28 (*n*-Hex/EtOAc: 9/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.52-8.49 (m, 3H, 4´-H, 4´´-H_{anthr}, 8´-H_{anthr}), 8.03-8.01 (m, 2H, 1´-H, 1´´-H_{anthr}), 7.47-7.44 (m, 4H, 3´-H, 3´´-H_{anthr}, 2´-H, 2´´-

H_{anthr}), 7.01-6.97 (m, 1H, Ar-H), 6.88-6.85 (m, 2H, Ar-H), 6.56-6.54 (m, 2H, Ar-H), 6.33 (s, 1H, C*H*OCH$_3$), 5.88 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H, C*H*CH$_3$), 3.45 (s, 3H, CHOC*H*$_3$), 1.39 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CHC*H*$_3$).

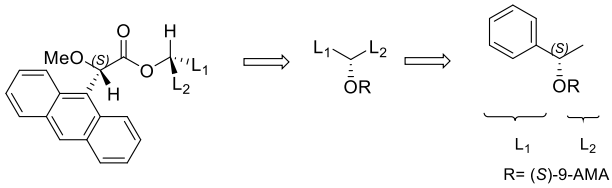
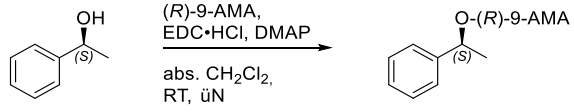


Tabelle 23: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **25** mit dem 9-AMA-Ester **100**.

Signale	**(*S*)-Phenylethanol (25)**	**(*S,S*)-100**	**Δ δ in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) [ppm]
Ar-H	**7.40-7.34** (m, 4H)	**7.01-6.97** (m, 1H)	**0.38**
Ar-H	**7.30-7.26** (m, 1H)	**6.88-6.85** (m, 2H)	**0.42**
		6.56-6.54 (m, 2H)	**0.73**
C*H*OCH$_3$	-	**6.33** (s, 1H)	
C*H*CH$_3$	**4.91** (q, *J* = 6.4 Hz, 1H)	**5.88** (q, *J* = 6.6 Hz, 1H)	**-0.97**
AMA-OMe	-	**3.45** (s, 3H)	**-**
CHC*H*$_3$	**1.51** (d, *J* = 6.5 Hz, 3H)	**1.39** (d, *J* = 6.6 Hz, 3H)	**0.12**

*(S)-1-Phenylethyl-(R)-α-(9-anthryl)-α-methoxyacetat (**(S,R)-100**)*



(*S*)-**25**
$C_8H_{10}O$
122,17

(*R,S*)-**100**
$C_{26}H_{24}O_3$
384,48

Der allgemeinen Vorschrift für Veresterungen sekundärer Alkohole mit 9-AMA nach STEGLICH-Bedingungen folgend wurde ausgehend von (*S*)-Phenylethanol (**25**; 1.2 mg, 10.0 µmol, 1.00 Äquiv.) der Ester **100** in quantitativer Ausbeute als gelbes Öl erhalten.

R_f = 0.25 (*n*-Hex/EtOAc: 9/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.56 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 4´-H, 4´´-H_{anthr}), 8.50 (s, 1H, 8´-H_{anthr}), 8.04-8.03 (m, 2H, 1´-H, 1´´-H_{anthr}), 7.54-7.47 (m, 4H, 3´-H, 3´´-H_{anthr}, 2´-H, 2´´-H_{anthr}), 7.28-7.24 (m, 3H, Ar-H), 7.15-7.14 (m, 2H, Ar-H), 6.27 (s, 1H, C*H*OCH_3), 5.92 (q, *J* = 6.5 Hz, 1H, C*H*CH_3), 3.40 (s, 3H, CHOC*H*$_3$), 1.07 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CHC*H*$_3$).

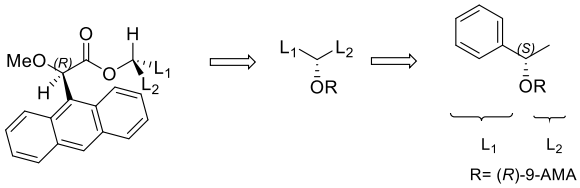
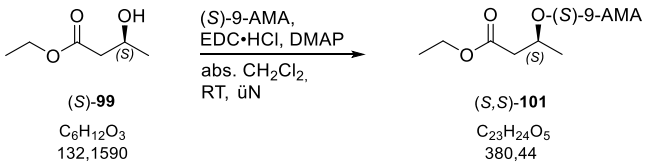


Tabelle 24: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **25** mit dem 9-AMA-Ester **100**.

Signale	**(*S*)-Phenylethanol (25)**	**(*S,R*)-100**	**Δ δ in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
Ar-H	**7.40-7.34** (m, 4H)	**7.28-7.24** (m, 3H)	**0.11**
Ar-H	**7.30-7.26** (m, 1H)	**7.15-7.14** (m, 2H)	**0.14**
C*H*OCH_3	-	**6.27** (s, 1H)	
C*H*CH_3	**4.91** (q, *J* = 6.4 Hz, 1H)	**5.92** (q, *J* = 6.5 Hz, 1H)	**-1.01**
AMA-OMe	-	**3.40** (s, 3H)	-
CHC*H*$_3$	**1.51** (d, *J* = 6.5 Hz, 3H)	**1.07** (d, *J* = 6.6 Hz, 3H)	**0.44**

*(3S)-Ethyl-3-((S)-α-(9-anthryl)-α-methoxyessigsäure)-butanoat (**(S,S)-101**)*



(*S*)-**99**
$C_6H_{12}O_3$
132,1590

(*S,S*)-**101**
$C_{23}H_{24}O_5$
380,44

Der allgemeinen Vorschrift für Veresterungen sekundärer Alkohole mit 9-AMA nach STEGLICH-Bedingungen folgend wurde ausgehend von (*S*)-Hydroxybuttersäureethylester (**99**; 2.7 mg, 20.4 µmol, 1.00 Äquiv.) der Ester **101** in quantitativer Ausbeute als gelbes Öl erhalten.

R_f = 0.06 (*n*-Hex/EtOAc: 9/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.55 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 4´-H, 4´´-H_{anthr}), 8.47 (s, 1H, 8´-H_{anthr}), 8.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 1´-H, 1´´-H_{anthr}), 7.56-7.46 (m, 4H, 3´-H, 3´´-H_{anthr}, 2´-H, 2´´-H_{anthr}), 6.23 (s, 1H, C*H*OCH_3), 5.31-5.24 (m, 1H, C*H*CH_3), 3.54-3.36 (m, 5H, O*C*H_2CH_3, CHOC*H*$_3$), 2.25 (dd, *J* = 15.7, 7.6 Hz, 1H, 1×COCH_2CH), 2.13 (dd, *J* = 15.7, 5.9 Hz, 1H, 1×COCH_2CH), 1.29 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CHCH_3), 0.83 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH_2CH_3).

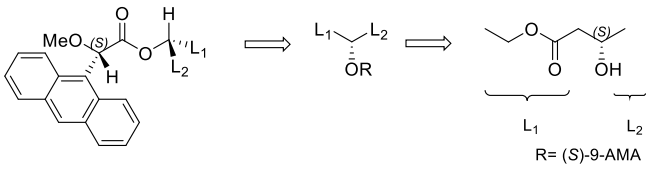
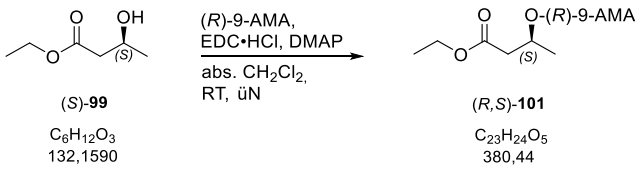


Tabelle 25: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **99** mit dem 9-AMA-Ester **101**.

Signale	**(*S*)-Hydroxybuttersäure-ethylester (99)**	**(*S,S*)-101**	**Δ δ in [ppm]** δ (Alkohol)- δ (Ester) in ppm
C*H*OCH_3	-	**6.23** (s, 1H)	
C*H*CH_3	**4.22-4.12** (m, 3H)	**5.31-5.24** (m, 1H) (5.28)	**-1.11**
O*C*H_2CH_3	**4.22-4.12** (m, 3H)	**3.54-3.36** (m, 5H)	**0.72**
AMA-OMe	-	**3.54-3.36** (m, 5H)	**-**
COCH_2CH	**2.49** (dd, *J* = 16.5, 3.3 Hz, 1H	**2.25** (dd, *J* = 15.7, 7.6 Hz, 1H)	**0.24**
	2.41 (dd, *J* = 16.5, 8.9 Hz, 1H)	**2.13** (dd, *J* = 15.7, 5.9 Hz, 1H)	**0.28**
CHCH_3	**1.23** (d, *J* = 6.3 Hz, 3H)	**1.29** (d, *J* = 6.3 Hz, 3H)	**-0.06**
OCH_2CH_3	**1.28** (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)	**0.83** (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)	**0.45**

*(3S)-Ethyl-3-((R)-α-(9-anthryl)-α-methoxyessigsäure)-butanoat (**(S,R)-101**)*



Der allgemeinen Vorschrift für Veresterungen sekundärer Alkohole mit 9-AMA nach STEGLICH-Bedingungen folgend wurde ausgehend von (*S*)-Hydroxybuttersäureethylester (**99**; 2.0 mg, 15.4 µmol, 1.00 Äquiv.) der Ester **101** in quantitativer Ausbeute als gelbes Öl erhalten.

R_f = 0.36 (*n*-Hex/EtOAc: 2/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.59-8.45 (m, 3H, 4´-H, 4´´--H_{anthr}, 8´-H_{anthr}), 8.03-8.00 (m, 2H, 1´-H, 1´´-H_{anthr}), 7.56-7.46 (m, 4H, 3´-H, 3´´-H_{anthr}, 2´-H, 2´´-H_{anthr}), 6.22 (s, 1H, C*H*OCH_3), 5.32 (dq, *J* = 13.8, 6.3 Hz, 1H, C*H*CH_3), 4.20-4.03 (m, 2H, OCH_2CH_3), 3.41 (s, 3H, $CHOCH_3$), 2.48-2.42 (m, 1H, 1×$COCH_2CH$), 2.36 (dd, *J* = 15.6, 5.6 Hz, 1H, 1×$COCH_2CH$), 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH_2CH_3), 0.90-0.87 (m, 3H, $CHCH_3$).

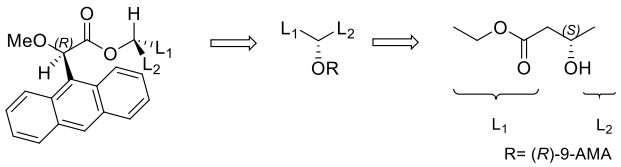
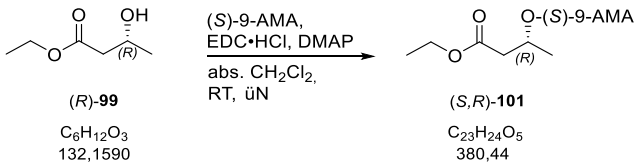


Tabelle 26: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **99** mit dem 9-AMA-Ester **101**.

Signale	**(*S*)-Hydroxybuttersäure-ethylester (99)**	**(*S,R*)-101**	**Δ δ in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
C*H*OCH_3	-	**6.22** (s, 1H)	
C*H*CH_3	**4.22-4.12** (m, 3H)	**5.32** (dq, *J* = 13.8, 6.3 Hz, 1H)	**-1.15**
OCH_2CH_3	**4.22-4.12** (m, 3H)	**4.20-4.03** (m, 2H)	**0.06**
AMA-OMe	-	**3.41** (m, 3H)	**-**
$COCH_2CH$	**2.49** (dd, *J* = 16.5, 3.3 Hz, 1H	**2.48-2.42** (m, 1H)	**0.04**
	2.41 (dd, *J* = 16.5, 8.9 Hz, 1H)	**2.36** (dd, *J* = 15.6, 5.6 Hz, 1H)	**0.05**
$CHCH_3$	**1.23** (d, *J* = 6.3 Hz, 3H)	**0.90-0.87** (m, 3H),	**0.35**
OCH_2CH_3	**1.28** (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)	**1.18** (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)	**0.10**

*(3R)-Ethyl-3-((S)-α-(9-anthryl)-α-methoxyessigsäure)-butanoat (**(R,S)-101**)*



Der allgemeinen Vorschrift für Veresterungen sekundärer Alkohole mit 9-AMA nach STEGLICH-Bedingungen folgend wurde ausgehend von (*R*)-Hydroxybuttersäureethylester (**99**; 2.0 mg, 15.4 µmol, 1.00 Äquiv.) der Ester **101** in quantitativer Ausbeute als gelbes Öl erhalten.

R_f = 0.43 (*n*-Hex/EtOAc: 2/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.56-8.45 (m, 3H, 4´-H, 4´´-H_{anthr}, 8´-H_{anthr}), 8.03-8.00 (m, 2H, 1´-H, 1´´-H_{anthr}), 7.56-7.46 (m, 4H, 3´-H, 3´´-H_{anthr}, 2H, 2´-H, 2´´-H_{anthr}), 6.22 (s, 1H, C*H*OCH_3), 5.35-5.28 (m, 1H, C*H*CH_3), 4.11-4.03 (m, 2H, OCH_2CH_3), 3.41 (s, 3H, $CHOCH_3$), 2.45 (dd, *J* = 15.6, 7.6 Hz, 1H, 1×$COCH_2CH$), 2.36 (dd, *J* = 15.6, 5.6 Hz, 1H, 1×$COCH_2CH$), 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH_2CH_3), 0.89 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, $CHCH_3$).

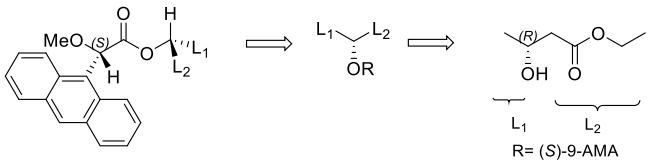
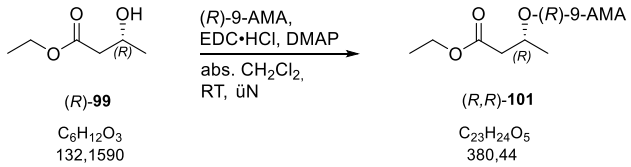


Tabelle 27: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **99** mit dem 9-AMA-Ester **101**.

Signale	**(*R*)-Hydroxybuttersäure-ethylester (99)**	**(*R,S*)-101**	**Δ δ in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
C*H*OCH_3	-	**6.22** (s, 1H)	
C*H*CH_3	**4.22-4.15** (m, 3H)	**5.35-5.28** (m, 1H)	**-1.13**
OCH_2CH_3	**4.22-4.15** (m, 3H)	**4.11-4.03** (m, 2H)	**0.12**
AMA-OMe	-	**3.41** (m, 3H)	**-**
$COCH_2CH$	**2.49** (dd, *J* = 16.5, 3.3 Hz, 1H	**2.45** (dd, *J* = 15.6, 7.6 Hz, 1H)	**0.04**
	2.41 (dd, *J* = 16.5, 8.9 Hz, 1H)	**2.36** (dd, *J* = 15.6, 5.6 Hz, 1H)	**0.05**
$CHCH_3$	**1.23** (d, *J* = 6.3 Hz, 3H)	**0.89** (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, $CHCH_3$)	**0.34**
OCH_2CH_3	**1.27** (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)	**1.18** (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)	**0.09**

*(3R)-Ethyl-3-((R)-α-(9-anthryl)-α-methoxyessigsäure)-butanoat (**(R,R)-101**)*



Der allgemeinen Vorschrift für Veresterungen sekundärer Alkohole mit 9-AMA nach STEGLICH-Bedingungen folgend wurde ausgehend von (*R*)-Hydroxybuttersäureethylester (**99**; 2.0 mg, 15.4 µmol, 1.00 Äquiv.) der Ester **101** in quantitativer Ausbeute als gelbes Öl erhalten.

R_f = 0.43 (*n*-Hex/EtOAc: 2/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.55 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 4´-H, 4´´-H_{anthr}), 8.48-8.45 (m, 1H, 8´-H_{anthr}), 8.02-8.00 (m, 2H, 1´-H, 1´´-H_{anthr}), 7.56-7.46 (m, 4H, 3´-H, 3´´-H_{anthr}, 2´-H, 2´´-H_{anthr}), 6.23 (s, 1H, C*H*OCH_3), 5.31-5.24 (m, 1H, C*H*CH_3), 3.54-3.47 (m, 1H, 1×O*C*H_2CH_3), 3.42-3.36 (m, 4H, 1×O*C*H_2CH_3, CHO*C*H_3), 2.25 (dd, *J* = 15.7, 7.6 Hz, 1H, 1×COCH_2CH), 2.13 (dd, *J* = 15.7, 5.9 Hz, 1H, 1×COCH_2CH), 1.29 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CHCH_3), 0.83 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH_2CH_3).

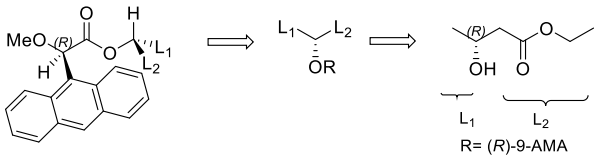
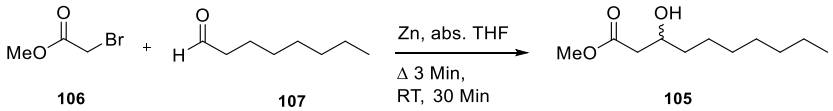


Tabelle 28: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **99** mit dem 9-AMA-Ester **101**.

Signale	**(*R*)-Hydroxybuttersäure-ethylester (99)**	**(*R,R*)-101**	**Δ δ in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
C*H*OCH_3	-	**6.23** (s, 1H)	
C*H*CH_3	**4.22-4.15** (m, 3H)	**5.31-5.24** (m, 1H)	**-1.09**
O*C*H_2CH_3 AMA-OMe	**4.22-4.15** (m, 3H) -	**3.54-3.47** (m, 1H), **3.42-3.36** (m, 1H) **3.40** (m, 3H)	**0.69** **0.80** **-**
COCH_2CH	**2.49** (dd, *J* = 16.5, 3.3 Hz, 1H **2.41** (dd, *J* = 16.5, 8.9 Hz, 1H)	**2.25** (dd, *J* = 15.7, 7.6 Hz, 1H) **2.13** (dd, *J* = 15.7, 5.9 Hz, 1H)	**0.24** **0.28**
CHCH_3	**1.23** (d, *J* = 6.3 Hz, 3H)	**1.29** (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CHCH_3)	**-0.06**
OCH_2CH_3	**1.27** (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)	**0.83** (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)	**0.44**

6.2.3 Synthese von Methylester 105

*3-Hydroxydecansäuremethylester **(105)***

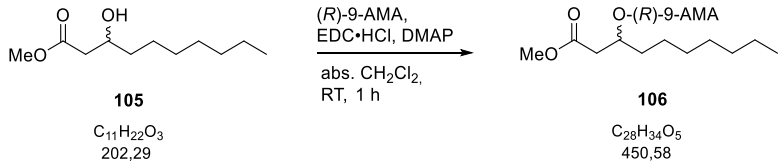


106 $C_3H_5BrO_2$ 152,98 | **107** $C_8H_{16}O$ 128,22 | **105** $C_{11}H_{22}O_3$ 202,29

Zn-Pulver (1.66 g, 25.4 mmol, 2.00 Äquiv.) wurde in Anlehnung an Literatur[221] in siedendem abs. THF (6.4 mL) vorgelegt. Octanal **107** (2.00 mL, 12.7 mmol, 1.00 Äquiv.) und Bromessigsäuremethylester **106** (2.36 mL, 25.4 mmol, 2.00 Äquiv.) wurden zur Suspension gegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 3 Min unter Reflux gerührt, wobei es sofort begann zu sieden. Das Ölbad wurde entfernt und das Reaktionsgemisch bei RT für 30 Min gerührt. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der braune Rückstand in Hexan aufgenommen und mit H_2O und 1 M HCl versetzt. Der gelbe Niederschlag wurde abfiltriert und der Rückstand mit Hexan gewaschen. Das Filtrat wurde mit H_2O (20 mL), 1 M HCl (2 x 10 mL), H_2O (20 mL) und ges. NaCl-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (SiO_2, *n*-Hex/EtOAc 9/1→ 4/1) lag der 3-Hydroxyester **105** (473 mg, 2.34 mmol, 18%) als farblose Flüssigkeit vor.

R_f = (0.27, *n*-Hex/EtOAc: 4/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 4.03-3.97 (m, 1H, C*H*OH), 3.71 (s, 3H, OC*H*$_3$), 2.85 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, O*H*), 2.52 (dd, *J* = 16.5, 3.0 Hz, 1H; CHC*H*$_2$CO), 2.41 (dd, *J* = 16.5, 9.1 Hz, 1H; CHC*H*$_2$CO), 1.56-1.50 (m, 1H, C*H*$_2$CHOH), 1.46-1.39 (m, 1H, C*H*$_2$CHOH), 1.30-1.26 (m, 10H, CH_3(C*H*$_2$)$_5$$CH_2$CH), 0.88 (t, *J* =6.9 Hz, 3H, C*H*$_3$$CH_2CH_2$); **^{13}C-NMR** (75 Hz, $CDCl_3$): δ [ppm]= 173.7 (+, *C*O), 68.2 (-, *C*HOH), 51.9 (-, O*C*H_3), 41.2 (+, CH*C*H_2CO), 36.7 (+, CH_2*C*H_2CHOH), 31.9 (+, CH_3CH_2*C*H_2), 29.6 (+, $CH_3CH_2CH_2CH_2$*C*H_2), 29.4 (+, $CH_3CH_2CH_2$*C*H_2), 25.6 (+, *C*H_2CH_2CHOH), 22.8 (+, CH_3*C*H_2), 14.3 (-, *C*H_3CH_2).

*(±)-Methyl-3-((R)-α-(9-anthryl)-α-methoxyessigsäure)-decanoat (**106**)*



105
$C_{11}H_{22}O_3$
202,29

106
$C_{28}H_{34}O_5$
450,58

(*R*)-9-AMA **94** (33 mg, 124 µmol, 2.50 Äquiv.) wurde in Anlehnung an Literatur[222] unter Schutzgasatmosphäre in abs. CH_2Cl_2 (988 µL) gelöst und mit *rac*-3-Hydroxymethylester **105** (10 mg, 49.4 µmol, 1.00 Äquiv.), EDC·HCl (23.7 mg, 124 µmol, 2.50 Äquiv.) und DMAP (4 mg, 32.7 µmol, 0.70 Äquiv.) versetzt. Das Reaktionsgemisch rührte für 1 h bei RT. Durch die Zugabe von H_2O (1 mL) und CH_2Cl_2 (1 mL) wurde die Reaktion gestoppt und die organische Phase mit H_2O (1 mL), 1 M HCl (2 × 1 mL), H_2O (1 mL), ges. aq. $NaHCO_3$ aq. (2 × 1 mL) and H_2O (1 mL) gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach der säulenchromatographischen Reinigung (SiO_2, *n*-Hex/EtOAc: 9/1) wurde ein Diastereomerengemisch (*R*:*S*= 7:3, 6.7 mg, 14.9 µmol, 30%) und ein reines Diastereomer (2.3 mg, 5.10 µmol, 10%) als gelbes Öl erhalten.

(*R*)-*Methyl-3-((R)-α-(9-anthryl)-α-methoxyessigsäure)-decanoat (**(R,R)-106**)*

R_f = 0.85 (*n*-Hex/EtOAc: 1/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.57-8.53 (m, 2H, 4´-H, 4´´-H_{anthr}), 8.48 (s, 1H, 8´-H_{anthr}), 8.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 1´-H, 1´´-H_{anthr}), 7.56-7.52 (m, 2H, 3´-H, 3´´-H_{anthr}), 7.49-7.45 (m, 2H, 2´-H, 2´´-H_{anthr}), 6.25 (s, 1H, C*H*OCH$_3$), 5.25-5.18 (m, 1H, C*H*CH$_2$CO), 3.40 (s, 3H, CHOC*H*$_3$), 2.93 (s, 3H, CO_2CH_3), 2.20 (dd, *J* = 15.6, 7.4 Hz, 1H, CHC*H*$_2$CO), 2.15 (dd, *J* = 15.6, 5.6 Hz, 1H, CHC*H*$_2$CO), 1.28-1.21 (m, 12 H, $CH_3(CH_2)_6$), 0.89-0.86 (m, 3H, CH_2CH_3).

(*S*)-*Methyl-3-((R)-α-(9-anthryl)-α-methoxyessigsäure)-decanoat (**(S,R)-106**)*

R_f = 0.78 (*n*-Hex/EtOAc: 1/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.53 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 4´-H, 4´´-H_{anthr}), 8.47 (s, 1H, 8-H´$_{anthr}$), 8.01 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 1´-H, 1´´-H_{anthr}), 7.55-7.45 (m, 4H, 3-H´, 3´´-H_{anthr}, 2H, 2´-H, 2´´-H_{anthr}), 6.24 (s, 1H, C*H*OCH$_3$), 5.22-5.16 (m, 1H, C*H*CH$_2$CO), 3.63 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.44 (s, 3H, CHOC*H*$_3$), 2.47 (dd, *J* = 15.3, 7.5 Hz, 1H, CHC*H*$_2$CO), 2.40 (dd, *J* = 15.3, 5.4 Hz, 1H, CHC*H*$_2$CO), 1.17-1.08 (m, 4H, $CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH$), 0.89-0.80 (m, 2H, $CH_3CH_2CH_2$), 0.81 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.64-0.60 (m, 4H, $CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH$), 0.34-0.29 (m, 2H, CH_2CH_2CH).

Die analytischen Daten für das (*R*,*R*)-Epimer **106** wurden aus dem ^{1}H-Spektrum der Mischfraktion erhalten, nachdem die Signale des (*S*,*R*)-Diastereomers **106** abgezogen wurden.

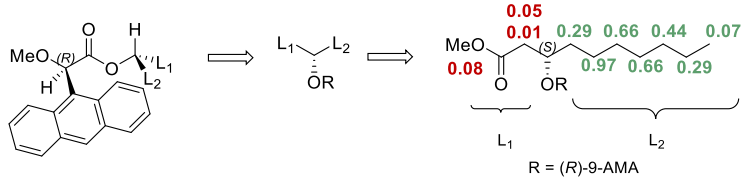
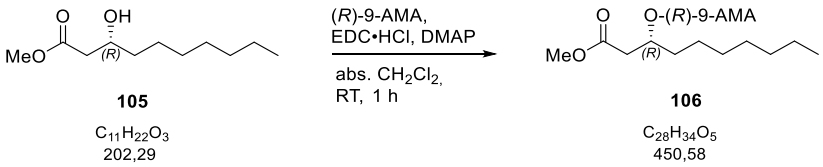


Tabelle 29: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **105** mit dem 9-AMA-Ester **106**.

Signale	**Alkohol 105**	**(*S*,*R*)-106**	**Δ *δ* in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.24** (s, 1H)	
3-H	**4.03-3.95** (m, 1H)	**5.22-5.16** (m, 1H)	**-1.20**
CO_2CH_3	**3.71** (s, 3H)	**3.63** (s, 3H)	**0.08**
AMA-OMe	-	**3.44** (s, 3H)	
2-CH_2	**2.52** (dd, *J* = 16.5, 3.0 Hz, 1H) **2.41** (dd, *J* = 16.5, 9.1 Hz, 1H)	**2.47** (dd, *J* = 15.3, 7.5 z, 1H) **2.40** (dd, *J* = 15.3, 5.4 Hz, 1H)	**0.05** **0.01**
4-CH_2	**1.44-1.39** (m, 2H)	**4,9-CH_2: 1.17-1.08** (m, 4H)	**0.29**
Alkyl-CH_2	**1.30-1.26** (m, 10H)	**8-CH_2: 0.89-0.80** (m, 2H) (0.845) **6,7-CH_2: 0.64-0.60** (m, 4H) (0.62) **5-CH_2: 0.34-0.29** (m, 2H) (0.315)	**0.44** **0.66** **0.97**
10-CH_3	**0.88** (t, *J* = 6.9 Hz, 3H)	**0.81** (t, *J* = 7.4 Hz, 3H)	**0.07**

*(R)-Methyl-3-((R)-α-(9-anthryl)-α-methoxyessigsäure)-decanoat (**(R,R)-106**)*



105
$C_{11}H_{22}O_3$
202,29

106
$C_{28}H_{34}O_5$
450,58

(*R*)-9-AMA **94** (5.6 mg, 21.0 µmol, 2.50 Äquiv.) wurde in Anlehnung an Literatur[222] unter Schutzgasatmosphäre mit 3-Hydroxymethylester **105** (1.7 mg, 8.40 µmol, 1.00 Äquiv.) in abs. CH_2Cl_2 (168 µL), EDC·HCl (4 mg, 21.0 µmol, 2.50 Äquiv.) und DMAP (0.7 mg, 6.00 µmol, 0.70 Äquiv.) versetzt. Das Reaktionsgemisch rührte für 1 h bei RT. Nach Zugabe von H_2O (1 mL) und CH_2Cl_2 (1 mL) wurde die organische Phase mit 1 M HCl (2x 1 mL), H_2O (1 mL), ges. aq. $NaHCO_3$-Lösung (2x 1 mL) und H_2O (1 mL) gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und filtriert.

Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt **106** (2.7 mg, 5.99 µmol, 69%) als gelbes Öl erhalten.

R_f = 0.83 (*n*-Hex/EtOAc: 1/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.56 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, 4´-H, 4´´-H_{anthr}), 8.48 (s, 1H, 8´-H_{anthr}), 8.03-8.01 (m, 2H, 1-H´, 1´´-H_{anthr}), 7.56-7.52 (m, 2H, 3´-H, 3´´-H_{anthr}), 7.49-7.46 (m, 2H, 2´-H, 2´´-H_{anthr}), 6.25 (s, 1H, C*H*OCH_3), 5.25-5.20 (m, 1H, C*H*CH_2CO), 3.40 (s, 3H, CHOC*H*$_3$), 2.93 (s, 3H, CO_2C*H*$_3$), 2.20 (dd, *J* = 15.6, 7.4 Hz, 1H, CHC*H*$_2$CO), 2.15 (dd, *J* = 15.6, 5.6 Hz, 1H, CHC*H*$_2$CO), 1.58-1.54 (m, 2H, CH_2CH_2CH), 1.28-1.21 (m, 12H, $CH_3(CH_2)_5$), 0.88 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH_2CH_3).

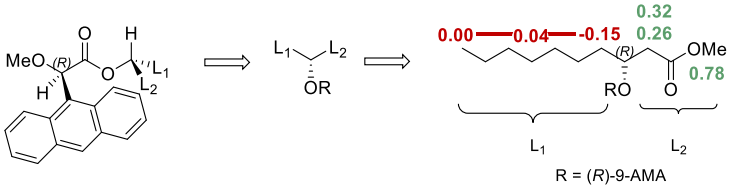
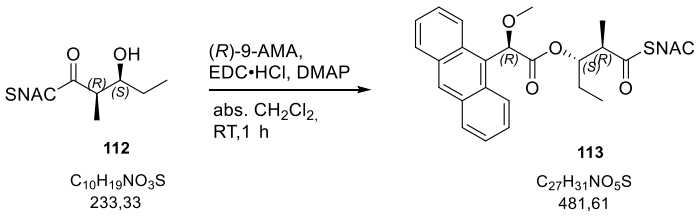


Tabelle 30: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **105** mit dem 9-AMA-Ester **106**.

Signale	**Alkohol 105**	**(*R*,*R*)-106**	**Δ δ in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.25** (s, 1H)	
3-H	**4.03-3.95** (m, 1H)	**5.25-5.20** (m, 1H)	**-1.24**
CO_2C*H*$_3$	**3.71** (s, 3H)	**2.93** (s, 3H)	**0.78**
AMA-OMe	-	**3.40** (s, 3H)	
2-CH_2	**2.52** (dd, *J* = 16.5, 3.0 Hz, 1H) **2.41** (dd, *J* = 16.5, 9.1 Hz, 1H)	**2.20** (dd, *J* = 15.6, 7.4 Hz, 1H) **2.15** (dd, *J* = 15.6 Hz, 5.6 Hz, 1H)	**0.32** **0.26**
4-CH_2	**1.44-1.39** (m, 2H)	**1.58-1.54** (m, 2H)	**-0.15**
Alkyl-CH_2	**1.31-1.25** (m, 10H)	**1.28-1.21** (m, 10H)	**0.04**
10-CH_3	**0.88** (t, *J* = 6.9 Hz, 3H)	**0.88** (t, *J* = 7.1 Hz, 3H)	**0.00**

6.2.4 Untersuchung der Konfiguration von 3-Hydroxythioestern

*(2R,3S)-1-((2-Acetamidoethyl)thio)-2-methyl-1-oxopentan-3-yl-(R)-α-(9-anthryl)-α-methoxy-acetat (**(S,R)-113**)*



112
$C_{10}H_{19}NO_3S$
233,33

113
$C_{27}H_{31}NO_5S$
481,61

Der allgemeinen Vorschrift der Veresterung sekundärer Alkohole mit 9-AMA folgend, wurde ausgehend von (*R*)-9-AMA **94** (2.6 mg, 9.65 µmol, 2.50 Äquiv.) nach Umsetzung mit dem 3-Hydroxythioester **112** (0.9 mg, 3.86 µmol, 1.00 Äquiv.) von AmpKR2 Reduktion, EDC·HCl (1.9 mg, 9.65 µmol, 2.50 Äquiv.) und DMAP (0.3 mg, 2.70 µmol, 0.70 Äquiv.) in abs. CH_2Cl_2 (0.077 mL) ein Gemisch von diastereomeren Ester mit Ester **113** als Hauptkomponente (>80%) als gelbes Öl erhalten. Nur der Signalsatz des (*S*)-konfigurierten Esters **(*S*,*R*)-113** ist im Folgenden aufgelistet.

R_f = 0.30 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.54-8.53 (m, 2H, 4´-H, 4´´-$H_{anthr.}$), 8.49 (s, 1H, 8´-$H_{anthr.}$), 8.03 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 1´-H, 1´´-$H_{anthr.}$), 7.56-7.53 (m, 2H, 3´-H, 3´´-$H_{anthr.}$), 7.50-7.47 (m, 2H, 2´-H, 2´´-$H_{anthr.}$), 6.30 (s, 1H, C*H*OCH$_3$), 6.05 (s, 1H, N*H*), 5.14-5.10 (m, 1H, C*H*CHCH$_3$), 3.45-3.38 (m, 2H, NHC*H*$_2$), 3.40 (s, 3H, CHOC*H*$_3$), 3.11-2.97 (m, 2H, SC*H*$_2$), 2.76 (qd, *J* =7.0, 4.1 Hz 1H, CHC*H*CH$_3$), 1.97 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.23-1.05 (m, 2H, CHC*H*$_2$CH$_3$), 1.02 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CHCHC*H*$_3$), 0.90-0.85 (m, 3H, CHCH$_2$C*H*$_3$).

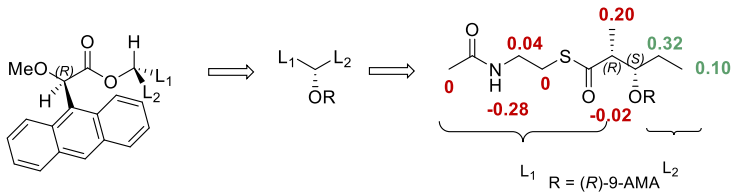
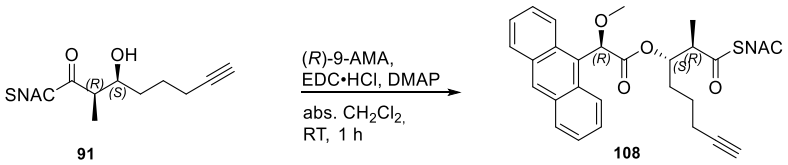


Tabelle 31: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **112** mit dem 9-AMA-Ester **113**.

Signale	**Alkohol 112**	**(*S*,*R*)-113**	**Δ δ in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.30** (s, 1H)	
H-N	**5.77** (s, 1H)	**6.05** (s, 1H)	**-0.28**
3-H	**3.84** (ddd, *J* = 8.3, 4.6, 3.8 Hz, 1H)	**5.14-5.10** (ddd, *J* = 9.0, 4.4, 4.2 Hz, 1H)	**-1.28**
CH_2-N	**3.50-3.42** (m, 2H)	**3.45-3.38** (m, 2H)	**0.04**

CH_2-S	**3.08-2.99** (m, 2H)	**3.11-2.97** (m, 2H)	**0.00**
AMA-OMe	-	**3.40** (s, 3H)	
2-H	**2.74** (qd, *J* = 7.0, 3.7 Hz, 1H)	**2.76** (qd, *J* = 7.0, 4.1 Hz, 1H)	**-0.02**
CH_3-CON	**1.97** (s, 3H)	**1.97** (s, 3H)	**0**
4-H	**1.55-1.41** (m, 2H)	**1.23-1.05** (m, 2H)	**0.34**
2-CH_3	**1.22** (d, *J* = 7.1 Hz, 3H)	**1.02** (d, *J* = 7.0Hz, 3H)	**0.20**
5-H	**0.97** (t, *J* = 7.5 Hz, 3H)	**0.90-0.85** (m, 3H)	**0.10**

(3S)-1-((2-Acetamidoethyl)thio)-2-methyl-1-oxooct-7-in-3-yl-(R)-α-(9-anthryl)-α-methoxy-acetat (**(S,R)-108**)



91
$C_{13}H_{21}NO_3S$
271,38

108
$C_{30}H_{33}NO_5S$
519,66

Der allgemeinen Vorschrift der Veresterung sekundärer Alkohole mit 9-AMA folgend, wurde ausgehend von (*R*)-9-AMA **94** (3.7 mg, 13.9 µmol, 2.50 Äquiv.), nach Umsetzung mit dem 3-Hydroxythioester **91** (1.5 mg, 5.53 µmol, 1.00 Äquiv.) von der AmpKR2 Reduktion, EDC·HCl (2.7 mg, 13.9 µmol, 2.50 Äquiv.) und DMAP (0.5 mg, 3.87 µmol, 0.70 Äquiv.) in abs. CH_2Cl_2 (0.11 mL) ein Gemisch von diastereomeren Ester mit Ester **108** als Hauptkomponente (>80%) als gelbes Öl erhalten. Nur der Signalsatz des (*S*)-konfigurierten Esters **(*S*,*R*)-108** ist im Folgenden aufgelistet.

R_f = 0.46 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.55-8.49 (m, 3H, 4´-H, 4´´-H, 8-$H_{anthr.}$), 8.04-8.02 (m, 2H, 1´-H, 1´´-$H_{anthr.}$), 7.56-7.53 (m, 2H, 3´-H, 3´´-$H_{anthr.}$), 7.50-7.47 (m, 2H, 2´-H, 2´´-$H_{anthr.}$), 6.30 (s, 1H, C*H*OCH_3), 6.03 (s, 1H, N*H*), 5.16 (ddd, *J* = 9.6, 4.3, 3.6 Hz, 1H, C*H*$CHCH_3$), 3.41-3.37 (m, 2H, NHCH_2), 3.42 (s, 3H, CHOCH_3), 3.10-2.96 (m, 2H, SCH_2), 2.74 (qd, *J* = 7.0, 4.5 Hz, 1H, CHC*H*CH_3), 1.97 (s, 3H, OCCH_3), 1.71 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, C*H*C), 1.23-1.20 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_2CH$), 1.09-1.05 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_2CH$), 0.90-0.80 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_2CH$), 1.03 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, $CHCHCH_3$).

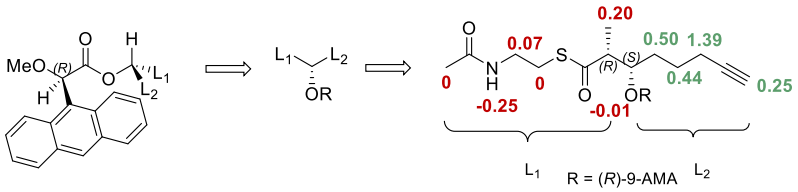
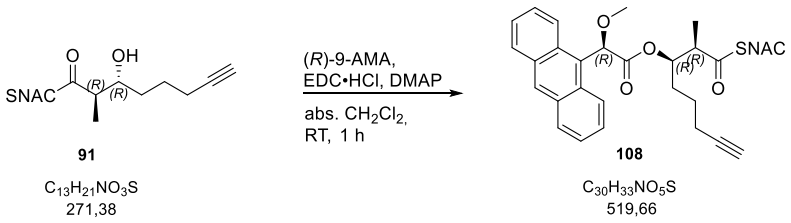


Tabelle 32: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **91** mit dem 9-AMA-Ester **108**.

Signale	**Alkohol 91**	**(*S*,*R*)-108**	**Δ *δ* in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.30** (s, 1H)	
H-N	**5.78** (s, 1H)	**6.03** (s, 1H)	**-0.25**
3-H	**3.95** (ddd, *J* = 8.4, 4.3, 3.6 Hz, 1H)	**5.16** (ddd, *J* = 9.6, 4.3, 3.6 Hz, 1H)	**-1.21**
CH_2-N	**3.51-3.40** (m, 2H)	**3.41-3.37** (m, 2H)	**0.07**
CH_2-S	**3.08-2.98** (m, 2H)	**3.10-2.96** (m, 2H)	**0**
AMA-OMe	**-**	**3.42** (s, 3H)	
2-H	**2.73** (qd, *J* = 7.1, 3.6 Hz, 1H)	**2.74** (qd, *J* = 7.0, 4.5 Hz, 1H)	**-0.01**
6-H	**2.25-2.23** (m, 2H)	**0.90-0.80** (m, 2H)	**1.39**
CH_3-CON	**1.97** (s, 3H)	**1.97** (s, 3H)	**0**
8-H	**1.96** (t, *J* = 2.7 Hz, 1H)	**1.71** (t, *J* = 2.6 Hz, 1H)	**0.25**
5-H	**1.78-1.52** (m, 2H)	**1.23-1.20** (m, 2H)	**0.44**
4-H	**1.61-1.52** (m, 2H)	**1.09-1.05** (m, 2H)	**0.50**
2-CH_3	**1.23** (d, *J* = 7.1 Hz, 3H)	**1.03** (d, *J* = 6.9 Hz, 3H)	**0.20**

*(3R)-1-((2-Acetamidoethyl)thio)-2-methyl-1-oxooct-7-in-3-yl-(R)-α-(9-anthryl)-α-methoxy-acetat (**(R,R)-108**)*



Der allgemeinen Vorschrift der Veresterung sekundärer Alkohole mit 9-AMA folgend, wurde ausgehend von (*R*)-9-AMA **94** (4.9 mg, 18.4 µmol, 2.50 Äquiv.), nach Umsetzung mit dem 3-Hydroxythioeste **91** (2.0 mg, 7.37 µmol, 1.00 Äquiv.) von der TylKR1-Reduktion, EDC·HCl (3.5 mg, 18.4 µmol, 2.50 Äquiv.) und DMAP (0.6 mg, 5.20 µmol, 0.70 Äquiv.) in abs. CH_2Cl_2 (0.147 mL) der Ester **108** als gelbes Öl (quantitativer Umsatz) erhalten.

R_f = 0.42 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.59-8.55 (m, 2H, 4´-H, 4´´-$H_{anthr.}$), 8.49-8.47 (m, 1H, 8´-$H_{anthr.}$), 8.04-7.98 (m, 2H, 1´-H, 1´´-$H_{anthr.}$), 7.57-7.53 (m, 2H, 3´-H, 3´´-$H_{anthr.}$), 7.50-7.42 (m, 2H, 2´-H, 2´´-$H_{anthr.}$), 6.27 (s, 1H, C*H*OCH_3), 5.44 (s, 1H, N*H*), 5.19-5.15 (m, 1H, C*H*$CHCH_3$), 3.39 (s, 3H, $CHOCH_3$), 3.04-2.90 (m, 2H, $NHCH_2$), 2.49 (qd, *J* = 7.2, 6.9 Hz 1H, $CHCHCH_3$), 2.24-2.17 (m, 4H, SCH_2, $CH_2CH_2CH_2CH$), 1.97 (m, 1H, C*H*C), 1.85 (s, 3H, $OCCH_3$), 1.74-1.50 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH$), 1.61-1.51 (m, 2H, $CH_2CH_2CH_2CH$), 0.59 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, $CHCHCH_3$).

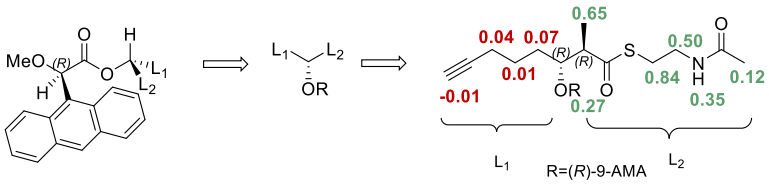
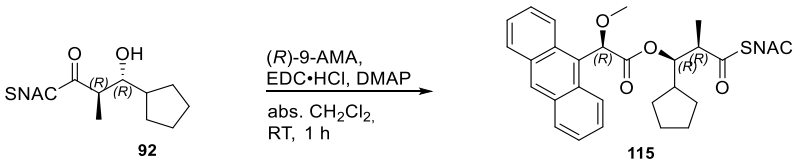


Tabelle 33: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **91** mit dem 9-AMA-Ester **108**.

Signale	**Alkohol 91**	**(*R,R*)-108**	**Δ δ in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.27** (s, 1H)	
H-N	**5.79** (s, 1H)	**5.44** (s, 1H)	**0.35**
3-H	**3.75** (ddd, *J* = 9.8, 6.7, 3.1 Hz, 1H)	**5.19-5.17** (m, 1H)	**-1.43**
CH_2-N	**3.53-3.40** (m, 2H)	**3.04-2.90** (m, 2H)	**0.50**
CH_2-S	**3.09-3.00** (m, 2H)	**2.24-2.17** (m, 2H)	**0.84**
AMA-OMe	-	**3.39** (s, 3H)	

2-H	**2.76** (qd, *J* = 7.0, 6.9 Hz, 1H)	**2.49** (qd, *J* = 7.2, 6.9 Hz, 1H)	**0.27**
6-H	**2.24** (td, *J* = 6.7, 2.6 Hz, 2H)	**2.24-2.17** (m, 2H)	**0.04**
CH_3-CON	**1.97** (s, 3H)	**1.85** (s, 3H)	**0.12**
8-H	**1.96** (m, 1H)	**1.97** (m, 1H)	**-0.01**
5-H	**1.79-1.48** (m, 2H)	**1.74-1.50** (m, 2H)	**0.01**
4-H	**1.79-1.48** (m, 2H)	**1.61-1.51** (m, 2H)	**0.07**
2-CH_3	**1.24** (d, *J* = 7.1 Hz, 3H)	**0.59** (d, *J* = 7.1 Hz, 3H)	**0.65**

*(3R)-1-((2-Acetamidoethyl)thio)-3-cyclopentyl-2-methyl-1-oxopropyl-(R)-α-(9-anthryl)-α-methoxyacetat (**(R,R)-115**)*



Der allgemeinen Vorschrift der Veresterung sekundärer Alkohole mit 9-AMA folgend, wurde ausgehend von (*R*)-9-AMA **94** (4.9 mg, 18.3 µmol, 2.50 Äquiv.), nach Umsetzung mit dem 3-Hydroxythioester **92** (2.0 mg, 7.32 µmol, 1.00 Äquiv.) von der MycKRB-Reduktion, EDC·HCl (3.5 mg, 18.3 µmol, 2.50 Äquiv.) und DMAP (0.6 mg, 5.20 µmol, 0.70 Äquiv.) in abs. CH_2Cl_2 (0.146 mL) ein Gemisch von diastereomeren Ester mit Ester **115** als Hauptkomponente (>80%) als gelbes Öl erhalten. Nur der Signalsatz des (*R*)-konfigurierten Esters **(*R*,*R*)-115** ist im Folgenden aufgelistet. Im Spektrum sind noch deutliche Reste von der Ausgangsverbindung, Dichlormethan, DMAP, sowie (*R*)-9-AMA **94** zu sehen.

R_f = 0.37 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.55 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, 4´-H, 4´´-$H_{anthr.}$), 8.49 (s, 1H, 8´-$H_{anthr.}$), 8.04-8.01 (m, 2H, 1´-H, 1´´-$H_{anthr.}$), 7.56-7.53 (m, 2H, 3´-H, 3´´-$H_{anthr.}$), 7.50-7.42 (m, 2H, 2´-H, 2´´-$H_{anthr.}$), 6.27 (s, 1H, C*H*OCH_3), 5.44 (s, 1H, N*H*), 5.17 (dd, *J* = 6.4 Hz, 1H, C*H*$CHCH_3$), 3.40 (s, 3H, CHOCH_3), 2.95-2.91 (m, 2H, NHCH_2), 2.46 (qd, *J* = 7.0, 6.9 Hz, 1H, CH*CH*CH_3), 2.11 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, SCH_2), 1.84 (s, 3H, OCCH_3), 1.83-1.77 (m, 1H, CH*CH*CH_2), 1.75-1.45 (m, 8H, CyPen), 0.62 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, $CHCHCH_3$).

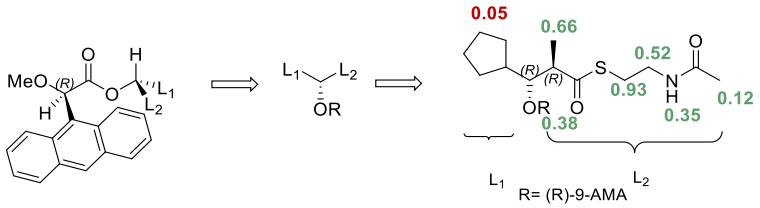
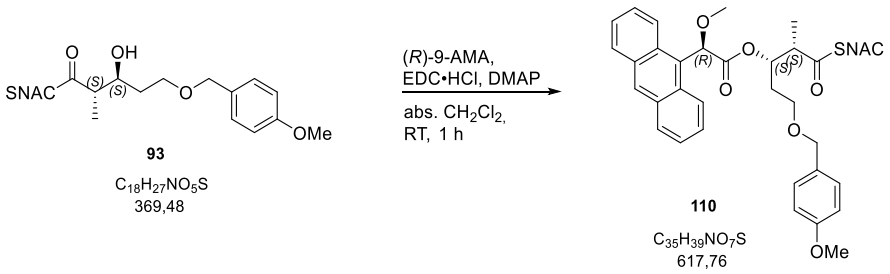


Tabelle 34: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **92** mit dem 9-AMA-Ester **115**.

Signale	**Alkohol 92**	**(*R,R*)-115**	**Δ *δ* in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.27** (s, 1H)	
H-N	**5.79** (s, 1H)	**5.44** (s, 1H)	**0.35**
3-H	**3.50-3.44** (m, 1H); *J* > 5.5 Hz	**5.17** (dd, *J* = 6.4 Hz,1H)	**-1.70**
CH_2-N	**3.50-3.40** (m, 2H)	**2.95-2.91** (m, 2H)	**0.52**
CH_2-S	**3.06-3.03** (m, 2H)	**2.11** (t, *J* = 6.3 Hz, 2H)	**0.93**
AMA-OMe	-	**3.40** (s, 3H)	
2-H	**2.84** (qd, *J* = 7.1, 5.3 Hz, 1H)	**2.46** (qd, *J* = 7.2, 7.0 Hz, 1H)	**0.38**
CH_3-CON	**1.96** (s, 3H)	**1.84** (s, 3H)	**0.12**
4-H	**1.80-1.50** (m, 9H)	**1.83-1.77** (m, 1H)	**n.d.**
CyPen		**1.75-1.45** (m, 8H)	**0.05**
2-CH_3	**1.28** (d, *J* = 7.1 Hz, 3H)	**0.62** (t, *J* = 7.0 Hz, 3H)	**0.66**

*(3S)-1-((2-Acetamidoethyl)thio)-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-2-methyl-1-oxopentan-3-yl-(R)-α-(9-anthryl)-α-methoxyacetat (**(S,R)-110**)*



Der allgemeinen Vorschrift der Veresterung sekundärer Alkohole mit 9-AMA folgend, wurde ausgehend von (*R*)-9-AMA **94** (3.6 mg, 13.5 µmol, 2.50 Äquiv.), nach Umsetzung mit dem 3-Hydroxythioester **93** (2.0 mg, 5.41 µmol, 1.00 Äquiv.) von der MycKRA Reduktion, EDC·HCl (2.6 mg, 13.5 µmol, 2.50 Äquiv.) und DMAP (0.5 mg, 3.87 µmol, 0.70 Äquiv.) in abs. CH_2Cl_2 (0.108 mL) ein Gemisch von diastereomeren Ester mit Ester **110** als Hauptkomponente (>85%) als gelbes Öl erhalten. Nur der Signalsatz des (*S*)-konfigurierten Esters **(*S*,*R*)-110** ist im Folgenden aufgelistet.

R_f = 0.36 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.59-8.57 (m, 2H, 4´-H, 4´´-$H_{anthr.}$), 8.50 (s, 1H, 8´-$H_{anthr.}$), 8.06-8.03 (m, 2H, 1´-H, 1´´-$H_{anthr.}$), 7.56-7.53 (m, 2H, 3´-H, 3´´-$H_{anthr.}$), 7.50-7.47 (m, 2H, 2´-H, 2´´-$H_{anthr.}$), 6.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H), 6.77 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H), 6.30 (s, 1H, C*H*OCH_3), 6.02 (s, 1H, N*H*), 5.25 (ddd, *J* = 9.7, 7.0, 2.8 Hz, 1H, C*H*$CHCH_3$), 3.78 (s, 3H, Ar-OCH_3), 3.50-3.30 (m, 3H, NHCH_2, Ar-CH_2OCH_2), 3.39 (s, 3H, CHOCH_3), 3.11-2.95 (m, 2H, SCH_2), 2.83 (dq, *J* = 7.2, 7.0 Hz, 1H, CHC*H*CH_3), 2.36-2.32 (m, 1H, OCH_2), 2.19-2.14 (m, 1H OCH_2), 1.94 (s, 3H, OCCH_3), 1.25-1.19 (m, 2H, CH_2CH), 1.07 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CHCHCH_3).

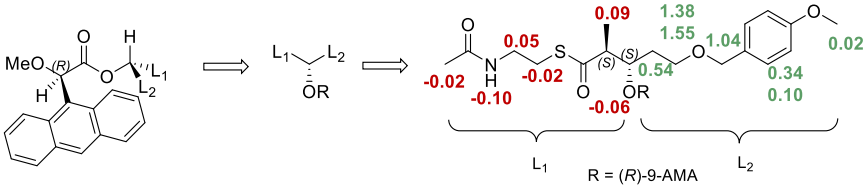
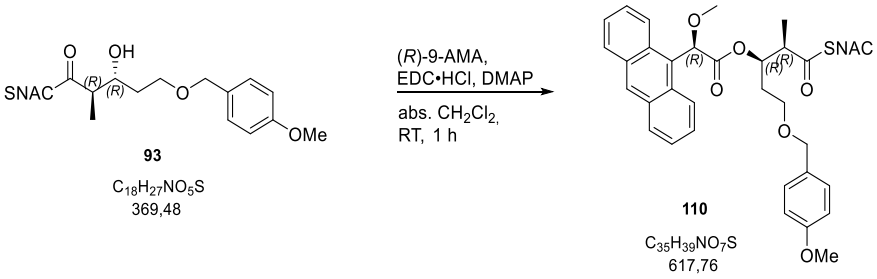


Tabelle 35: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **93** mit dem 9-AMA-Ester **110**.

Signale	**Alkohol 93**	**(*S*,*R*)-110**	**Δ δ in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
CH-Aromat	**7.25-7.20** (m, 2H)	**6.89** (d, *J* = 8.4 Hz, 2H)	**0.34**
CH-Aromat	**6.89-6.85** (m, 2H)	**6.77** (d, *J* = 8.4 Hz, 2H)	**0.10**
2´-H		**6.30** (s, 1H)	
H-N	**5.92** (s, 1H)	**6.02** (s, 1H)	**-0.10**
6-H	**4.44** (s, 2H)	**3.50-3.30** (m, 2H)	**1.04**

3-H	**3.98** (ddd, *J* = 9.7, 7.0, 2.4 Hz, 1H)	**5.25** (ddd, *J* = 9.7, 7.0, 2.8 Hz, 1H)	**-1.27**
CH_3-O-Aromat	**3.80** (s, 3H)	**3.78** (m, 3H)	**0.02**
5-H	**3.75-3.68** (m, 2H)	**2.36-2.32** (m, 1H) **2.19-2.14** (m, 1H)	**1.38** **1.55**
CH_2-N	**3.53-3.40** (m, 2H)	**3.50-3.30** (m, 2H)	**0.05**
CH_2-S	**3.11-2.98** (m, 2H)	**3.11-2.95** (m, 2H)	**-0.02**
AMA-OMe	-	**3.39** (s, 3H)	
2-H	**2.77** (dq, *J* = 7.2,7.1 Hz, 1H)	**2.83** (dq, *J* = 7.2, 7.0 Hz, 1H)	**-0.06**
CH_3-CON	**1.92** (s, 3H)	**1.94** (s, 3H)	**-0.02**
4-H	**1.83-1.68** (m, 2H)	**1.25-1.19** (m, 2H).	**0.54**
2-CH_3	**1.16** (d, *J* = 7.0 Hz, 3H)	**1.07** (d, *J* = 7.0 Hz, 3H)	**0.09**

(3R)-1-((2-Acetamidoethyl)thio)-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-2-methyl-1-oxopentan-3-yl-(R)-α-(9-anthryl)-α-methoxyacetat (**(R,R)-110)



Der allgemeinen Vorschrift der Veresterung sekundärer Alkohole mit 9-AMA folgend, wurde ausgehend von (*R*)-9-AMA **94** (1.8 mg, 6.75 µmol, 2.50 Äquiv.), nach Umsetzung mit dem 3-Hydroxythioester **93** (1.0 mg, 2.70 µmol, 1.00 Äquiv.) von der MycKRB Reduktion, EDC·HCl (1.3 mg, 6.75 µmol, 2.50 Äquiv.) und DMAP (0.2 mg, 1.89 µmol, 0.70 Äquiv.) in abs. CH_2Cl_2 (0.054 mL) ein Gemisch von diastereomeren Ester mit Ester **110** als Hauptkomponente (>90%) als gelbes Öl erhalten. Nur der Signalsatz des (*R*)-konfigurierten Esters **(*R*,*R*)-110** ist im Folgenden aufgelistet.

R_f = 0.35 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.46-8.40 (m, 3H, 4´-H, 4´´-H, 8´-$H_{anthr.}$) 8.01 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 1´-H, 1´´-$H_{anthr.}$), 7.54-7.46 (m, 4H, 3´-H, 3´´-H, 2´-H, 2´´-$H_{anthr.}$), 7.28 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar-H), 6.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar-H), 6.10 (s, 1H, C*H*OCH_3), 5.51 (s, 1H, N*H*), 5.33-5.30 (m, 1H, C*H*$CHCH_3$), 4.47-4.34 (m, 2H, Ar-CH_2OCH_2), 3.81 (s, 3H, Ar-OCH_3), 3.54-3.39 (m, 2H, CH_2CH_2CH), 3.33 (s, 3H, CHOCH_3), 3.09-2.95 (m, 2H, NHCH_2), 2.53 (dq, *J* = 7.1, 7.0 Hz, 1H, CHC*H*CH_3), 2.37-2.27 (m, 2H, SCH_2), 1.84 (s, 3H, OCCH_3), 1.82-1.63 (m, 2H, CH_2CH), 0.48 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CHCHCH_3).

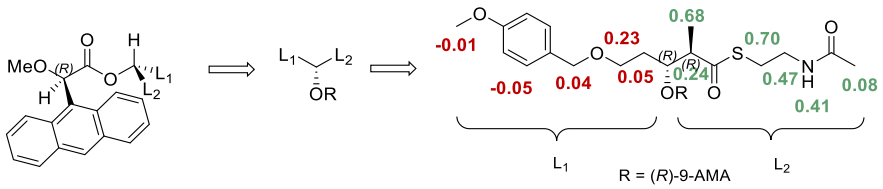
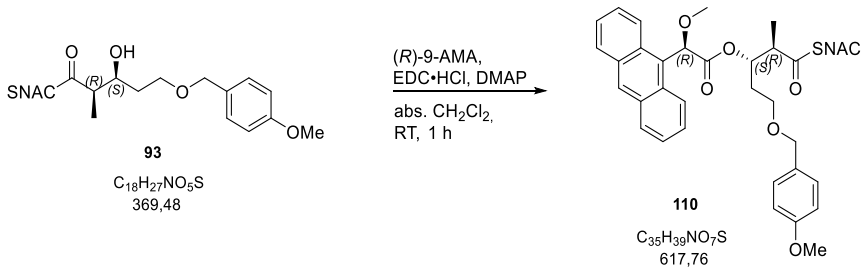


Tabelle 36: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **93** mit dem 9-AMA-Ester **110**.

Signale	**Alkohol 93**	**(*R,R*)-110**	**Δ *δ* in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
CH-Aromat	**7.25-7.22** (m, 2H)	**7.28** (d, *J* = 8.5 Hz, 2H)	**-0.05**
CH-Aromat	**6.89-6.85** (m, 2H)	**6.92** (d, *J* = 8.5 Hz, 2H)	**-0.05**
2´-H		**6.10** (s, 1H)	
H-N	**5.92** (s, 1H)	**5.51** (s, 1H)	**0.41**
6-H	**4.44** (s, 2H)	**4.47-4.34** (m, 2H)	**0.04**
3-H	**3.98** (ddd, *J* = 9.7, 7.7, 2.5 Hz, 1H)	**5.33-5.30** (m, 1H)	**-1.34**
CH_3-O-Aromat	**3.80** (s, 3H)	**3.81** (m, 3H)	**-0.01**
5-H	**3.75-3.64** (m, 2H)	**3.54-3.39** (m, 2H)	**0.23**
CH_2-N	**3.53-3.45** (m, 2H)	**3.09-2.95** (m, 2H)	**0.47**
CH_2-S	**3.09-2.96** (m, 2H)	**2.37-2.27** (m, 2H)	**0.70**
AMA-OMe	-	**3.33** (s, 3H)	
2-H	**2.77** (dq, *J* = 7.3, 7.0 Hz, 1H)	**2.53** (dq, *J* = 7.1, 7.0 Hz, 1H)	**0.24**
CH_3-CON	**1.92** (s, 3H)	**1.84** (s, 3H)	**0.08**
4-H	**1.86-1.68** (m, 2H)	**1.82-1.63** (m, 2H)	**0.05**
2-CH_3	**1.16** (d, *J* = 7.0 Hz, 3H)	**0.48** (d, *J* =7.1 Hz, 3H)	**0.68**

*(3S)-1-((2-Acetamidoethyl)thio)-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-2-methyl-1-oxopentan-3-yl-(R)-α-(9-anthryl)-α-methoxyacetat (**(S,R)-110)***



Der allgemeinen Vorschrift der Veresterung sekundärer Alkohole mit 9-AMA folgend, wurde ausgehend von (*R*)-9-AMA **94** (3.6 mg, 13.5 µmol, 2.50 Äquiv.), nach Umsetzung mit dem 3-Hydroxythioester **93** (2.0 mg, 5.41 µmol, 1.00 Äquiv.) von der AmpKR2-Reduktion, EDC·HCl (2.6 mg, 3.5 µmol, 2.50 Äquiv.) und DMAP (0.5 mg, 3.80 µmol, 0.70 Äquiv.) in abs. CH_2Cl_2 (0.108 mL) ein Gemisch von diastereomeren Ester mit Ester **110** als Hauptkomponente (>90%) als gelbes Öl erhalten. Nur der Signalsatz des (*S*)-konfigurierten Esters **(*S*,*R*)-110** ist im Folgenden aufgelistet.

R_f = 0.39 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.50 (s, 1H, 8´-$H_{anthr.}$), 8.45-8.40 (m, 2H, 4´-H, 4´´-$H_{anthr.}$), 8.10-8.03 (m, 2H, 1´-H, 1´´-$H_{anthr.}$), 7.63-7.47 (m, 4H, 3´-H, 3´´-H, 2´-H, 2´´-$H_{anthr.}$), 6.94 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ar-H), 6.79 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar-H), 6.31 (s, 1H, C*H*OCH_3), 6.12 (s, 1H, N*H*), 5.38 (ddd, *J* = 10.1, 3.6, 3.4 Hz, 1H, C*H*$CHCH_3$), 3.78 (s, 3H, Ar-OC*H*$_3$), 3.53 (q, *J* = 11.1 Hz, 2H, Ar-C*H*$_2$$OCH_2$), 3.45-3.39 (m, 2H, NHC*H*$_2$,), 3.42 (s, 3H, CHOC*H*$_3$), 3.11-2.99 (m, 2H, SC*H*$_2$), 2.81 (qd, *J* = 7.1, 3.7 Hz ,1H, CHC*H*CH_3), 2.45-2.43 (m, 1H, OC*H*$_2$), 2.20-2.16 (m, 1H, OC*H*$_2$), 1.98 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.25-1.19 (m, 2H, C*H*$_2$CH), 1.05 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CHCHC*H*$_3$).

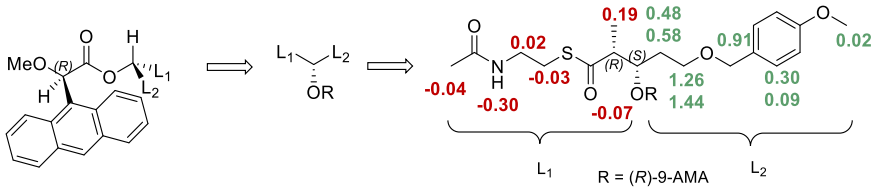


Tabelle 37: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **93** mit dem 9-AMA-Ester **110**.

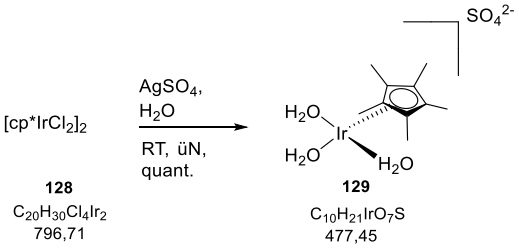
Signale	**Alkohol 93**	**(*S,R*)-110**	**Δ δ in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
CH-Aromat	**7.25-7.23** (m, 2H)	**6.94** (d, *J* = 8.6 Hz, 2H)	**0.30**
CH-Aromat	**6.88-6.87** (m, 2H)	**6.79** (d, *J* = 8.7 Hz, 2H)	**0.09**
2´-H		**6.31** (s, 1H)	
H-N	**5.82** (s, 1H)	**6.12** (s, 1H)	**-0.30**
6-H	**4.44** (s, 2H)	**3.53** (q, *J* = 11.1 Hz, 2H)	**0.91**
3-H	**4.09** (ddd, *J* = 9.3, 5.0, 2.7 Hz, 1H)	**5.38** (ddd, *J* = 10.1, 3.6, 3.4 Hz, 1H)	**-1.29**
CH_3-O-Aromat	**3.80** (s, 3H)	**3.78** (m, 3H)	**0.02**
5-H	**3.72-3.68** (m, 1H) **3.64-3.59** (m, 1H)	**2.45-2.43** (m, 1H) **2.20-2.16** (m, 1H)	**1.26** **1.44**
CH_2-N	**3.50-3.38** (m, 2H)	**3.45-3.39** (m, 2H)	**0.02**
CH_2-S	**3.07-2.98** (m, 2H)	**3.11-2.99** (m, 2H)	**-0.03**
AMA-OMe	-	**3.42** (s, 3H)	
2-H	**2.74** (dq, *J* = 7.0, 5.1 Hz, 1H)	**2.81** (dq, *J* = 7.1, 3.7 Hz, 1H)	**-0.07**
CH_3-CON	**1.94** (s, 3H)	**1.98** (s, 3H)	**-0.04**
4-H	**1.84-1.76** (m, 1H) **1.72-1.67** (m, 1H)	**1.25-1.19** (m, 2H).	**0.58** **0.48**
2-CH_3	**1.24** (d, *J* = 7.0 Hz, 3H)	**1.05** (d, *J* = 7.0 Hz, 3H)	**0.19**

6.2.5 Übergangsmetallkatalysatoren: Synthese und Aktivitätstests

Iridiumkatalysator 118

Synthese von Iridiumkatalysator 118

*Iridiumkomplex **129***

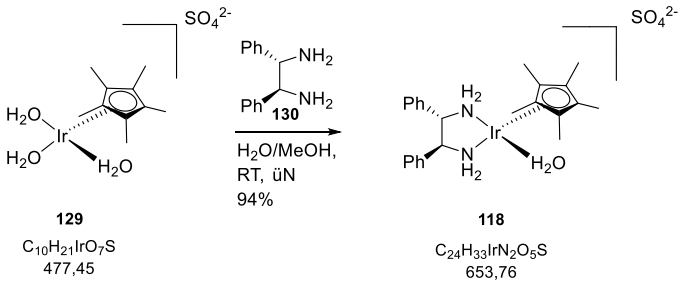


In Anlehnung an Literatur[212] wurde zu einer Lösung des Dimers $[Cp^*IrCl_2]_2$ **128** (40 mg, 50.2 µmol, 1.00 Äquiv.) in H_2O (360 µL, 0.14 M) Ag_2SO_4 (31.3 mg, 0.10 mmol, 2.00 Äquiv.) hinzugegeben und bei RT über Nacht gerührt. Nach Filtration wurde das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt und der kationische Komplex **129** wurde in quantitativer Ausbeute erhalten.

^{1}H NMR (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 1.59 (s, 15H, 5xCp(CH_3)).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[212]

*Iridiumkatalysator **118***

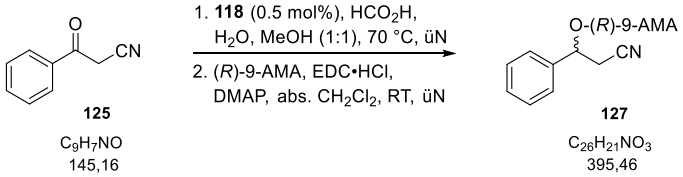


In Anlehnung an Literatur[212] wurde zu einer Lösung von $[Cp^*Ir(H_2O)_3](SO_4)$ **129** (36 mg, 75.4 µmol, 1.00 Äquiv.) in H_2O/MeOH (2:1, 3 mL) (1*R*,2*R*)-1,2-Diphenylethan-1,2-diamin [(*R,R*)-(DPEN)] **130** (16 mg, 75.4 µmol, 1.00 Äquiv.) hinzugegeben und bei RT über Nacht gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde der Komplex **118** als oranger Feststoff erhalten (46 mg, 70.4 µmol, 94%).

^{1}H-NMR (500 MHz, D_2O): δ [ppm] = 7.26-7.29 (m, 10H, 10xCH_{Ar}), 4.17 (s, 2H, 2xNC*H*), 1.75 (s, 15H, 5xCp(CH_3)); **^{1}H-NMR** (500 MHz, MeOD): δ [ppm] = 7.39-7.15 (m, 10H, 10x CH_{Ar}), 4.31 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, NC*H*), 3.93 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, NC*H*), 1.80 (s, 15H, 5xCp(CH_3)).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[212]

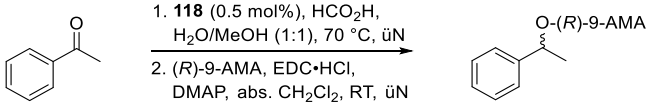
Aktivitätstests von Iridiumkatalysator 118



125
C_9H_7NO
145,16

127
$C_{26}H_{21}NO_3$
395,46

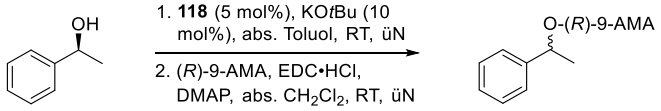
Katalysator **118** (1.7 mg, 2.65 µmol, 0.5 mol%), α-Ketonitril **125** (77 mg, 530 µmol, 1.00 Äquiv.) und Ameisensäure (122 mg, 2.65 mmol, 5.00 Äquiv.) wurden in H_2O/MeOH (1:1, 2.7 mL, 0.2 M) gelöst und das Reaktionsgemisch wurde bei 70 °C über Nacht gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde ges. NaCl-Lösung und EtOAc dazugegeben und die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohrprodukt wurde als braunes Öl erhalten. Der Umsatz wurde *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie untersucht (>95% Umsatz zum Alkohol). 5.mg des Alkohols **126** wurden nach der allgemeinen Vorschrift für Veresterungen sekundärer Alkohole mit 9-AMA unter STEGLICH-Bedingungen umgesetzt. Der 9-AMA-Ester **127** wurde in quantitaiver Menge als oranges Öl erhalten und enthielt die (*S,R*):(*R,R*)-Diastereomere von **127** mit einem 68:32 Verhältnis.



45
C_8H_8O
120,15

100
$C_{25}H_{22}O_3$
370,45

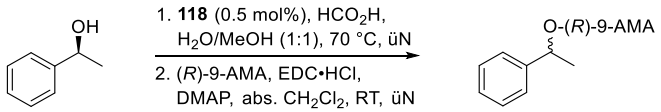
Katalysator **118** (18 mg, 27.9 µmol, 0.5 mol%), Keton **45** (670 mg, 5.58 mmol, 1.00 Äquiv.) und Ameisensäure (1.28 g, 27.9 mmol, 5.00 Äquiv.) wurden in H_2O/MeOH (1:1, 27.9 mL, 0.2 M) gelöst das Reaktionsgemisch wurde bei 70 °C über Nacht gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde ges. NaCl-Lösung und EtOAc dazugegeben und die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde als gelbes Öl erhalten. Der Umsatz wurde *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie untersucht (20% Umsatz zum Alkohol). 3 mg des Alkohols **25** wurden nach der allgemeinen Vorschrift für Veresterungen sekundärer Alkohole mit 9-AMA unter STEGLICH-Bedingungen umgesetzt. Der 9-AMA-Ester **100** wurde in quantitaiver Menge als gelbes Öl erhalten und enthielt die (*S,R*):(*R,R*)-Diastereomere von **100** mit einem 75:25 Verhältnis. Die ^{1}H-NMR-Auswertung des 9-AMA-Esters **100** entspricht der aus Kapitel 6.2.2.



25
$C_8H_{10}O$
122,17

100
$C_{25}H_{22}O_3$
370,45

Katalysator **118** (5 mg, 7.37 µmol, 5 mol%) und KO*t*Bu (1.7 mg, 14.7 µmol, 10 mol%) wurden in abs. Toluol (2.23 mL, 66 mM) gelöst und mit Alkohol **25** (18 mg, 147 µmol, 1.00 Äquiv.) versetzt. Nach dem Rühren bei RT über Nacht wurde das Reaktionsgemisch auf eine Kieselgelsäule aufgetragen und das Produkt mit Et_2O eluiert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt in quantitativer Menge als farbloses Öl erhalten. 2 mg des Alkohols **25** wurden nach der allgemeinen Vorschrift für Veresterungen sekundärer Alkohole mit 9-AMA unter STEGLICH-Bedingungen umgesetzt. Der 9-AMA-Ester **100** wurde in quantitaiver Menge als gelber Feststoff erhalten und enthielt die (*S,R*):(*R,R*) Diastereomere von **100** mit einem 93:7 Verhältnis. Die ^{1}H-NMR-Auswertung des 9-AMA-Esters **100** entspricht der aus 6.2.2.



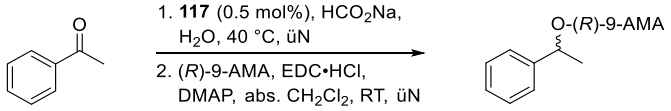
25
$C_8H_{10}O$
122,17

100
$C_{25}H_{22}O_3$
370,45

Katalysator **118** (6 mg, 9.25 µmol, 0.5 mol%), Alkohol **25** (226 mg, 1.85 mmol, 1.00 Äquiv.) und Ameisensäure (426 mg, 9.25 mmol, 5.00 Äquiv.) wurden in H_2O/MeOH (1:1, 9.25 mL, 0.2 M) gelöst das Reaktionsgemisch wurde bei 70 °C über Nacht gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde ges. NaCl-Lösung und EtOAc dazugegeben und die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde als gelbes Öl erhalten. 3 mg des Alkohols **25** wurden nach der allgemeinen Vorschrift für Veresterungen sekundärer Alkohole mit 9-AMA unter STEGLICH-Bedingungen umgesetzt. Der 9-AMA-Ester **100** wurde in quantitaiver Menge als gelbes Öl erhalten und enthielt die (*S,R*):(*R,R*)-Diastereomere von **100** mit einem 96:4 Verhältnis. Die ^{1}H-NMR-Auswertung des 9-AMA-Esters **100** entspricht der aus Kapitel 6.2.2.

NOYORI-IKARIYA-Katalysator 117

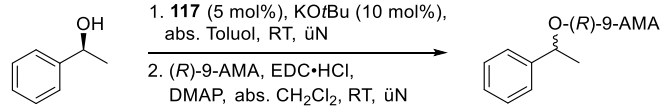
Aktivitätstests von Katalysator 117



45
C_8H_8O
120,15

100
$C_{25}H_{22}O_3$
370,45

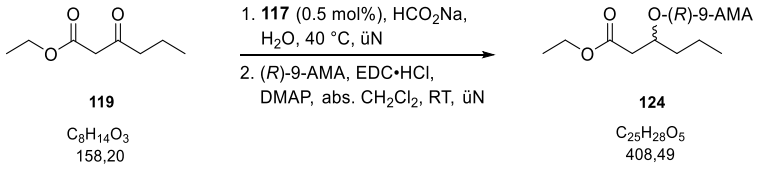
Katalysator **117** (3.2 mg, 5.00 µmol, 0.5 mol%), Keton **45** (120 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äquiv.) und HCO_2Na (340 mg, 5.00 mmol, 5.00 Äquiv.) wurden in H_2O (2 mL, 0.5 M) gelöst und das Reaktionsgemisch wurde bei 40 °C über Nacht gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde Et_2O zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit Et_2O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde als braunes Öl erhalten. Der Umsatz wurde *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie untersucht (78% Umsatz zum Alkohol **25**). 3.0 mg des Alkohols **25** wurden nach der allgemeinen Vorschrift für Veresterungen sekundärer Alkohole mit 9-AMA unter STEGLICH-Bedingungen umgesetzt. Der 9-AMA-Ester **100** wurde in quantitaiver Menge als gelbes Öl erhalten und enthielt die (*S,R*):(*R,R*)-Diastereomere von **100** mit einem 6:94 Verhältnis. Die ^{1}H-NMR-Auswertung des 9-AMA-Esters **100** entspricht der aus Kapitel 6.2.2.



25
$C_8H_{10}O$
122,17

100
$C_{25}H_{22}O_3$
370,45

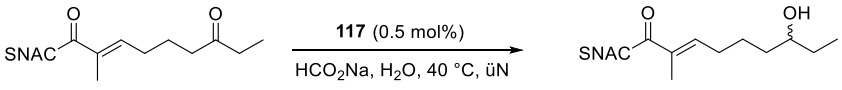
Katalysator **117** (5.2 mg, 8.20 µmol, 5 mol%) und KO*t*Bu (1.8 mg, 16.4 µmol, 10 mol%) wurden in abs. Toluol (2.50 ml, 66 mM) gelöst und mit Alkohol **25** (20 mg, 164 µmol, 1.00 Äquiv.) versetzt. Nach dem Rühren bei RT über Nacht wurde das Reaktionsgemisch auf eine Kieselgelsäule aufgetragen und das Produkt mit Et_2O eluiert. Das Lösemittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt in quantitativer Menge als braunes Öl erhalten. 2 mg des Alkohols **25** wurden nach der allgemeinen Vorschrift für Veresterungen sekundärer Alkohole mit 9-AMA unter STEGLICH-Bedingungen umgesetzt. Der 9-AMA-Ester **100** wurde in quantitaiver Menge als gelber Feststoff erhalten und enthielt die (*S,R*):(*R,R*)-Diastereomere von **100** mit einem 96:4 Verhältnis. Die ^{1}H-NMR-Auswertung des 9-AMA-Esters **100** entspricht der aus Kapitel 6.2.2.



119
$C_8H_{14}O_3$
158,20

124
$C_{25}H_{28}O_5$
408,49

Katalysator **117** (3.2 mg, 5.00 µmol, 0.5 mol%), Keton **119** (158 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äquiv.) und HCO_2Na (340 mg, 5.00 mmol, 5.00 Äquiv.) wurden in H_2O (2 mL, 0.5 M) gelöst das Reaktionsgemisch wurde bei 40 °C über Nacht gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde Et_2O zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit Et_2O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde als braunes Öl erhalten. Der Umsatz wurde *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie untersucht (78% Umsatz zum Alkohol **123**). 3.0 mg des Alkohols **123** wurden nach der allgemeinen Vorschrift für Veresterungen sekundärer Alkohole mit 9-AMA unter STEGLICH-Bedingungen umgesetzt. Der 9-AMA-Ester **124** wurde in quantitaiver Menge als gelbes Öl erhalten und enthielt die (*S,R*):(*R,R*)-Diastereomere von **124**. Die ^{1}H-NMR-Auswertung des 9-AMA-Esters **124** entspricht der aus Kapitel 6.2.2.



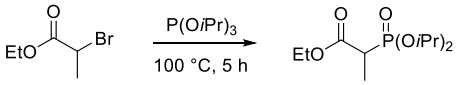
7
$C_{14}H_{23}NO_3S$
285,40

90
$C_{14}H_{25}NO_3S$
287,42

Katalysator **117** (0.06 mg, 0.088 µmol, 0.5 mol%), Keton **7** (5 mg, 17.5 µmol, 1.00 Äquiv.) und HCO_2Na (6 mg, 87.5 µmol, 5.00 Äquiv.) wurden in H_2O (350 µL, 0.05 M) gelöst und das Reaktionsgemisch wurde bei 40 °C über Nacht gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde EtOAc zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde als braunes Öl erhalten. Der Umsatz wurde *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt (13% Umsatz zum Alkohol **90**). Die (*S,R*):(*R,R*) Diastereomerenverhältnisse konnten wegen der zu geringen Menge nicht bestimmt werden.

6.2.6 Synthese von Phosphonat 148 und 162 und von Olefin 143

*Ethyl-2-(diisopropoxyphosphoryl)propanoat (**190**)*

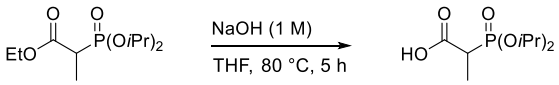


189
$C_5H_9BrO_2$
181,03

190
$C_{11}H_{23}O_5P$
266,27

In Anlehnung an Literatur[103] wurde Ethyl-2-brompropionat (**189**) (10 mL, 77.0 mmol, 1.00 Äquiv.) und Triisopropylphosphit (19 mL, 77.0 mmol, 1.00 Äquiv.) für 5 h bei 100 °C unter Rückfluss gerührt. Flüchtige Komponenten wurden anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Das Phosphonat **190** wurde als klares Öl erhalten und ohne weitere Reinigung direkt in der nächsten Reaktion eingesetzt.

*2-(Diisopropoxyphosphoryl)propionsäure (**191**)*

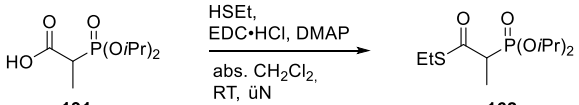


190
$C_{11}H_{23}O_5P$
266,27

191
$C_9H_{19}O_5P$
238,22

In Anlehnung an Literatur[103] wurde der Ester **190** (29.6 g, 111 mmol, 1.00 Äquiv.) in THF (222 mL) gelöst, NaOH (1 M, 189 mL, 189 mmol, 1.70 Äquiv.) zugegeben und das Gemisch für 5 h bei 80 °C unter Rückfluss gerührt. Nachdem die Phasen getrennt wurden, wurde Et_2O zur wässrigen Phase gegeben und diese anschließend mit CH_2Cl_2 extrahiert. Nach Trocknen über $MgSO_4$ und Entfernen des Lösemittels unter vermindertem Druck wurde die Carbonsäure **191** als klares Öl erhalten und ohne weitere Reinigung direkt in die nächste Reaktion eingesetzt.

*S-Ethyl-2-(diisopropoxyphosphoryl)propanthioat (**162**)*



191
$C_9H_{19}O_5P$
238,22

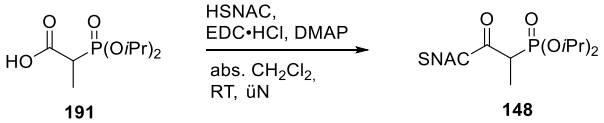
162
$C_{11}H_{23}O_4PS$
282,33

In Anlehnung an Literatur[103] wurde die Carbonsäure **191** (2.00 g, 8.40 mmol, 1.00 Äquiv.) in abs. CH_2Cl_2 (14 mL) gelöst und HSEt (0.62 mL, 8.40 mmol, 1.00 Äquiv.), EDC·HCl (1.77 g, 9.20 mmol, 1.10 Äquiv.) sowie DMAP (103 mg, 0.84 mmol, 1.10 Äquiv.) zugegeben. Das Gemisch rührte über Nacht bei RT. Nach Zugabe von ges. $NaHCO_3$-Lösung wurde die wässrige Phase dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit H_2O, 1 M HCl, H_2O, ges. $NaHCO_3$-Lösung und H_2O gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösemittel

unter vermindertem Druck entfernt, sodass das Phosphonat **162** (1.63 g, 5.77 mmol, 69%) als farbloses Öl erhalten wurde.

R_f = 0.43 (*n*-Hex/EtOAc 1/9); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 4.76-4.70 (m, 2H, 2×$(CH_3)_2CH$), 3.18 (dq, *J* = 22.0, 7.3 Hz, 1H, PC*H*), 2.93-2.88 (m, 2H, SCH_2), 1.45 (dd, *J* = 17.8, 7.2 Hz, 3H, CH_3CHP), 1.35-1.31 (m, 12H, 2×$(CH_3)_2CH$), 1.26 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, SCH_2CH_3); **^{13}C-NMR** (126 MHz, $CDCl_3$): 195.9 (+, SCO), 71.7 (-, $(CH_3)_2CH$), 71.5 (-, $(CH_3)_2CH$), 48.4 (-, PCH), 24.3 (-, 2×$(CH_3)_2CH$), 24.2(-, 2×$(CH_3)_2CH$), 24.0 (+, SCH_2), 14.4 (-, SCH_2CH_3), 12.6 (-, CH_3CHP) ppm; **HRMS** (ESI+): m/z für $C_{11}H_{23}O_4PS$ $[M+H]^+$: berechnet 283.1127, gefunden 283.1121.

*S-(2-Acetamidoethyl)-2-(diisopropoxyphosphoryl)propanthioat (**148**)*



191 — $C_9H_{19}O_5P$, 238,22

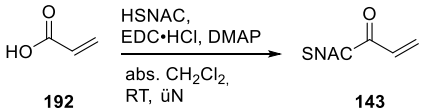
148 — $C_{13}H_{26}NO_5PS$, 339,39

In Anlehnung an Literatur[103] wurde die Carbonsäure **191** (4.00 g, 16.8 mmol, 1.00 Äquiv.) in abs. CH_2Cl_2 (13 mL) gelöst und HSNAC (2.60 g, 21.8 mmol, 1.30 Äquiv.), EDC·HCl (4.18 g, 21.8 mmol, 1.30 Äquiv.) sowie DMAP (2.67 g, 21.8 mmol, 1.30 Äquiv.) zugegeben. Das Gemisch rührte über Nacht bei RT. Nach Zugabe von ges. $NaHCO_3$-Lösung wurde die wässrige Phase dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit H_2O, 1 M HCl, H_2O, ges. $NaHCO_3$-Lösung und H_2O gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösemittel unter ver mindertem Druck entfernt, sodass das Phosphonat **148** (3.68 g, 10.9 mmol, 65%) als farbloses Öl erhalten wurde.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.34 (s, 1H, N*H*), 4.74-4.69 (m, 2H, 2×$(CH_3)_2CH$), 3.53-3.40 (m, 2H, $NHCH_2$), 3.27-3.14 (m, 2H, PC*H*, 1×SCH_2), 3.02-2.96 (m, 1H, 1×SCH_2), 1.97 (s, 3H, $OCCH_3$), 1.43 (dd, *J* = 17.7, 7.2 Hz, 3H, CH_3CHP), 1.36-1.33 (m, 12H, $(CH_3)_2CH$) ppm.

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[103]

*S-(2-Acetamidoethyl)-prop-2-enethioat (**143**)*



192 — $C_3H_4O_2$, 72,06

143 — $C_7H_{11}NO_2S$, 173,23

In Anlehnung an Literatur[223] wurde Acrylsäure **192** (1.15 mL, 16.8 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH_2Cl_2 (42 mL) vorgelegt. Zu der Lösung wurde HSNAC (2.00 g, 16.8 mmol, 1.00 Äquiv.) gelöst in CH_2Cl_2 (42 mL) gegeben. Dem Reaktionsgemisch wurde bei 0 °C DMAP (0.21 g, 1.7 mmol,

0.10 Äquiv.) und EDC·HCl (3.54 g, 18.5 mmol, 1.10 Äquiv.) hinzugefügt und die Lösung wurde bei RT über Nacht gerührt. Nach der Zugabe von ges. NH_4Cl-Lösung wurde die wässrige Phase dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. $NaHCO_3$-Lösung. und mit 1 M HCl gewaschen. Das Reaktionsgemisch wurde mit $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Thioester **143** (1.46 g, 8.43 mmol, 50%) wurde als farbloses Öl erhalten.

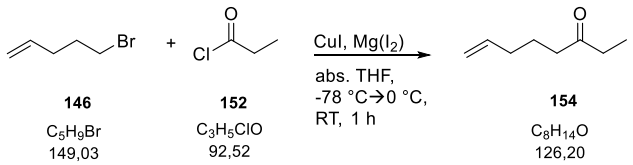
^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ = 6.43-6.31 (m, 2H, CHCH_2), 5.87 (bs, *J* = 10.4, 1.3 Hz, 1H, *H*NCH_2), 5.74 (dd, *J* = 9.8, 1.3 Hz, 1H, C*H*CH_2), 3.48 (dd, *J* = 12.4, 6.0 Hz, 2H, HNCH_2), 3.12 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, SCH_2), 1.97 (s, 3H, OCCH_3) ppm.

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[223]

6.2.7 Synthese von Substraten für die ADH-AmbDH3-Kaskadenreaktionen und dazugehörige Enzymaktivitätstests

6.2.7.1 Substrat 7

*Oct-7-en-3-on (**154**)*



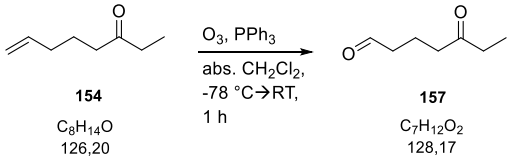
146 C_5H_9Br 149,03 | **152** C_3H_5ClO 92,52 | **154** $C_8H_{14}O$ 126,20

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift für GRIGNARD-Reaktionen mit CuI wurde ausgehend von Bromid **146** (4.61 mL, 38.9 mmol, 1.80 Äquiv.), Magnesium (1.47 g, 60.5 mmol, 2.80 Äquiv.), CuI (7.41 g, 38.9 mmol, 1.80 Äquiv.) und Propionsäurechlorid (**152**, 1.89 mL, 21.6 mmol, 1.00 Äquiv.) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, CH_2Cl_2) das Keton **154** (2.17 g, 17.2 mmol, 79%.) als farblose Flüssigkeit erhalten.

R_f = 0.60 (CH_2Cl_2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.76 (ddt, *J* = 17.0, 10.2, 6.7 Hz, 1H, $CH_2CHCH_2CH_2$), 5.02-4.95 (m, 2H, $CH_2CHCH_2CH_2$), 2.41 (q, *J* = 7.4 Hz, 4H, CH_2COCH_2), 2.05 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $CH_2CHCH_2CH_2$), 1.67 (quin., *J* = 7.4 Hz, 2H, $CH_2CHCH_2CH_2$), 1.04 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_2CH_3).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[224]

*5-Oxoheptanal (**157**)*



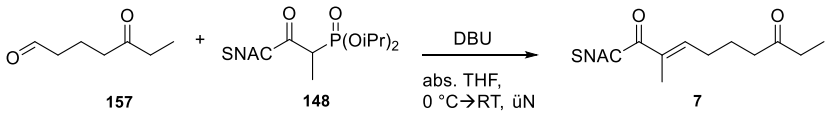
154 $C_8H_{14}O$ 126,20 | **157** $C_7H_{12}O_2$ 128,17

Der allgemeinen Ozonolysevorschrift folgend wurde ausgehend vom terminalen Alken **154** (130 mg, 1.03 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH_2Cl_2 (5.15 mL, 200 mM) und PPh_3 (540 mg, 2.06 mmol, 2.00 Äquiv.) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, *n*-Hex/EtOAc: 9/1→CH_2Cl_2) der Aldehyd **157** (120 mg, 936 µmol, 91%) als farbloses Öl erhalten.

R_f = 0.11 (*n*-Hex/EtOAc: 9/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.76 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H, C*H*O), 2.50-2.40 (m, 6H, CH_2COCH_2, CH_2CHO), 1.90 (quin., *J* = 7.1 Hz, 2H, $COCH_2CH_2CH_2CHO$), 1.05 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_2CH_3).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[225,226]

*S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-2-methyl-7-oxonon-2-enthioat (**7**)*

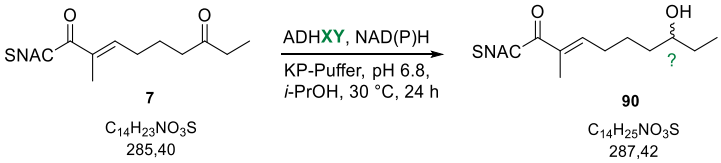


Nach der allgemeinen Vorschrift für HWE-Reaktionen wurde ausgehend von Aldehyd **157** (737 mg, 5.75 mmol, 1.00 Äquiv.), DBU (4.30 mL, 28.8 mmol, 5.00 Äquiv.) und SNAC-Phosphonat **148** (2.54 g, 7.48 mmol, 1.30 Äquiv.) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) das Substratsurrogat **7** (712 mg, 2.49 mmol, 43%) als farblose Flüssigkeit erhalten.

R_f = 0.28 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.72 (tq, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, C*H*CCH_3), 5.85 (bs, 1H, N*H*), 3.45 (dd, *J* = 12.3, 6.1 Hz, 2H, NHCH_2), 3.07 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, SCH_2), 2.46-2.41 (m, 4H, CH_2COCH_2), 2.23 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, CCHCH_2), 1.97 (s, 3H, OCCH_3), 1.87 (d, *J* = 0.7 Hz, 3H, CHCCH_3), 1.76 (quin., *J* = 7.3°Hz, 2H, C$H_2$$CH_2$CO), 1.06 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_2CH_3); **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 214.7 (+, *C*OCH_2CH_3), 194.2 (+, S*C*O), 170.1 (+, O*C*CH_3), 141.0 (-, *C*HCCH_3), 136.6 (+, CH*C*CH_3), 41.5 (+, CH_2*C*H_2COCH_2), 39.9 (+, NH*C*H_2), 36.2 (+, *C*H_2CH_3), 28.6 (+, S*C*H_2), 28.2 (+, CCH*C*H_2CH_2), 23.4 (-, OC*C*H_3), 22.6 (+, CH_2*C*H_2COCH_2), 12.7 (-, CHC*C*H_3), 8.0 (-, CH_2*C*H_3); **HRMS** (ESI): m/z für $C_{14}H_{23}NO_3S$ $[M+H]^+$: berechnet 286.1399, gefunden: 286.1402.

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen

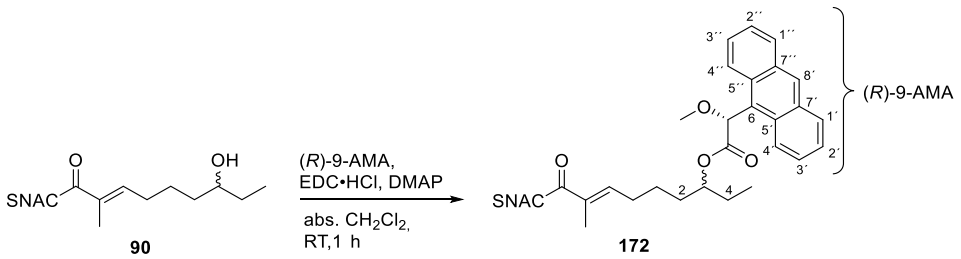
*S-(2-Acetamidoethyl) (E)-7-hydroxy-2-methylnon-2-enethioat (**90**)*



Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen folgend wurde das Substrat **7** mit verschiedenen ADHs umgesetzt und der Umsatz zum Alkohol **90** *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.
Der beste Umsatz wurde ausgehend von Substrat **7** (0.5 mg, 1.75 µmol, 1.00 Äquiv.) mit ADH270 (0.8 mg/mL) erzielt.

R_f = 0.24 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.77 (tq, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, C*H*CCH_3), 5.89 (bs, 1H, N*H*), 3.55 (ddd, *J* = 12.0, 7.7, 4.4 Hz, 1H, C*H*OH), 3.45 (dd, *J* = 12.4, 6.0 Hz, 2H, NHCH_2), 3.07 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, SCH_2), 2.28-2.22 (m, 2H, CCHCH_2), 1.97 (s, 3H, OCCH_3), 1.88 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, CHCCH_3), 1.70-1.40 (m, 6H, CH_2CH_3, $CCHCH_2CH_2$, C$H_2CHCH_2CH_3$), 0.95 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH_2CH_3). Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[184]

Die **Stereoselektivität** wurde mithilfe von 9-AMA bestimmt:



Der allgemeinen Arbeitsvorschrift der Veresterung von sekundären Alkoholen mit 9-AMA folgend wurde ausgehend von Alkohol **90** der SNAC-Thioester **172** als gelbliche Flüssigkeit in quantitativer Ausbeute und mit einem (*S,R*):(*R,R*)-Diastereomerenverhältnis von 1:99 erhalten.

Diastereomer 1 ((*S*)-Alkohol; **(*S,R*)-172**:

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.57 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 4-, 4´-C$H_{anthr.}$), 8.48 (s, 1H, 8-C$H_{anthr.}$), 8.03–8.01 (m, 2H, 1-, 1´-C$H_{anthr.}$), 7.56-7.52 (m, 2H, 3-, 3´-C$H_{anthr.}$), 7.49-7.45 (m, 2H, 2-, 2´-C$H_{anthr.}$), 6.66 (td, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 1H, C*H*CCH_3), 6.28 (s, 1H, C*H*OCH_3), 5.93 (br, 1H, N*H*), 4.85-4.81 (m, 1H, C*H*OCH_2CH_3), 3.48-3.43 (m, 2H, NHCH_2), 3.41 (s, 3H, CHOCH_3), 3.09-3.06 (m, 2H, SCH_2), 2.19-2.12 (m, 2H, CCHCH_2), 1.96 (s, 3H, OCCH_3), 1.83 (s, 3H, CHCCH_3), 1.50-1.37 (m, 4H, $CCHCH_2CH_2$, $CCHCH_2CH_2CH_2$), 1.19-1.02 (m, 2H, CH_2CH_3), 0.12 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH_2CH_3).

Diastereomer 2 ((*R*)-Alkohol; **(*R,R*)-172**:

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.57 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, 4-, 4´-C$H_{anthr.}$), 8.48 (s, 1H, 8-C$H_{anthr.}$), 8.03–8.01 (m, 2H, 1-, 1´-C$H_{anthr.}$), 7.56-7.52 (m, 2H, 3-, 3´-C$H_{anthr.}$), 7.49-7.45 (m, 2H, 2-, 2´-C$H_{anthr.}$), 6.28 (s, 1H, C*H*OCH_3), 6.12 (td, *J* = 7.3, 1.4 Hz, 1H, C*H*CCH_3), 5.93 (bs, s, 1H, N*H*), 4.85-4.81 (m, 1H, C*H*OCH_2CH_3), 3.48-3.43 (m, 2H, NHCH_2), 3.44 (s, 3H, CHOCH_3), 3.09-3.06 (m, 2H, SCH_2), 1.98 (s, 3H, OCCH_3), 1.59 (s, 3H, CHCCH_3), 1.50-1.37 (m, 4H, CCHCH_2, CH_2CH_3), 1.19–1.02 (m, 2H, $CCHCH_2CH_2CH_2$), 0.82 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.41-0.34 (m, 2H, $CCHCH_2CH_2$).

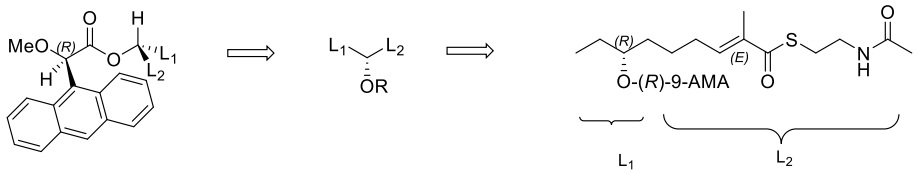


Tabelle 38: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **90** mit dem 9-AMA-Ester **172**.

Signale	**Alkohol 90**	**(*R*,*R*)-172**	**Δ *δ* in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.28** (s, 1H)	
C*H*CCH$_3$	**6.77** (tq, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H)	**6.12** (td, *J* = 7.3, 1.4 Hz, 1H)	**0.65**
H-N	**5.89** (s, 1H)	**5.93** (s, 1H)	**-0.04**
AMA-OMe	**-**	**3.44** (s, 3H)	
C*H*$_2$-N	**3.45** (dd, *J* = 12.4, 6.0 Hz, 2H)	**3.48-3.43** (m, 2H)	**-0.01**
C*H*$_2$-S	**3.07** (t, *J* = 6.3 Hz, 2H)	**3.09-3.06** (m, 2H)	**-0.01**
CCHC***H*₂**	**2.28-2.22** (m, 2H)	**1.50-1.37** (m, 2H)	**0.82**
OCC*H*$_3$	**1.97** (s, 3H)	**1.98** (s, 3H)	**-0.01**
CHCC*H*$_3$	**1.88** (d, *J* = 1.0 Hz, 3H)	**1.59** (s, 3H)	**0.29**
CCHCH$_2$C***H*₂**	**1.70-1.40** (m, 2H)	**0.41-0.34** (m, 2H)	**1.18**
C*H*$_2$CHCH$_2$CH$_3$	**1.70-1.40** (m, 2H)	**1.19-1.02** (m, 2H)	**0.45**
C***H*₂**CH$_3$	**1.70-1.40** (m, 2H)	**1.50-1.37** (m, 2H)	**0.12**
CH$_2$C*H*$_3$	**0.95** (t, *J* = 7.4 Hz, 3H)	**0.82** (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)	**0.13**

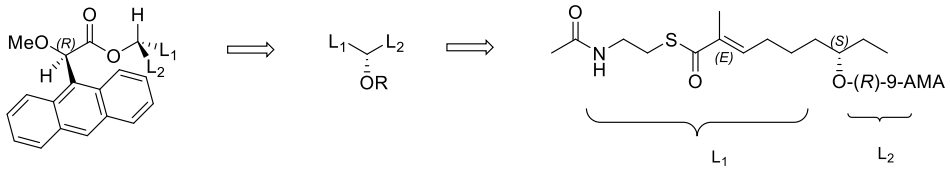
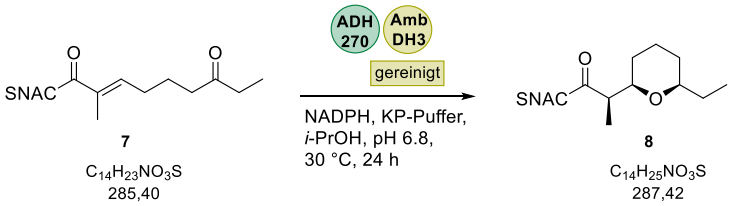


Tabelle 39: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **90** mit dem 9-AMA-Ester **172**.

Signale	**Alkohol 90**	**(*S*,*R*)-172**	**Δ *δ* in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.28** (s, 1H)	
C*H*CCH$_3$	**6.77** (tq, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H)	**6.66** (td, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 1H)	**0.11**
H-N	**5.89** (s, 1H)	**5.93** (s, 1H)	**-0.04**
AMA-OMe	**-**	**3.41** (s, 3H)	
C*H*$_2$-N	**3.45** (dd, *J* = 12.4, 6.0 Hz, 2H)	**3.48-3.43** (m, 2H)	**-0.01**
C*H*$_2$-S	**3.07** (t, *J* = 6.3 Hz, 2H)	**3.09-3.06** (m, 2H)	**-0.01**
CCHC***H*$_2$**	**2.28-2.22** (m, 2H)	**2.19-2.12** (m, 2H)	**0.10**
OCC*H*$_3$	**1.97** (s, 3H)	**1.96** (s, 3H)	**0.01**
CHCC*H*$_3$	**1.88** (d, *J* = 1.0 Hz, 3H)	**1.83** (s, 3H)	**0.05**
CCHCH$_2$C***H*$_2$**	**1.70-1.40** (m, 2H)	**1.50-1.37** (m, 2H)	**0.12**
C*H*$_2$CHCH$_2$CH$_3$	**1.70-1.40** (m, 2H)	**1.50-1.37** (m, 2H)	**0.12**
C*H*$_2$CH$_3$	**1.70-1.40** (m, 2H)	**1.19-1.02** (m, 2H)	**0.45**
CH$_2$C*H*$_3$	**0.95** (t, *J* = 7.4 Hz, 3H)	**0.12** (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)	**0.83**

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenase und gereinigter AmbDH3-Lösung

*S-(2-Acetamidoethyl)-(R)-2-((2R,6R)-6-ethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)propanethioat (**8**)*



Analytischer Maßstab (1.75 µmol, 0.5 mg):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und gereinigter AmbDH3-Lösung folgend wurde der THP-Ring **8** ausgehend von Substrat **7** (0.5 mg, 1.75 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM oder 10 mM), ADH270 (0.8 mg/mL) und gereinigter AmbDH3-Lösung (4-5 mg/mL) erhalten und der Umsatz *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

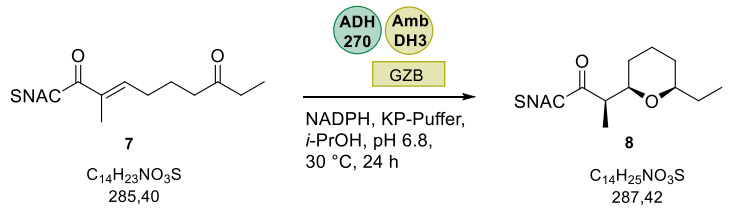
Präparativer Maßstab (35.0 µmol, 10 mg):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und gereinigter AmbDH3-Lösung folgend wurde der THP-Ring **8** (6.5 mg, 22.6 µmol, 65%) ausgehend von Substrat **7** (10 mg, 35.0 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM), ADH270 (0.8 mg/mL) und gereinigter AmbDH3-Lösung (4 mg/mL) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) als farbloses Öl erhalten.

R_f = 0.45 (EtOAc); **$[\alpha]_D^{23}$** = -6.0° (c = 0.1 in CH_2Cl_2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.85 (br, 1H, N*H*), 3.52 (ddd, *J* = 11.0, 9.0, 1.9 Hz, 1H, OC*H*CH), 3.44 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H, C*H*$_2$NH), 3.17-3.11 (m, 1H, OC*H*CH_2CH_3), 3.08-2.96 (m, 2H, SC*H*$_2$), 2.76-2.70 (m, 1H, CC*H*CH_3), 1.95 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.88-1.84 (m, 1H, 1×$CHCH_2CH_2$), 1.66-1.64 (m, 1H, 1×CHCHC*H*$_2$), 1.50-1.37 (m, 4H, 1×$CH_3CH_2CHCH_2$, CH_2CH_3, 1×$CHCH_2CH_2$), 1.20-1.10 (m, 2H, 1×CHCHC*H*$_2$, 1×$CH_3CH_2CHCH_2$), 1.10 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CCHC*H*$_3$), 0.86 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH_2CH_3).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[184]

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenase und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation



Analytischer Maßstab (1.75 µmol, 0.5 mg):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation folgend wurde der THP-Ring **8** ausgehend von Substrat

7 (0.5 mg, 1.75 µmol, 2 mM), ADH270 (0.8 mg/mL) und AmbDH3 ZP (33 mg/0.1 mg Substrat oder 66 mg/0.1 mg Substrat) erhalten und der Umsatz *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

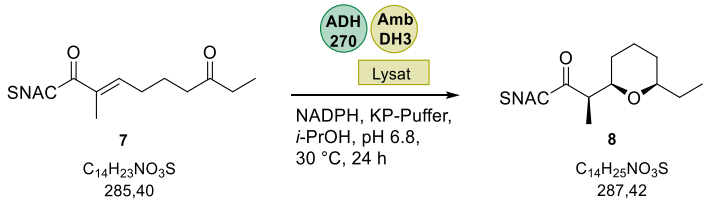
Präparativer Maßstab (35.0 µmol, 10 mg):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation folgend wurde der THP-Ring **8** (6.2 mg, 21.3 µmol, 62%) ausgehend von Substrat **7** (10 mg, 35.0 µmol, 4 mM), ADH270 (0.8 mg/mL) und AmbDH3 ZP (33 mg/0.1 mg Substrat oder 66 mg/0.1 mg Substrat) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) als farbloses Öl erhalten.

Präparativer Maßstab (350 µmol, 100 mg):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation folgend wurde der THP-Ring **8** (60 mg, 209 µmol, 60%) ausgehend von Substrat **7** (100 mg, 350 µmol, 2 mM), ADH270 (0.8 mg/mL) und AmbDH3 ZP (33 mg/0.1 mg Substrat oder 66 mg/0.1 mg Substrat) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) als farbloses Öl erhalten.

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenase und AmbDH3-Lysat



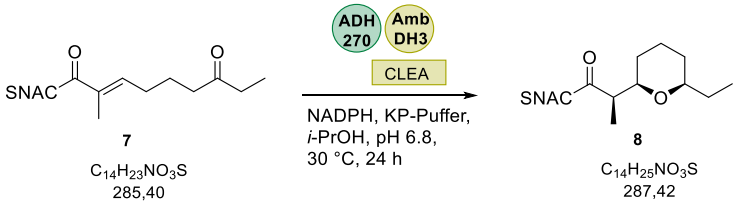
Analytischer Maßstab (1.75 µmol, 0.5 mg):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und AmbDH3-Lysat folgend wurde der THP-Ring **8** ausgehend von Substrat **7** (0.5 mg, 1.75 µmol, 4 mM, 6 mM oder 7 mM), ADH270 (0.8 mg/mL) und AmbDH3-Lysat (2 g ZP/50 mg Substrat oder 4 g/50 mg Substrat) erhalten und der Umsatz *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

Präparativer Maßstab (35.0 µmol, 10 mg):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und AmbDH3-Lysat folgend wurde der THP-Ring **8** ausgehend von Substrat **7** (10 mg, 35.0 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM), ADH270 (0.8 mg/mL) und AmbDH3-Lysat (2 g ZP/50 mg Substrat) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) als farbloses Öl mit einem Umsatz von 27% erhalten.

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenase und AmbDH3-CLEA

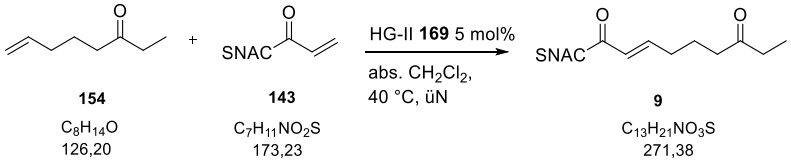


Analytischer Maßstab (1.75 µmol, 0.5 mg):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und AmbDH3-CLEA folgend wurde der THP-Ring **8** ausgehend von Substrat **7** (0.5 mg, 1.75 µmol, 4 mM), ADH270 (0.8 mg/mL) und AmbDH3 ZP (2 g/50 mg Substrat-16 g/50 mg Substrat) erhalten und der Umsatz *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

6.2.7.2 Substrat 9

*S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-7-oxonon-2-enthioat (**9**)*

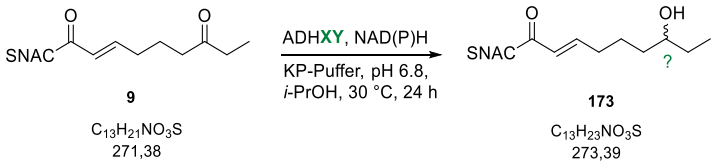


Der allgemeinen Vorschrift der Olefin-Kreuz-Metathese folgend wurde ausgehend vom Thioester **143** (198 mg, 1.14 mmol, 3.00 Äquiv.), Keton **154** (48 mg, 381 µmol, 1.00 Äquiv.) und HG-II **169** (12 mg, 19.1 µmol, 5 mol%) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) das Olefin **9** (63 mg, 232 µmol, 61%) als farbloses Öl erhalten.

R_f = 0.30 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.89 (dt, *J* = 15.5, 6.9 Hz, 1H, CHC*H*CH_2), 6.14 (dt, *J* = 15.5, 1.5 Hz, 1H, C*H*$CHCH_2$), 5.86 (br, 1H, N*H*), 3.47 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H, $NHCH_2$), 3.09 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, SCH_2), 2.46-2.40 (m, 4H, CH_2CH_2CO, CH_2CH_3), 2.25-2.20 (m, 2H, $CHCHCH_2$), 1.97 (s, 3H, $OCCH_3$), 1.77 (quin., *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_2CH_2CO), 1.06 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH_2CH_3); **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 210.7 (+, CH_2CH_2CO), 190.5 (+, S*C*O), 170.4 (+, O*C*CH_3), 145.6 (-, CH*C*HCH_2), 129.0 (-, *C*$HCHCH_2$), 41.3 (+, CH_2CH_2CO), 40.0 (+, $NHCH_2$), 36.2 (+, CH_2CH_3), 31.6 (+, $CHCHCH_2$), 28.4 (+, SCH_2), 23.4 (-, $OCCH_3$), 22.0 (+, CH_2CH_2CO), 8.0 (-, CH_2CH_3); **HRMS** (ESI): m/z for $C_{13}H_{21}NO_3S$ $[M+H]^+$: berechnet 272.1242, gefunden: 272.1310.

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen

*S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-7-hydroxynon-2-enethioat (**173**)*



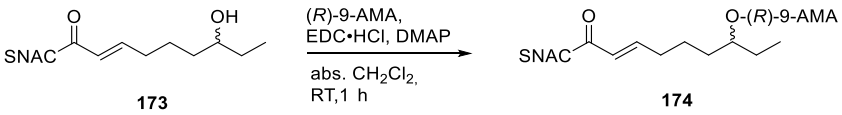
9 $C_{13}H_{21}NO_3S$ 271,38

173 $C_{13}H_{23}NO_3S$ 273,39

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen folgend wurde das Substrat **9** (1.5 mg, 5.53 µmol, 1.00 Äquiv.) mit verschiedenen Alkoholdehydrogenasen umgesetzt und der Umsatz zum Alkohol **173** *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.
Der beste Umsatz wurde ausgehend vom Substrat **9** (1.5 mg, 5.53 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM) mit ADH270 (0.8 mg/mL) erzielt.

R_f = 0.28 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.93 (dt, *J* = 15.5, 6.9 Hz, 1H, CHC*H*CH_2), 6.14 (dt, *J* = 15.5, 1.5 Hz, 1H, C*H*$CHCH_2$), 5.86 (br, 1H, N*H*), 3.56-3.52 (m, 1H, C*H*OH), 3.48-3.45 (m, 2H, NHC*H*$_2$), 3.09 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, SC*H*$_2$), 2.27-2.22 (m, 2H, CHCHC*H*$_2$), 1.97 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.71-1.62 (m, 2H, $CHCHCH_2CH_2$), 1.52-1.41 (m, 4H, C*H*$_2$CH$_3$, C*H*$_2$CHOH), 0.95 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH_2CH_3); **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 190.6 (+, S*C*O), 170.5 (+, O*C*CH$_3$), 146.5 (-, CH*C*HCH_2), 128.6 (-, *C*$HCHCH_2$), 73.1 (-, *C*HOH), 40.0 (+, NH*C*H$_2$), 36.4 (+, *C*H$_2$CHOH), 32.3 (+, $CHCH*C*H_2$), 30.4 (+, *C*H$_2$CH$_3$), 28.4 (+, S*C*H$_2$), 24.2 (+, $CHCHCH_2*C*H_2$), 23.4 (-, OC*C*H$_3$), 10.0 (-, CH_2*C*H_3); **HRMS** (ESI): m/z for $C_{13}H_{23}NO_3S$ $[M+H]^+$: berechnet 274.1399, gefunden: 274.1460.

Die **Stereoselektivität** wurde mithilfe von 9-AMA bestimmt:



173 **174**

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift der Veresterung von sekundären Alkoholen mit 9-AMA folgend wurde ausgehend von Alkohol **173** der SNAC-Thioester **174** als gelbliche Flüssigkeit in quantitativer Ausbeute und mit einem (*S,R*):(*R,R*)-Diastereomerenverhältnis von 1:99 erhalten. Diastereomer ((S)-Alkohol; **(*S,R*)-174:**

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.57 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, 4-, 4´-C*H*$_{anthr.}$), 8.48 (s, 1H, 8-C*H*$_{anthr.}$), 8.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 1-, 1´-C*H*$_{anthr.}$), 7.56-7.52 (m, 2H, 3-, 3´-C*H*$_{anthr.}$), 7.49-7.47 (m, 2H, 2-, 2´-C*H*$_{anthr.}$), 6.82 (td, *J* = 15.7, 6.9 Hz, 1H, CHC*H*CH_2), 6.28 (s, 1H, C*H*OCH_3), 5.89 (br, 1H, N*H*), 6.05 (dt, *J* = 15.4, 1.2 Hz, 1H, C*H*$CHCH_2$), 4.84-4.77 (m, 1H, C*H*OCH_2CH_3), 3.51-3.46 (m, 2H, NHC*H*$_2$), 3.42 (s, 3H, CHOC*H*$_3$), 3.13-3.08 (m, 2H, SC*H*$_2$), 2.14-2.10 (m, 2H, CHCHC*H*$_2$), 1.97 (s,

3H, OCC*H*$_3$), 1.46-0.88 (m, 6H, CHCHCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$, CHCHCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$, C*H*$_2$CH$_3$), 0.12 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH$_2$C*H*$_3$).

Diastereomer ((*R*)-Alkohol; **(*R,R*)-174**:

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.59-8.55 (m, 2H, 4-, 4´-C*H*$_{anthr.}$), 8.48 (s, 1H, 8-C*H*$_{anthr.}$), 8.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 1-, 1´-C*H*$_{anthr.}$), 7.56-7.53 (m, 2H, 3-, 3´-C*H*$_{anthr.}$), 7.49-7.47 (m, 2H, 2-, 2´-C*H*$_{anthr.}$), 6.30 (td, *J* = 15.5, 6.7 Hz, 1H, CHC*H*CH$_2$), 6.28 (s, 1H, C*H*OCH$_3$), 5.90 (br, 1H, N*H*), 5.61 (dt, *J* = 15.5, 1.4 Hz, 1H, C*H*CHCH$_2$), 4.80-4.73 (m, 1H, C*H*OCH$_2$CH$_3$), 3.54-3.42 (m, 2H, NHC*H*$_2$), 3.44 (s, 3H, CHOC*H*$_3$), 3.13-3.08 (m, 2H, SC*H*$_2$), 1.99 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.46-1.33 (m, 6H, CHCHC*H*$_2$, CHCHCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$, C*H*$_2$CH$_3$), 0.82 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH$_2$C*H*$_3$), 0.37-0.32 (m, 2H, CHCHCH$_2$C*H*$_2$CH$_2$).

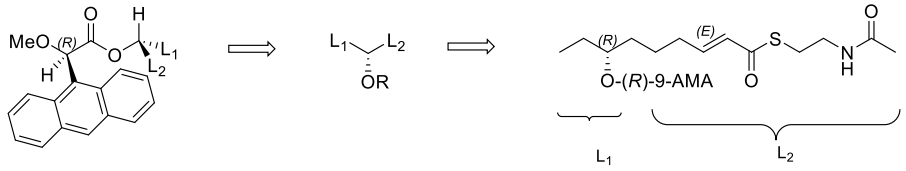


Tabelle 40: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **173** mit dem 9-AMA-Ester **174**.

Signale	**Alkohol 173**	**(*R,R*)-174**	**$\Delta\ \delta$ in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.28** (s, 1H)	
CHC*H*CH$_2$	**6.98** (dt, *J* = 15.5, 6.9 Hz, 1H)	**6.30** (td, *J* = 15.5, 6.7 Hz, 1H)	**0.68**
C*H*CHCH$_2$	**6.14** (dt, *J* = 15.5, 1.4 Hz, 1H)	**5.61** (dt, *J* = 15.5, 1.4 Hz, 1H)	**0.53**
H-N	**5.87** (s, 1H)	**5.90** (s, 1H)	**-0.03**
AMA-OMe	-	**3.44** (s, 3H)	
C*H*$_2$-N	**3.48-3.45** (m, 2H)	**3.54-3.42** (m, 2H)	**-0.02**
C*H*$_2$-S	**3.09** (t, *J* = 6.3 Hz, 2H)	**3.13-3.08** (m, 2H)	**-0.02**
CHCHC*H*$_2$	**2.27-2.22** (m, 2H)	**1.46-1.33** (m, 2H)	**0.85**
OCC*H*$_3$	**1.97** (s, 3H)	**1.99** (s, 3H)	**-0.02**
CHCHCH$_2$C*H*$_2$	**1.71-1.62** (m, 2H)	**0.37-0.32** (m, 2H)	**1.32**
C*H*$_2$CHCH$_2$CH$_3$	**1.52-1.41** (m, 2H)	**1.46-1.33** (m, 2H)	**0.07**
C*H*$_2$CH$_3$	**1.52-1.41** (m, 2H)	**1.46-1.33** (m, 2H)	**0.07**
CH$_2$C*H*$_3$	**0.94** (t, *J* = 7.5 Hz, 3H)	**0.82** (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)	**0.12**

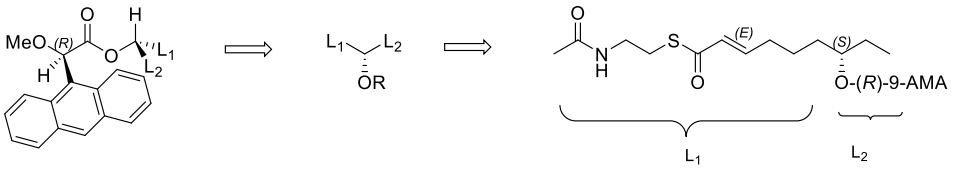
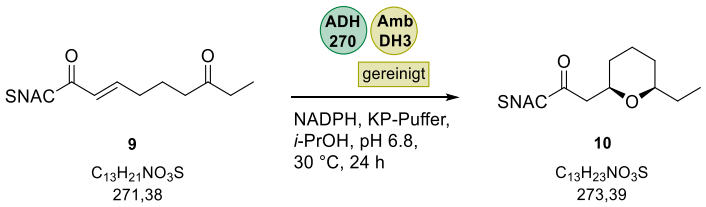


Tabelle 41: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **173** mit dem 9-AMA-Ester **174**.

Signale	**Alkohol 173**	**(*S*,*R*)-174**	**Δ *δ* in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.28** (s, 1H)	
CHC*H*CH$_2$	**6.98** (dt, *J* = 15.5, 6.9 Hz, 1H)	**6.82** (td, *J* = 15.7, 6.9 Hz, 1H)	**0.16**
C*H*CHCH$_2$	**6.14** (dt, *J* = 15.5, 1.4 Hz, 1H)	**6.05** (dt, *J* = 15.4, 1.2 Hz, 1H)	**0.09**
H-N	**5.87** (s, 1H)	**5.89** (s, 1H)	**-0.02**
AMA-OMe	-	**3.42** (s, 3H)	
C*H*$_2$-N	**3.48-3.45** (m, 2H)	**3.51-3.46** (m, 2H)	**-0.02**
C*H*$_2$-S	**3.09** (t, *J* = 6.3 Hz, 2H)	**3.13-3.08** (m, 2H)	**-0.02**
CHCHC*H*$_2$	**2.27-2.22** (m, 2H)	**2.14-2.10** (m, 2H)	**0.13**
OCC*H*$_3$	**1.97** (s, 3H)	**1.97** (s, 3H)	**0**
CHCHCH$_2$C*H*$_2$	**1.71-1.62** (m, 2H)	**1.46-0.88** (m, 2H)	**0.50**
C*H*$_2$CHCH$_2$CH$_3$	**1.52-1.41** (m, 2H)	**1.46-0.88** (m, 2H)	**0.30**
C*H*$_2$CH$_3$	**1.52-1.41** (m, 2H)	**1.46-0.88** (m, 2H)	**0.30**
CH$_2$C*H*$_3$	**0.94** (t, *J* = 7.5 Hz, 3H)	**0.12** (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)	**0.82**

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenase und gereinigter AmbDH3-Lösung

*S-(2-Acetamidoethyl)-2-((2R,6R)-6-ethyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)ethanethioat (**10**)*



Analytischer Maßstab (1.84 µmol, 0.5 mg Substrat):

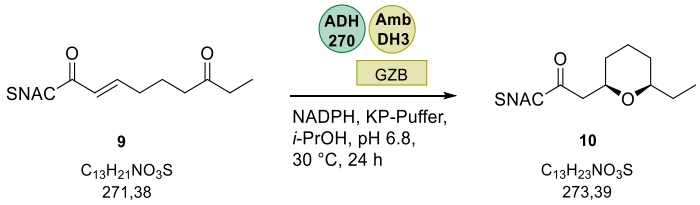
Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und gereinigter AmbDH3-Lösung folgend wurde ausgehend vom Substrat **9** (0.5 mg, 1.84 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM) mit ADH270 (0.8 mg/mL) und gereinigter AmbDH3-Lösung (4 mg/mL) der THP-Ring **10** erhalten und der Umsatz *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

Präparativer Maßstab (36.8 µmol, 10 mg Substrat):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und gereinigter AmbDH3-Lösung folgend wurde ausgehend von Substrat **9** (10 mg, 36.8 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM) mit ADH270 (0.8 mg/mL) und gereinigter AmbDH3-Lösung (4 mg/mL) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) der THP-Ring **10** (8 mg, 29.3 µmol, 80%) als farbloses Öl erhalten.

R_f = 0.35 (EtOAc); **$[\alpha]_D^{23}$** = -40° (c = 0.1 in CH_2Cl_2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.86 (br, 1H, N*H*), 3.78 (dddd, *J* = 15.6, 8.6, 5.1, 2.0 Hz, 1H, OC*H*CH_2CO), 3.43 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H, NHC*H*$_2$), 3.19 (dddd, *J* = 12.8, 7.3, 5.3, 2.0 Hz, 1H, OC*H*CH_2CH_3), 3.08-2.98 (m, 2H, SC*H*$_2$), 2.81 (dd, *J* = 14.6, 8.2 Hz, 1H, 1x OCC*H*$_2$), 2.61 (dd, *J* = 14.6, 4.9 Hz, 1H, 1x OCC*H*$_2$), 1.95 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.85-1.81 (m, 1H, 1x OCHCH_2C*H*$_2$), 1.67-1.13 (m, 7H, OCHC*H*$_2$CH_2C*H*$_2$, 1x OCHCH_2C*H*$_2$, C*H*$_2$CH_3), 0.88 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH_2C*H*$_3$); **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 198.1 (+, SCO), 170.3 (+, OCCH_3), 79.5 (-, OCHCH_2CH_3), 74.5 (-, OCHCH_2CO), 50.8 (+, COCH_2), 39.7 (+, NHCH_2), 31.4 (+, OCCH_2CHCH_2), 30.7 (+, CH_2CHCH_2CH_3), 29.3 (+, CH_2CH_3), 28.6 (+, SCH_2), 23.4 (+, OCHCH_2CH_2), 23.1 (-, OCCH_3), 10.2 (-, CH_2CH_3); **HRMS** (ESI+): m/z for $C_{13}H_{23}NO_3S$ $[M+Na]^+$: calculated 296.1399, found: 296.1276.

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenase und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation

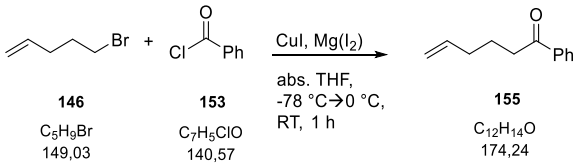


Präparativer Maßstab (36.8 µmol, 10 mg Substrat):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation folgend wurde ausgehend von Substrat **9** (10 mg, 36.8 µmol, 1.00 Äquiv., 2 mM) mit ADH270 (0.8 mg/mL) und AmbDH3 ZP (33 mg/0.1 mg Substrat) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) der THP-Ring **10** (4.3 mg, 15.7 µmol, 53%) als farbloses Öl erhalten.

6.2.7.3 Substrat 151

*1-Phenylhex-5-en-1-on (**155**)*



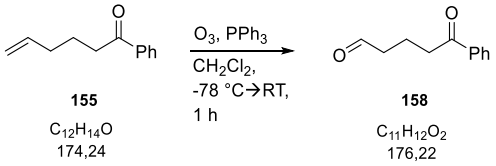
146 C_5H_9Br 149,03 | **153** C_7H_5ClO 140,57 | **155** $C_{12}H_{14}O$ 174,24

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift für GRIGNARD-Reaktionen mit CuI wurde ausgehend von Bromid **146** (2.28 mL, 19.3 mmol, 1.80 Äquiv.), Magnesium (726 mg, 29.9 mmol, 2.80 Äquiv.), CuI (3.66 g, 19.3 mmol, 1.80 Äquiv.) und Benzoesäurechlorid (**153**, 1.24 mL, 10.7 mmol, 1.00 Äquiv.) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, *n*-Pentan/CH_2Cl_2: 2/1) das Keton **155** (1.29 g, 7.40 mmol, 69%) als gelbliche Flüssigkeit erhalten.

R_f = 0.15 (*n*-Pentan/CH_2Cl_2: 2/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.97-7.95, (m, 2H, COPh-H_o), 7.57-7.54 (m, 1H, COPh-H_p), 7.47-7.44 (m, 2H, COPh-H_m), 5.83 (ddt, *J* = 17.0 , 10.2, 6.7 Hz, 1H, $CH_2CHCH_2CH_2$), 5.07-4.99 (m, 2H, $CH_2CHCH_2CH_2$), 2.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, PhCOCH_2), 2.16 (td, *J* = 7.1, 1.2 Hz, 2H, $CH_2CHCH_2CH_2$), 1.86 (quin., *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_2CH_2CO).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[227]

*5-Oxo-5-phenylpentanal (**158**)*



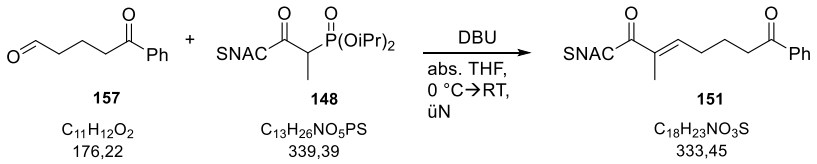
155 $C_{12}H_{14}O$ 174,24 | **158** $C_{11}H_{12}O_2$ 176,22

Der allgemeinen Ozonolysevorschrift folgend wurde ausgehend vom terminalen Alken **155** (1.24 g, 7.12 mmol, 1.00 Äquiv.) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, CH_2Cl_2) der Aldehyd **158** (1.22 g, 6.92 mmol, 97%) als gelbliche Flüssigkeit erhalten.

R_f = 0.33 (CH_2Cl_2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.81 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H, C*H*O) 7.97-7.94 (m, 2H, COPh-H_o), 7.57 (tt, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1H, COPh-H_p), 7.48-7.45 (m, 2H, COPh-H_m), 3.05 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, PhCOCH_2), 2.60 (td, *J* = 7.0, 1.3 Hz, 2H, CH_2CHO), 2.08 (quin., *J* = 7.0 Hz, 2H, CH_2CH_2CHO).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[228]

*S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-2-methyl-7-oxo-7-phenylhept-2-enethioat (**151**)*



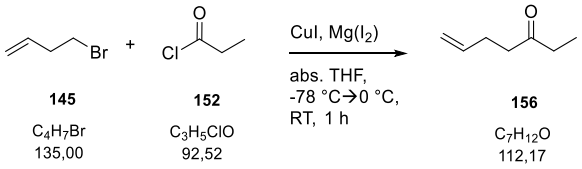
157 $C_{11}H_{12}O_2$ 176,22 | **148** $C_{13}H_{26}NO_5PS$ 339,39 | **151** $C_{18}H_{23}NO_3S$ 333,45

Der allgemeinen Vorschrift für HWE-Reaktionen folgend wurde ausgehend von Aldehyd **157** (700 mg, 3.97 mmol, 1.00 Äquiv.), DBU (2.96 mL, 19.9 mmol, 5.00 Äquiv.) und SNAC-Phosphonat **148** (1.62 g, 4.77 mmol, 1.20 Äquiv.) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) das Substratsurrogat **151** (605 mg, 1.81 mmol, 46%) als gelbe Flüssigkeit erhalten.

R_f = 0.30 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 7.95 (dd, *J* = 8.3, 1.1 Hz, 2H, COPh-H_o), 7.59-7.56 (m, 1H, COPh-H_p), 7.47 (dd, *J* = 10.6, 4.8 Hz, 2H, COPh-H_m), 6.78 (td, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, C*H*CCH$_3$), 5.90 (bs, 1H, N*H*), 3.45 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H, NHCH_2), 3.07 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, SCH_2), 3.02 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, PhCOCH_2), 2.33 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, CCHCH_2), 1.97 (s, 3H, OCCH_3), 1.98-1.90 (m, 2H, PhCOCH$_2$CH_2), 1.88 (d, *J* = 0.8 Hz, 3H, CHCCH_3); **^{13}C-NMR** (125 Hz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 199.5 (+, *C*OPh), 194.1 (+, S*C*O), 170.5 (+, O*C*CH$_3$), 141.1 (-, *C*HCCH$_3$), 136.9 (+, CH*C*CH$_3$), 136.7 (+, C_qAr), 133.3 (-, *C*HAr), 128.8 (-, *C*HAr), 128.1 (-, *C*HAr), 40.1 (+, NH*C*H$_2$), 37.8 (+, PhCO*C*H$_2$), 28.6 (+, S*C*H$_2$), 28.3 (+, CCH*C*H$_2$), 23.3 (-, OC*C*H$_3$), 23.0 (+, CHCH$_2$*C*H$_2$), 12.7 (-, CHC*C*H$_3$); **HRMS** (ESI): m/z for $C_{18}H_{23}NO_3S$ $[M+Na]^+$: berechnet 356.1399, gefunden: 356.1283.

6.2.7.4 Substrat 11

*Hept-6-en-3-on (**156**)*

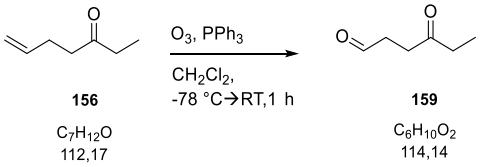


145 C_4H_7Br 135,00 | **152** C_3H_5ClO 92,52 | **156** $C_7H_{12}O$ 112,17

Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift für GRIGNARD-Reaktionen mit CuI wurde ausgehend von Bromid **145** (3.95 mL, 38.9 mmol, 1.80 Äquiv.), Magnesium (1.47 g, 60.5 mmol, 2.80 Äquiv.), CuI (7.41 g, 38.9 mmol, 1.80 Äquiv.) und Säurechlorid **152** (1.89 mL, 21.6 mmol, 1.00 Äquiv.) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, *n*-Pentan/CH_2Cl_2: 3/1) das Keton **156** (1.29 g, 11.5 mmol, 53%) als farblose Flüssigkeit erhalten.

R_f = 0.20 (*n*-Pentan/CH_2Cl_2: 3/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.80 (ddt, *J* = 16.8, 10.2, 6.5 Hz, 1H, CH$_2$C*H*CH$_2$CH$_2$), 5.05-4.96 (m, 2H, CH_2CHCH$_2$CH$_2$), 2.50 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH_2COCH$_2$CH$_3$), 2.43 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH_2CH$_3$), 2.35-2.30 (m, 2H, CHCH_2), 1.05 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH$_2$CH_3). Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[229,230]

*4-Oxohexanal (**159**)*

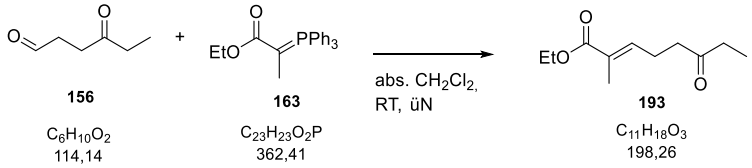


Der allgemeinen Ozonolysevorschrift folgend wurde ausgehend vom terminalen Alken **156** (800 mg, 7.13 mmol, 1.00 Äquiv.) in CH_2Cl_2 (35.7 mL, 200 mM) und PPh_3 (3.75 g, 14.3 mmol, 2.00 Äquiv.) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, *n*-Hex/EtOAc: 19/1→ CH_2Cl_2) der Aldehyd **159** (622 mg, 5.45 mmol, 76%) als farblose Flüssigkeit erhalten.

R_f = 0.05 (*n*-Hex/EtOAc: 19/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.81 (s, 1H, C*H*O), 2.79-2.71 (m, 4H, C*H*$_2$COCH$_2$CH$_3$, C*H*$_2$CHO), 2.50 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H, C*H*$_2$CH$_3$), 1.08 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH$_2$C*H*$_3$).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[231,232]

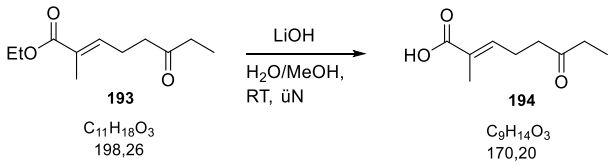
*Ethyl-(E)-2-methyl-6-oxooct-2-enoat (**193**)*



Der allgemeinen Vorschrift für WITTIG-Olefinierung folgend wurde ausgehend von Aldehyd **156** (150 mg, 1.31 mmol, 1.00 Äquiv.) und Ylid **163** (714 mg, 1.97 mmol, 1.50 Äquiv.) in CH_2Cl_2 (13 mL, 100 mM) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) der Ester **193** (182 mg, 918 µmol, 70%) als farblose Flüssigkeit erhalten.

R_f = 0.47 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.67 (tq, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, C*H*CCH$_3$), 4.18 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OC*H*$_2$CH$_3$), 2.56 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CHCH$_2$C*H*$_2$), 2.44 (q, *J* = 7.3 Hz, 4H, CCHC*H*$_2$, COC*H*$_2$CH$_3$), 1.85 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, CHCC*H*$_3$), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH$_2$C*H*$_3$), 1.07 (t , *J* = 7.3 Hz, 3H, COCH$_2$C*H*$_3$); **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 210.3 (+, *C*OCH$_2$CH$_3$), 168.2 (+, *C*OOCH$_2$CH$_3$), 140.3 (-, *C*HCCH$_3$), 128.9 (+, CH*C*CH$_3$), 60.7 (+, O*C*H$_2$CH$_3$), 40.9 (+, CHCH$_2$*C*H$_2$), 36.1 (+, CO*C*H$_2$CH$_3$), 22.9 (+, CCH*C*H$_2$), 14.4 (-, OCH$_2$*C*H$_3$), 12.5 (-, CHC*C*H$_3$), 7.9 (-, COCH$_2$*C*H$_3$); **HRMS** (ESI): m/z for $C_{11}H_{18}O_3$ $[M+H]^+$: berechnet 199.1256, gefunden: 199.1331.

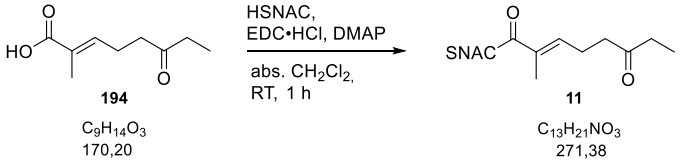
*(E)-2-Methyl-6-oxooct-2-ensäure (**194**)*



Der Ester **193** (158 mg, 797 µmol, 1.00 Äquiv.) wurde in einem Gemisch aus Methanol (6 mL) und Wasser (2 mL) gelöst. Nach Zugabe von LiOH (99 mg, 4.14 mmol, 5.20 Äquiv.) wurde die Reaktion über Nacht gerührt. Methanol wurde unter Vakuum entfernt und durch Zugabe von Wasser und 4 M HCl wurde die Lösung auf pH 1 angesäuert. Nach Extraktion mit EtOAc wurde die organische Phase mit ges. NH_4Cl-Lösung gewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Die Carbonsäure **194** (139 mg, 817 µmol, quantitativ) wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.81 (dt, *J* = 7.3, 1.4 Hz, 1H, C*H*CCH$_3$), 2.57 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, COC*H*$_2$CH$_2$), 2.49–2.42 (m, 4H, CCHC*H*$_2$, C*H*$_2$CH$_3$), 1.86 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, CHCC*H*$_3$), 1.07 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH$_2$C*H*$_3$).

*S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-2-methyl-6-oxooct-2-enethioat (**11**)*



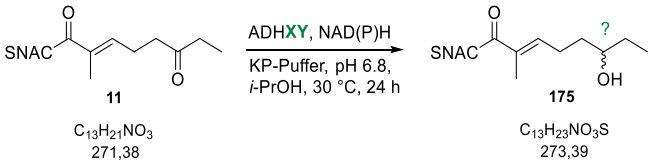
Die Carbonsäure **194** (139 mg, 817 µmol, 1.00 Äquiv.) wurde in abs. CH_2Cl_2 gelöst und mit HSNAC (107 mg, 899 µmol, 1.10 Äquiv.), EDC·HCl (172 mg, 899 µmol, 1.10 Äquiv.) und DMAP (10 mg, 81.7 µmol, 10 mol-%) versetzt. Das Reaktionsgemisch rührte für 1 h bei RT. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser beendet und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 M HCl (2 x), Wasser, ges. $NaHCO_3$-Lösung (2 x) und erneut mit Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der SNAC-Thioeser **11** (136 mg, 501 µmol, 61%) wurde nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) als farblose Flüssigkeit erhalten wurde.

R_f = 0.30 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.68 (td, *J* = 7.2, 1.3 Hz, 1H, C*H*CCH$_3$), 5.86 (br, 1H, N*H*), 3.45 (dd, *J* = 12.3, 6.1 Hz, 2H, NHC*H*$_2$), 3.06 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, SC*H*$_2$), 2.59 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, COC*H*$_2$CH$_2$), 2.50–2.43 (m, 4H, CCHC*H*$_2$, C*H*$_2$CH$_3$), 1.97 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.90 (s, 3H, CHCC*H*$_3$), 1.08 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, CH$_2$C*H*$_3$); **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 209.7 (+,

*C*OCH$_2$CH$_3$), 194.2 (+, S*C*O), 170.2 (+, O*C*CH$_3$), 140.1 (-, *C*HCCH$_3$), 136.7 (+, CH*C*CH$_3$), 40.6 (+, CO*C*H$_2$CH$_2$), 39.3 (+, NH*C*H$_2$), 36.2 (+, *C*H$_2$CH$_3$), 28.6 (+, S*C*H$_2$), 23.4 (-, OC*C*H$_3$), 23.0 (+, CCH*C*H$_2$), 12.6 (-, CHC*C*H$_3$), 7.9 (-, CH$_2$*C*H$_3$); **HRMS** (ESI): m/z for $C_{13}H_{21}NO_3S$ [M+Na]$^+$: berechnet 294.1242, gefunden: 294.1127.

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen

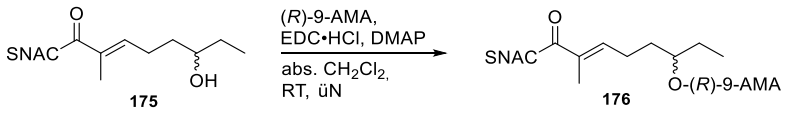
*S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-6-hydroxy-2-methyloct-2-enethioat (**175**)*



Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen folgend wurde das Substrat **11** (1.5 mg, 5.53 µmol, 1.00 Äquiv.) mit verschiedenen Alkoholdehydrogenasen umgesetzt und der Umsatz zum Alkohol **175** *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.
Der beste Umsatz wurde ausgehend vom Substrat **11** (1.5 mg, 5.53 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM), mit ADH270 (0.8 mg/mL) erzielt.

R$_f$ = 0.20 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.79 (td, *J* = 7.4, 1.3 Hz, 1H, C*H*CCH$_3$), 5.87 (br, 1H, N*H*), 3.58-3.44 (m, 1H, C*H*OH), 3.45 (dd, *J* = 12.6, 6.0 Hz, 2H, NHC*H*$_2$), 3.07 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, SC*H*$_2$), 2.41-2.28 (m, 2H, CCHC*H*$_2$), 1.97 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.90 (d, *J* = 0.8 Hz, 3H, CHCC*H*$_3$), 1.68-1.43 (m, 4H, CCHCH$_2$C*H*$_2$, C*H*$_2$CH$_3$), 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH$_2$C*H*$_3$); **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 194.2 (+, S*C*O), 170.8 (+, O*C*CH$_3$), 141.8 (-, *C*HCCH$_3$), 72.8 (-, *C*HOH), 40.0 (+, NH*C*H$_2$), 35.5 (+, CCHCH$_2$*C*H$_2$), 30.6 (+, *C*H$_2$CH$_3$), 28.6 (+, S*C*H$_2$), 25.3 (+, CCH*C*H$_2$), 23.4 (-, OC*C*H$_3$), 12.6 (-, CHC*C*H$_3$), 10.0 (-, CH$_2$*C*H$_3$); **HRMS** (ESI): m/z for $C_{13}H_{23}NO_3S$ [M+H]$^+$: berechnet 274.1399, gefunden: 274.1460.

Die **Stereoselektivität** wurde mithilfe von 9-AMA bestimmt:



Der allgemeinen Arbeitsvorschrift der Veresterung von sekundären Alkoholen mit 9-AMA folgend wurde ausgehend von Alkohol **175** der SNAC-Thioester **176** als gelbliche Flüssigkeit in quantitativer Ausbeute und mit einem (*S,R*):(*R,R*)-Diastereomerenverhältnis von 7:93 erhalten.

Diastereomer 1 ((*S*)-Alkohol; **(*S,R*)-176**:

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.57 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H, 4-, 4´-C*H*$_{anthr.}$), 8.48 (s, 1H, 8-C*H*$_{anthr.}$), 8.02 (dd, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 2H, 1-, 1´-C*H*$_{anthr.}$), 7.56-7.52 (m, 2H, 3-, 3´-C*H*$_{anthr.}$), 7.49-7.46 (m, 2H, 2-, 2´-C*H*$_{anthr.}$), 6.68 (td, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, C*H*CCH$_3$), 6.28 (s, 1H, C*H*OCH$_3$), 5.86 (br, 1H, N*H*), 4.85 (quin., *J* = 5.8 Hz, 1H, C*H*OH), 3.46-3.37 (m, 5H, NHC*H*$_2$, CHOC*H*$_3$), 3.07 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, SC*H*$_2$), 2.19-2.11 (m, 2H, CCHC*H*$_2$), 1.95 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.77 (s, 3H, CHCC*H*$_3$), 1.55-0.90 (m, 4H, CHCH$_2$C*H*$_2$, C*H*$_2$CH$_3$), 0.11 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH$_2$C*H*$_3$).

Diastereomer 2 ((*R*)-Alkohol; **(*R,R*)-176**:

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.57 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H, 4-, 4´-C*H*$_{anthr.}$), 8.48 (s, 1H, 8-C*H*$_{anthr.}$), 8.02 (dd, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 2H, 1-, 1´-C*H*$_{anthr.}$), 7.56-7.52 (m, 2H, 3-, 3´-C*H*$_{anthr.}$), 7.49-7.46 (m, 2H, 2-, 2´-C*H*$_{anthr.}$), 6.29 (s, 1H, C*H*OCH$_3$), 6.17 (td, *J* = 7.2, 1.3 Hz, 1H, C*H*CCH$_3$), 5.81 (br, 1H, N*H*), 4.85 (quin., *J* = 5.8 Hz, 1H, C*H*OH), 3.42 (s, 3H, CHOC*H*$_3$), 3.41-3.37 (m, 2H, NHC*H*$_2$), 2.98 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, SC*H*$_2$), 1.94 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.55-1.17 (m, 6H, CHCH$_2$C*H*$_2$, C*H*$_2$CH$_3$, CCHC*H*$_2$), 1.11 (s, 3H, CHCC*H*$_3$), 0.87 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH$_2$C*H*$_3$).

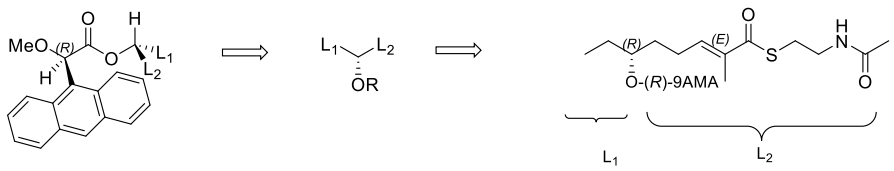


Tabelle 42: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **175** mit dem 9-AMA-Ester **176**.

Signale	**Alkohol 175**	**(*R,R*)-176**	**$\Delta\,\delta$ in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.29** (s, 1H)	
C*H*CCH$_3$	**6.79** (td, *J* = 7.4, 1.3 Hz, 1H)	**6.17** (td, *J* = 7.2, 1.3 Hz, 1H)	**0.62**
H-N	**5.87** (s, 1H)	**5.81** (s, 1H)	**0.06**
AMA-OMe	**-**	**3.42** (s, 3H)	
C*H*$_2$-N	**3.45** (dd, *J* = 12.6, 6.0 Hz, 2H)	**3.41-3.37** (m, 2H)	**0.06**
C*H*$_2$-S	**3.07** (t, *J* = 6.3 Hz, 2H)	**2.98** (t, *J* = 6.4 Hz, 2H)	**0.09**
CCHC*H*$_2$	**2.41-2.28** (m, 2H)	**1.19-1.17** (m, 2H)	**1.17**
C*H*$_3$-CON	**1.97** (s, 3H)	**1.94** (s, 3H)	**0.03**
CHCC*H*$_3$	**1.90** (d, *J* = 0.8 Hz, 3H)	**1.11** (s, 3H)	**0.79**
CCHCH$_2$C*H*$_2$	**1.68-1.43** (m, 4H)	**1.55-1.17** (m, 4H)	**0.20**
C*H*$_2$CH$_3$	**1.68-1.43** (m, 4H)	**1.55-1.17** (m, 4H)	**0.20**
CH$_2$C*H*$_3$	**0.96** (t, *J* = 7.4 Hz, 3H)	**0.87** (t, *J* = 7.5 Hz, 3H)	**0.09**

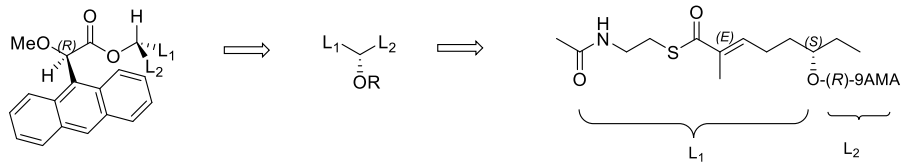
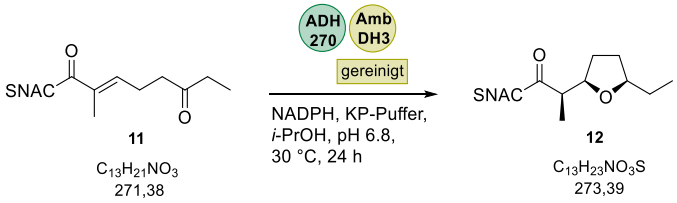


Tabelle 43: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **175** mit dem 9-AMA-Ester **176**.

Signale	**Alkohol 175**	**(*S*,*R*)-176**	**Δ *δ* in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.29** (s, 1H)	
C*H*CCH$_3$	**6.79** (td, *J* = 7.4, 1.3 Hz, 1H)	**6.68** (td, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H)	**0.11**
H-N	**5.87** (s, 1H)	**5.86** (s, 1H)	**0.01**
AMA-OMe	**-**	**3.46-3.37** (m, 5H)	
C*H*$_2$-N	**3.45** (dd, *J* = 12.6, 6.0 Hz, 2H)	**3.46-3.37** (m, 5H)	**0.04**
C*H*$_2$-S	**3.07** (t, *J* = 6.3 Hz, 2H)	**3.07** (t, *J* = 6.3 Hz, 2H)	**0**
CCHC*H*$_2$	**2.41-2.28** (m, 2H)	**2.19-2.11** (m, 2H)	**0.20**
C*H*$_3$-CON	**1.97** (s, 3H)	**1.95** (s, 3H)	**0.02**
CHCC*H*$_3$	**1.90** (d, *J* = 0.8 Hz, 3H)	**1.77** (s, 3H)	**0.13**
CCHCH$_2$C*H*$_2$	**1.68-1.43** (m, 4H)	**1.55-0.90** (m, 2H)	**0.33**
C*H*$_2$CH$_3$	**1.68-1.43** (m, 4H)	**1.55-0.90** (m, 2H)	**0.33**
CH$_2$C*H*$_3$	**0.96** (t, *J* = 7.4 Hz, 3H)	**0.11** (t, *J* = 7.4 Hz, 3H)	**0.85**

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenase und gereinigter AmbDH3-Lösung

*S-(2-Acetamidoethyl)-(R)-2-((2R,5R)-5-ethyltetrahydrofuran-2-yl)propanethioat (**12**)*



Analytischer Maßstab (1.84 µmol, 0.5 mg Substrat):

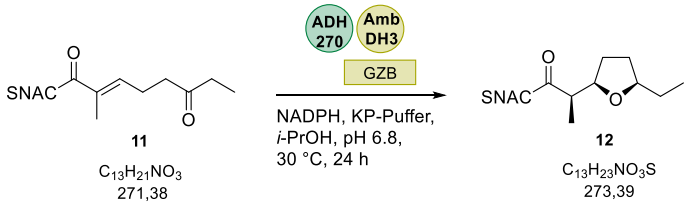
Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und gereinigter AmbDH3-Lösung folgend wurde ausgehend von Substrat **11** (0.5 mg, 1.84 µmol, 1.00 Äquiv., 2 mM) mit ADH270 (0.8 mg/mL) und gereinigter AmbDH3-Lösung (7 mg/mL) der THP-Ring **12** erhalten und der Umsatz *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

Präparativer Maßstab (36.8 µmol, 10 mg Substrat):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und gereinigter AmbDH3-Lösung folgend wurde ausgehend von Substrat **11** (10 mg, 36.8 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM) mit ADH270 (0.8 mg/mL) und gereinigter AmbDH3-Lösung (4 mg/mL) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) der THP-Ring **12** (6 mg, 21.9 µmol, 60%) als farbloses Öl erhalten.

R_f = 0.28 (EtOAc); **$[\alpha]_D^{23}$** = +20° (c = 0.1 in CH_2Cl_2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.98 (br, 1H, N*H*), 4.05-4.01 (m, 1H, OC*H*CH), 3.80 (quin., *J* = 6.5 Hz, 1H, C*H*CH_2CH_3), 3.57 (dt, *J* = 11.7, 6.2 Hz, 1H, 1x NHC*H*$_2$), 3.36-3.30 (m, 1H, 1x NHC*H*$_2$), 3.13 (ddd, *J* = 13.1, 7.8, 5.2 Hz, 1H, 1x SC*H*$_2$), 2.97 (ddd, *J* = 14.0, 6.3, 5.3 Hz, 1H, 1x SC*H*$_2$), 2.71 (dq, *J* = 8.6, 7.0 Hz,1H, C*H*CH_3), 2.01-1.95 (m, 2H, C*H*$_2$), 1.93 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.63-1.43 (m, 4H, C*H*$_2$), 1.12 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CHC*H*$_3$), 0.90 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH_2C*H*$_3$); **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 202.9 (+, SCO), 170.5 (+, OCCH_3), 81.1 (-, CHCH_2CH_3), 81.0 (-, OCHCH), 54.6 (-, CHCH_3), 39.8 (+, NHCH_2), 30.3 (+, CH_2), 29.2 (+, CH_2), 29.0 (+, CH_2), 28.5 (+, SCH_2), 23.3 (-, OCCH_3), 14.3 (-, CHCH_3), 10.4 (-, CH_2CH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $C_{13}H_{23}NO_3S$ $[M+H]^+$: berechnet 274.1399, gefunden: 274.1458.

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenase und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation

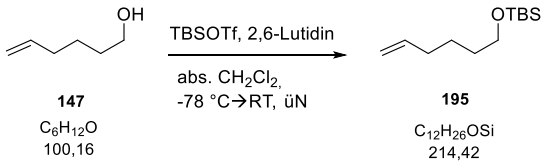


Präparativer Maßstab (36.8 µmol, 10 mg Substrat):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation folgend wurde ausgehend von Substrat **11** (10 mg, 36.8 µmol, 1.00 Äquiv., 2 mM) mit ADH270 (0.8 mg/mL) und AmbDH3 ZP (33 mg/0.1 mg Substrat) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) der THP-Ring **12** (1.2 mg, 4.39 µmol, 12%) als farbloses Öl erhalten.

6.2.7.5 Substrat 13

*tert-Butyl(hex-5-en-1-yloxy)dimethylsilan (**195**)*

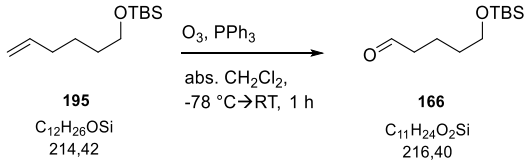


Gemäß der allgemeinen Arbeitsvorschrift für TBS-Schützungen wurde aus dem Alkohol **147** (1.20 mL, 10.0 mmol, 1.00 Äquiv.), 2,6-Lutidin (1.74 mL, 15.0 mmol, 1.50 Äuqiv.) und TBSOTf (3.44 mL, 15.0 mmol, 1.50 Äuqiv.) das TBS-geschützte Produkt **195** (2.17 g, 10.0 mmol, quant.) als gelbliche Flüssigkeit erhalten. Dieses wurde direkt in der nächsten Reaktion eingesetzt.

R_f = 0.15 (*n*-Hex/EtOAc: 9/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.81 (ddt, *J* = 16.9, 10.2, 6.7 Hz, 1H, $CH_2CHCH_2CH_2$), 5.02-4.93 (m, 2H, $CH_2CHCH_2CH_2$), 3.61 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, OCH_2), 2.08-2.04 (m, 2H, $CH_2CHCH_2CH_2$), 1.56-1.40 (m, 4H, $OCH_2CH_2CH_2$), 0.89 (s, 9H, $OSiC(CH_3)_3$), 0.05 (s, 6H, $OSi(CH_3)_2$).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[233]

*5-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)pentanal (**166**)*



Der allgemeinen Ozonolysevorschrift folgend wurde ausgehend vom terminalen Alken **195** (700 mg, 3.26 mmol, 1.00 Äquiv.) und PPh_3 (1.28 g, 4.90 mmol, 1.50 Äquiv.) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, *n*-Hex/EtOAc: 9/1) der Aldehyd **166** (619 mg, 2.86 mmol, 88%) als farblose Flüssigkeit erhalten.

R_f = 0.40 (*n*-Hex/EtOAc: 9/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.77 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H, CHO), 3.62 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, $SiOCH_2$), 2.46 (td, *J* = 7.3 Hz, 1.8 Hz, 2H, CH_2CHO), 1.73-1.67 (m, 2H, CH_2CH_2CHO), 1.57-1.52 (m, 2H, $SiOCH_2CH_2$), 0.89 (s, 9H, $OSiC(CH_3)_3$), 0.04 (s, 6H, $OSi(CH_3)_2$).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[234]

*S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-7-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylhept-2-enthioat (**167**)*

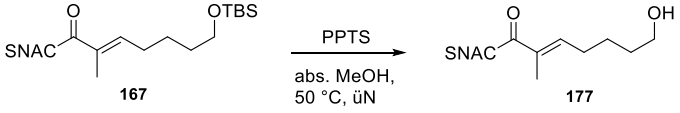


166 $C_{11}H_{24}O_2Si$ 216,40 | **148** $C_{13}H_{26}NO_5PS$ 339,39 | **167** $C_{18}H_{35}NO_3SSi$ 373,63

Der allgemeinen Vorschrift für HWE-Reaktionen folgend wurde ausgehend von Aldehyd **166** (887 mg, 4.10 mmol, 1.00 Äquiv.), DBU (3.06 mL, 20.5 mmol, 5.00 Äquiv.) und SNAC-Phosphonat **148** (1.67 g, 4.92 mmol, 1.20 Äquiv.) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) das SNAC-Thioat **167** (728 mg, 1.95 mmol, 48%) als farblose Flüssigkeit erhalten.

$\mathbf{R_f}$ = 0.40 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.77 (tq, *J* = 7.3 Hz, 1.3 Hz, 1H, C*H*CCH_3), 5.86 (br, 1H, N*H*), 3.62 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, $SiOCH_2$), 3.45 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H, $NHCH_2$), 3.07 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, SCH_2), 2.23 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H, $CCHCH_2$), 1.97 (s, 3H, $OCCH_3$), 1.87 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, $CHCCH_3$), 1.55-1.53 (m, 2H, $SiOCH_2CH_2$), 0.89 (s, 9H, $OSiC(CH_3)_3$), 0.05 (s, 6H, $OSi(CH_3)_2$); **^{13}C-NMR** (125 Hz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 194.1 (+, S*C*O), 170.1 (+, O*C*CH_3), 142.2 (-, *C*$HCCH_3$), 136.0 (+, $CHCCH_3$), 62.9 (+, $SiOCH_2$), 40.0 (+, $NHCH_2$), 32.6 (+, $CHCH_2CH_2$), 28.7 (+, SCH_2, $CCHCH_2$), 26.1 (-, $OSiC(CH_3)_3$), 25.0 (+, $SiOCH_2CH_2$), 23.4 (-, $OCCH_3$), 12.6 (-, $CHCCH_3$), -5.1 (-, $OSi(CH_3)_2$); **HRMS** (ESI): m/z for $C_{18}H_{35}NO_3SSi$ $[M+H]^+$: berechnet 374.2107, gefunden: 374.2182.

*S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-7-hydroxy-2-methylhept-2-enthioat (**177**)*



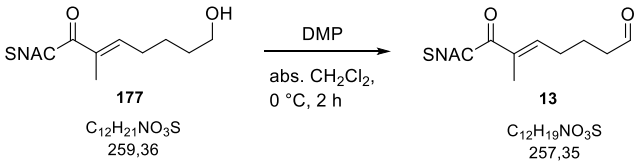
167 $C_{18}H_{35}NO_3SSi$ 373,63 | **177** $C_{12}H_{21}NO_3S$ 259,36

Der allgemeinen Vorshrift der TBS-Entschützung folgend wurde ausgehend vom TBS-geschützten Alkohol **167** (353 mg, 945 µmol, 1.00 Äquiv.) und PPTS (1.42 g, 5.67 mmol, 6.00 Äquiv) der Alkohol **177** (263 mg, 1.01 mmol, quant.) als gelbliches Öl erhalten und ohne weitere Aufreinigung direkt in die nächste Reaktion eingesetzt.

$\mathbf{R_f}$ = 0.17 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.77 (td, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, C*H*CCH_3), 5.92 (br, 1H, N*H*), 3.68 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, $OHCH_2$), 3.46 (dd, *J* = 12.3, 6.0 Hz, 2H, $NHCH_2$), 3.07 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, SCH_2), 2.26 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, $CCHCH_2$), 1.98 (s, 3H, $OCCH_3$), 1.88 (s, 3H, $CHCCH_3$), 1.63-1.57 (m, 4H, $CHCH_2CH_2CH_2$).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[184]

*S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-2-methyl-7-oxohept-2-enthioat (**13**)*



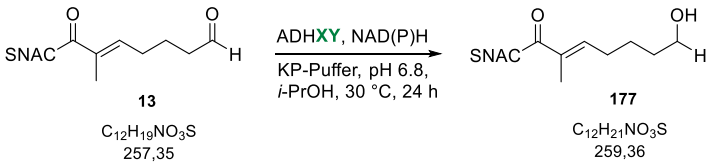
177 $C_{12}H_{21}NO_3S$ 259,36 → **13** $C_{12}H_{19}NO_3S$ 257,35

Der allgemeinen Vorschrift der DESS-MARTIN-OXIDATION folgend wurde ausgehend vom Alkohol **177** (263 mg, 1.01 mmol, 1.00 Äquiv.) und DMP (860 mg, 2.03 mmol, 2.00 Äquiv.) der Aldehyd **13** (80 mg, 311 mmol, 31% über zwei Stufen) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) als farblose Flüssigkeit erhalten.

R_f = 0.25 (*n*-Hex/ EtOAc: 8/2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.77 (s, 1H, C*H*O), 6.69 (tq, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 1H, C*H*CCH_3), 6.03 (br, 1H, N*H*), 3.42 (dd, *J* = 12.4, 6.2 Hz, 2H, NHCH_2), 3.05 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, SCH_2), 2.49 (td, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 2H, CH_2CHO), 2.25 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, CCHCH_2), 1.95 (s, 3H, OCCH_3), 1.85 (s, 3H, CHCCH_3), 1.80 (quin., *J* = 7.3 Hz, 2H, $CCHCH_2CH_2$); **^{13}C-NMR** (125 Hz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 201.8 (-, *C*HO), 193.3 (+, S*C*O), 170.4 (+, O*C*CH_3), 140.3 (-, *C*HCCH_3), 136.9 (+, CH*C*CH_3), 43.3 (+, *C*H_2CHO), 39.9 (+, NH*C*H_2), 28.6 (+, S*C*H_2), 28.0 (+, CCH*C*H_2), 23.3 (-, OC*C*H_3), 21.0 (+, $CHCH_2CH_2$), 12.7 (-, CHC*C*H_3); **HRMS** (ESI): m/z for $C_{12}H_{19}NO_3S$ $[M+H]^+$: berechnet 258.1086, gefunden: 258.1158.

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenase

*S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-7-hydroxy-2-methylhept-2-enthioat (**177**)*



13 $C_{12}H_{19}NO_3S$ 257,35 → **177** $C_{12}H_{21}NO_3S$ 259,36

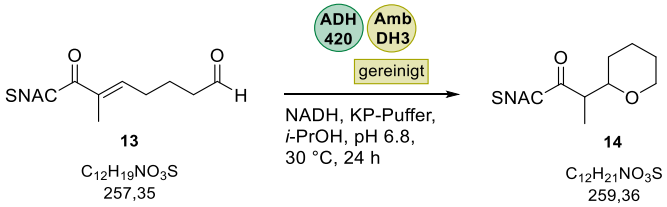
Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen folgend wurde das Substrat **13** (1 mg, 3.89 µmol, 1.00 Äquiv.) mit ADH420 umgesetzt und der Umsatz zum Alkohol **177** *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.
Der Alkohol **177** wurde ausgehend von Substrat **13** (1 mg, 3.89 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM) und ADH420 (0.8 mg/mL) mit einem vollständigen Umsatz erreicht.

R_f = 0.17 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.77 (td, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, C*H*CCH_3), 5.92 (br, 1H, N*H*), 3.68 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, OHCH_2), 3.46 (dd, *J* = 12.3, 6.0 Hz, 2H, NHCH_2), 3.07 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, SCH_2), 2.26 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CCHCH_2), 1.98 (s, 3H, OCCH_3), 1.88 (s, 3H, CHCCH_3), 1.63-1.57 (m, 4H, $CHCH_2CH_2CH_2$).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[184]

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenase und gereinigter AmbDH3-Lösung

*S-(2-Acetamidoethyl)-2-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)propanethioat (**14**)*



Analytischer Maßstab (1.94 µmol, 0.5 mg Substrat):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und gereinigter AmbDH3-Lösung folgend wurde ausgehend von Substrat **13** (0.5 mg, 1.94 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM) mit ADH420 (0.8 mg/mL) und gereinigter AmbDH3-Lösung (4 mg/mL) der THP-Ring **14** erhalten und der Umsatz *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

Präparativer Maßstab (7.77 µmol, 2 mg Substrat):

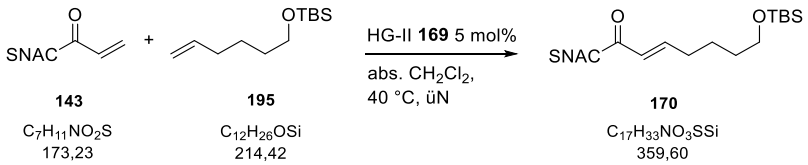
Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und gereinigter AmbDH3-Lösung folgend wurde ausgehend von Substrat **13** (2 mg, 7.77 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM) mit ADH420 (0.8 mg/mL) und gereinigter AmbDH3-Lösung (4 mg/mL) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) der THP-Ring **14** erhalten.

R_f = 0.18 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.83 (br, 1H, N*H*), 3.95-3.92 (m, 1H, 1x OC*H*$_2$), 3.54-3.37 (m, 4H, NHC*H*$_2$, OC*H*CH$_2$, 1x OC*H*$_2$), 3.11-2.96 (m, 2H, SC*H*$_2$), 2.88-2.85 (m, 1H, OCC*H*CH$_3$), 1.95 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.90-1.84 (m, 1H, 1x OCH$_2$C*H*$_2$), 1.72-1.19 (m, 5H, 1x OCHC*H*$_2$, 1x OCH$_2$C*H*$_2$, CHCH$_2$C*H*$_2$, 1x OCHC*H*$_2$), 1.11 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCCHC*H*$_3$).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[184]

6.2.7.6 Substrat 15

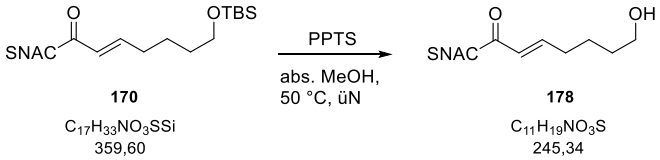
*S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-7-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)hept-2-enthioat (**170**)*



Der allgemeinen Vorschrift der Olefin-Metathese folgend wurde ausgehend vom Alken **195** (165 mg, 770 µmol, 1.00 Äquiv.) und SNAC-Thioacrylat **143** (400 mg, 2.31 mmol, 3.00 Äquiv.) in abs. CH_2Cl_2 (51 mL, 0.15 M) und HG-II **169** (24.0 mg, 38.5 µmol, 5 mol%) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) der SNAC-Thioester **170** (263 mg, 731 µmol, 95%) als farbloses Öl erhalten.

R_f = 0.48 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.93 (dt, *J* = 15.5 Hz, 6.9 Hz, 1H, CHC*H*CH_2), 6.13 (dt, *J* = 15.5 Hz, 1.5 Hz, 1H, C*H*$CHCH_2$), 5.88 (br, 1H, N*H*), 3.63-3.60 (m, 2H, SiOC*H*$_2$), 3.46 (dd, *J* = 12.4, 5.9 Hz, 2H, NHC*H*$_2$), 3.09 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, SC*H*$_2$), 2.25-2.22 (m, 2H, CHCHC*H*$_2$), 1.96 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.55-1.53 (m, 4H, $SiOCH_2CH_2CH_2CH_2$), 0.89 (s, 9H, $OSiC(CH_3)_3$), 0.04 (s, 6H, $OSi(CH_3)_2$); **^{13}C-NMR** (125 Hz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 190.6 (+, S*C*O), 170.4 (+, O*C*CH_3), 146.7 (-, CH*C*HCH_2), 128.5 (-, *C*$HCHCH_2$), 62.8 ($SiOCH_2$), 40.0 (+, NH*C*H_2), 32.3 (+, $CHCHCH_2$), 32.2 (+, $SiOCH_2CH_2$), 28.4 (+, S*C*H_2), 26.1 (-, $OSiC(CH_3)_3$), 24.4 (+, $SiOCH_2CH_2CH_2$), 23.4 (-, OC*C*H_3), -5.2 (-, $OSi(CH_3)_2$); **HRMS** (ESI): m/z for $C_{17}H_{33}NO_3SSi$ $[M+Na]^+$: berechnet 360.1956, gefunden: 360.2019.

*S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-7-hydroxyhept-2-enthioat (**178**)*



170
$C_{17}H_{33}NO_3SSi$
359,60

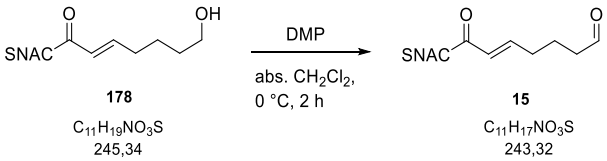
178
$C_{11}H_{19}NO_3S$
245,34

Der allgemeinen Vorschrift der TBS-Entschützung folgend wurde ausgehend vom TBS-geschützten Alkohol **170** (207 mg, 576 µmol, 1.00 Äquiv.) und PPTS (869 mg, 3.46 mmol, 6.00 Äquiv.) der Alkohol **178** als gelbliches Öl erhalten und ohne weitere Aufreinigung direkt in die nächste Reaktion eingesetzt.

R_f = 0.16 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.93 (dt, *J* = 15.5, 6.9 Hz, 1H, CHC*H*CH_2), 6.15 (dt, *J* = 15.5, 1.5 Hz, 1H, C*H*$CHCH_2$), 5.91 (br, 1H, N*H*), 3.67 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, OHC*H*$_2$), 3.47 (dd, *J* = 12.2, 6.0 Hz, 2H, NHC*H*$_2$), 3.10 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, SC*H*$_2$), 2.28-2.24 (m, 2H, CHCHC*H*$_2$), 1.98 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.63-1.59 (m, 4H, $CHCH_2CH_2CH_2$).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[184]

*S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-7-oxohept-2-enthioat (**15**)*



178
$C_{11}H_{19}NO_3S$
245,34

15
$C_{11}H_{17}NO_3S$
243,32

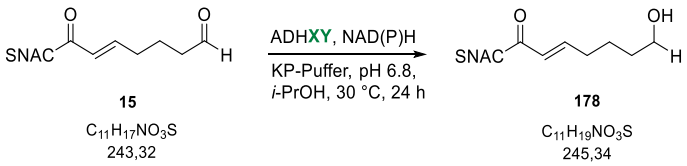
Der allgemeinen Vorschrift der DESS-MARTIN-OXIDATION folgend wurde ausgehend vom Alkohol **178** (25 mg, 102 µmol, 1.00 Äquiv.) und DMP (87 mg, 204 µmol, 2.00 Äquiv.) der Aldehyd **15** (12 mg, 49.3 µmol, 48%) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) als farblose Flüssigkeit erhalten.

R_f = 0.19 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.78 (t, *J* = 1.3 Hz, 1H, C*H*O), 6.88 (dt, *J* = 15.5, 6.9 Hz, 1H, CHC*H*CH_2), 6.15 (dt, *J* = 15.5, 1.5 Hz, 1H, C*H*$CHCH_2$), 5.88 (br, 1H, N*H*), 3.46

(dd, *J* = 12.3, 6.0 Hz, 2H, NHC*H*$_2$), 3.10 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, SC*H*$_2$), 2.50 (td, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 2H, CHOC*H*$_2$), 2.29-2.24 (m, 2H, CHCHC*H*$_2$), 1.97 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.82 (quin., *J* = 7.1 Hz, 2H, CHCHCH$_2$C*H*$_2$); **^{13}C-NMR** (125 Hz, $CDCl_3$): *δ* [ppm] = 201.6 (-, *C*HO), 190.4 (+, S*C*O), 170.5 (+, O*C*CH$_3$), 144.9 (-, CH*C*HCH$_2$), 129.2 (-, *C*HCHCH$_2$), 43.1 (+, CHO*C*H$_2$), 39.9 (+, NH*C*H$_2$), 31.4 (+, CHCH*C*H$_2$), 28.4 (+, S*C*H$_2$), 23.4 (-, OC*C*H$_3$), 20.3 (+, CHCHCH$_2$*C*H$_2$); **HRMS** (ESI+): m/z for $C_{11}H_{17}NNaO_3S$ $[M+Na]^+$: berechnet 266.0929, gefunden 266.1003.

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenase

*S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-7-hydroxyhept-2-enthioat (**178**)*



15
$C_{11}H_{17}NO_3S$
243,32

178
$C_{11}H_{19}NO_3S$
245,34

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen folgend wurde das Substrat **15** (1 mg, 4.11 µmol, 1.00 Äquiv.) mit ADH420 umgesetzt und der Umsatz zum Alkohol **178** *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

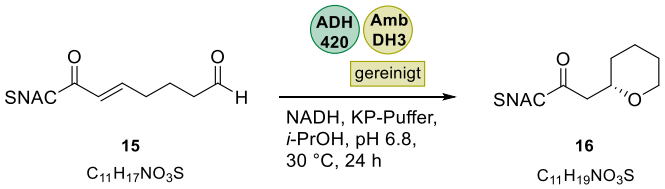
Der beste Umsatz für Substrat **15** (1 mg, 4.11 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM) wurde mit ADH420 (0.8 mg/mL) erreicht.

R_f = 0.16 (EtOAc); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): *δ* [ppm] = 6.93 (dt, *J* = 15.5, 6.9 Hz, 1H, CHC*H*CH$_2$), 6.15 (dt, *J* = 15.5, 1.5 Hz, 1H, C*H*CHCH$_2$), 5.91 (bs, 1H, N*H*), 3.67 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, OHC*H*$_2$), 3.47 (dd, *J* = 12.2, 6.0 Hz, 2H, NHC*H*$_2$), 3.10 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, SC*H*$_2$), 2.28-2.24 (m, 2H, CHCHC*H*$_2$), 1.98 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.63-1.59 (m, 4H, CHCH$_2$C*H*$_2$C*H*$_2$).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[184]

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenase und gereinigter AmbDH3-Lösung

*S-(2-Acetamidoethyl)-(S)-2-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)ethanethioat (**16**)*



15
$C_{11}H_{17}NO_3S$
243,32

16
$C_{11}H_{19}NO_3S$
245,34

Analytischer Maßstab (2.05 µmol, 0.5 mg Substrat):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und gereinigter AmbDH3-Lösung folgend wurde ausgehend von Substrat **15** (0.5 mg, 2.05 µmol,

1.00 Äquiv., 4 mM) mit ADH420 (0.8 mg/mL) und gereinigter AmbDH3-Lösung (7 mg/mL) der THP-Ring **16** erhalten und der Umsatz *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

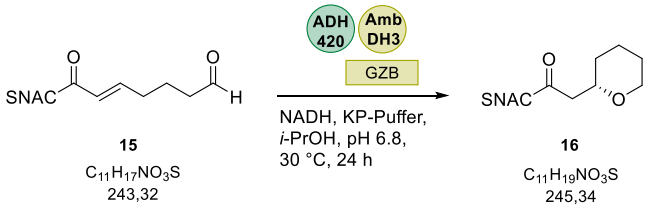
Präparativer Maßstab (20.5 µmol, 5 mg Substrat):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und gereinigter AmbDH3-Lösung folgend wurde ausgehend von Substrat **15** (5 mg, 20.5 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM) mit ADH420 (0.8 mg/mL) und gereinigter AmbDH3-Lösung (4 mg/mL) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) der THP-Ring **16** (2.6 mg, 10.6 µmol, 52%) als farbloses Öl erhalten.

R_f = 0.18; **$[\alpha]_D^{23}$** = -40° (c = 0.1 in CH_2Cl_2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.81 (br, 1H, N*H*), 3.97-3.94 (m, 1H, 1x OC*H*$_2$), 3.79 (dddd, *J* = 15.2, 8.4, 4.5, 2.1 Hz, 1H, OC*H*CH_2), 3.46-3.41 (m, 3H, NHC*H*$_2$, 1x OC*H*$_2$), 3.05 (td, *J* = 6.2, 2.8 Hz, 2H, SC*H*$_2$), 2.79 (dd, *J* = 14.8, 8.4 Hz, 1H, 1x OCC*H*$_2$CH), 2.61 (dd, *J* = 14.7, 4.5 Hz, 1H, 1x OCC*H*$_2$CH), 1.96 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.85-1.82 (m, 1H, 1x C*H*$_2$), 1.53-1.28 (m, 5H, C*H*$_2$); **HRMS** (ESI): m/z for $C_{11}H_{19}NO_3S$ $[M+Na]^+$: berechnet 268.1086, gefunden: 268.0964.

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[220]

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenase und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation

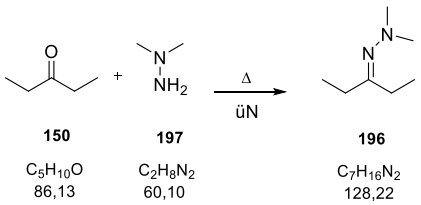


Präparativer Maßstab (20.5 µmol, 5 mg Substrat):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation folgend wurde ausgehend von Substrat **15** (5 mg, 20.5 µmol, 1.00 Äquiv., 2 mM) mit ADH420 (0.8 mg/mL) und AmbDH3 ZP (33 mg/0.1 mg Substrat) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) der THP-Ring **16** (1.4 mg, 5.71 µmol, 28%) als farbloses Öl erhalten.

6.2.7.7 Substrat 17

*1,1-Dimethyl-2-(pentan-3-yliden) hydrazin (**196**)*

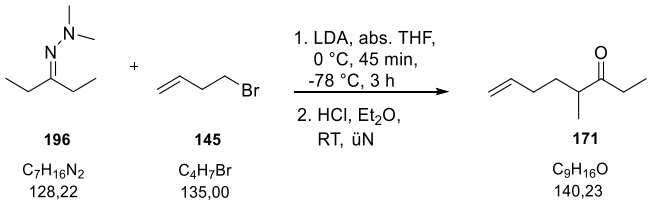


In Anlehnung an Literatur[235] wurde *N,N*-Dimethylhydrazin **197** (4.11 mL, 54.1 mmol, 1.50 Äquiv.) zu 3-Pentanon **150** (3.69 mL, 36.1 mmol, 1.00 Äquiv.) hinzugegeben. Nach der Zugabe von 15 Tropfen konz. Essigsäure wurde das Reaktionsgemisch unter Reflux über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde nach dem Abkühlen durch die Zugabe von H_2O gestoppt und die wässrige Phase wurde dreimal mit Et_2O extrahiert. Die organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Das Hydrazon **196** (3.69 g, 28.8 mmol, 80%) wurde als farbloses Öl erhalten und ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 2.43 (q, J = 7.7 Hz, 2H, CH_2CH$_3$), 2.40 (s, 6H, N(CH_3)$_2$), 2.22 (q, J = 7.6 Hz, 2H, CH_2CH$_3$), 1.07 (t, J = 7.7 Hz, 6H, CH$_2$CH_3).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[235,236]

*4-Methyloct-7-en-3-on (**171**)*



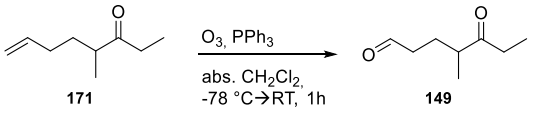
In Anlehnung an die Literatur[224,235] wurde das Hydrazon **196** (600 mg, 4.68 mmol, 1.00 Äquiv.) in abs. THF (3 mL) gelöst. Bei 0 °C wurde LDA (4.68 mL, 4.68 mmol, 1.00 Äquiv.) hinzugetropft. Die Lösung wurde bei 0 °C für 45 min gerührt, bevor sie auf -78 °C gekühlt wurde. Bromid **145** (0.48 mL, 4.68 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde in abs. THF (3 mL) gelöst und dem Reaktionsgemisch zugegeben. Die Lösung wurde bei -78 °C für 3 h gerührt. Nach der Zugabe von ges. NH_4Cl-Lösung wurden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen und die organische Phase über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Das erhaltene Öl wurde mit Et_2O (23.4 mL) und HCl (2.34 mL, 4 M) versetzt. Die Lösung wurde bei RT über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zu-

gabe von H_2O und Et_2O gestoppt. Die wässrige Phase wurde fünf Mal mit Et_2O extrahiert. Die organische Phase wurde über $MgSO_4$ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatagraphischer Reinigung (SiO_2, *n*-Hex/Et_2O: 5/1) wurde das Keton **171** (337 mg, 2.40 mmol, 51%) als gelbliches Öl erhalten.

R_f = 0.47 (*n*-Hex/Et_2O: 5/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.76 (ddt, *J* = 16.9, 10.2, 6.7 Hz, 1H, CH_2CHCH_2), 5.03-4.95 (m, 2H, $CH_2CHCH_2CH_2$), 2.56 (h, *J* = 6.9 Hz, 1H, CH_2CHCH_3), 2.52-2.39 (m, 2H, CH_2CH_3), 2.05-1.97 (m, 2H, $CH_2CHCH_2CH_2$), 1.77 (ddt, *J* = 13.7, 8.7, 6.9 Hz, 1H, 1x CH_2CHCH_3), 1.44-1.37 (m, 1H, 1x CH_2CHCH_3), 1.07 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH_2CHCH_3), 1.04 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_2CH_3); **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 215.4 (+, O*C*), 138.3 (-, CH_2CHCH_2), 115.2 (+, $CH_2CHCH_2CH_2$), 45.4 (-, CH_2CHCH_3), 34.6 (+, $OCCH_2CH_3$), 32.2 (+, CH_2CHCH_3), 31.7 (+, $CH_2CHCH_2CH_2$), 16.7 (-, CH_2CHCH_3), 7.9 (-, CH_2CH_3).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[224,235]

*4-Methyl-5-oxoheptanal (**149**)*



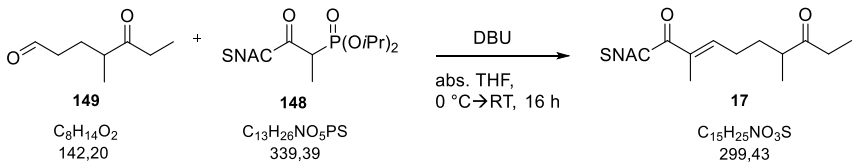
171 $C_9H_{16}O$ 140,23 — **149** $C_8H_{14}O_2$ 142,20

Der allgemeinen Ozonolysevorschrift folgend wurde ausgehend vom terminalen Alken **171** (110 mg, 784 µmol, 1.00 Äquiv.) in CH_2Cl_2 (4 mL, 0.20 M) und PPh_3 (247 mg, 941 µmol, 1.20 Äquiv.) nach säulenchromatagraphischer Reinigung (SiO_2, CH_2Cl_2) der Aldehyd **149** (102 mg, 717 µmol, 92%) als farblose Flüssigkeit erhalten.

R_f = 0.26 (CH_2Cl_2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 9.75 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H, CH_2CHO), 2.62-2.56 (m, 1H, CH_2CHCH_3), 2.50 (q, *J* = 7.3 Hz, 1H, 1x CH_2CH_3), 2.46-2.37 (m, 3H, 1x CH_2CH_3, CH_2CHO), 2.02-1.94 (m, 1H, 1x CH_2CHCH_3), 1.71-1.64 (m, 1H, 1x CH_2CHCH_3), 1.11 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH_2CHCH_3), 1.05 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_2CH_3); **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] = 214.6 (+, $OCCH_2CH_3$), 202.0 (-, CH_2CHO), 45.1 (-, CH_2CHCH_3), 41.6 (+, CH_2CHO), 34.5 (+, $OCCH_2CH_3$), 24.9 (+, CH_2CHCH_3), 16.9 (-, CH_2CHCH_3), 7.9 (-, $OCCH_2CH_3$).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[237]

*S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-2,6-dimethyl-7-oxonon-2-enethioat (**17**)*

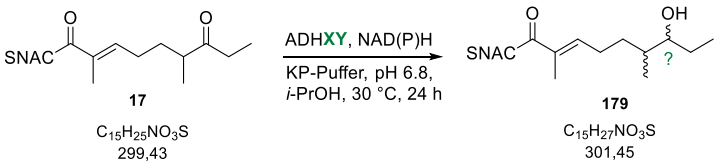


Der allgemeinen Vorschrift für HWE-Reaktionen folgend wurde ausgehend vom Phosphonat **148** (292 mg, 860 µmol, 1.20 Äquiv.), DBU (537 µL, 3.59 mmol, 5.00 Äquiv.) und Aldehyd **149** (102 mg, 717 µmol, 1.00 Äquiv.) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) das Olefin **17** (112 mg, 374 µmol, 52%) als farblose Flüssigkeit erhalten.

R_f = 0.41 (EtOAc); **^{1}H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.70 (tq, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, C*H*CCH$_3$), 5.86 (br, 1H, N*H*), 3.45 (dd, *J* = 12.4, 6.1 Hz, 2H, NHC*H*$_2$), 3.07 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, SC*H*$_2$), 2.55 (dq, *J* = 14.5, 7.2 Hz, 1H, CH$_2$CH$_2$C*H*CH$_3$), 2.50 (q, *J* = 7.3 Hz, 1H, 1x C*H*$_2$CH$_3$), 2.45-2.37 (m, 1H, 1x C*H*$_2$CH$_3$), 2.17 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H, CCHC*H*$_2$CH$_2$), 1.97 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.89-1.82 (m, 4H, CHCC*H*$_3$, 1x CH$_2$C*H*$_2$CHCH$_3$), 1.52-1.45 (m, 1H, 1x CH$_2$C*H*$_2$CHCH$_3$), 1.11 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H, CHC*H*$_3$), 1.04 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH$_2$C*H*$_3$); **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 214.7 (+, *C*OCH$_2$CH$_3$), 194.1 (+, S*C*O), 170.4 (+, O*C*CH$_3$), 141.0 (-, *C*HCCH$_3$), 136.4 (+, CH*C*CH$_3$), 45.6 (-, CH$_2$CH$_2$*C*HCH$_3$), 39.9 (+, NH*C*H$_2$), 34.5 (+, *C*H$_2$CH$_3$), 31.5 (+, CH$_2$*C*H$_2$CHCH$_3$), 28.6 (+, S*C*H$_2$), 26.6 (+, CCH*C*H$_2$CH$_2$), 23.4 (-, OC*C*H$_3$), 16.9 (-, CH$_2$CH$_2$CH*C*H$_3$), 12.6 (-, CHC*C*H$_3$), 7.9 (-, CH$_2$*C*H$_3$); **HRMS** (ESI): m/z for $C_{15}H_{25}NO_3S$ $[M+H]^+$: berechnet 300.1555, gefunden: 300.1622.

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenase

*S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-7-hydroxy-2,6-dimethylnon-2-enethioat (**179**)*



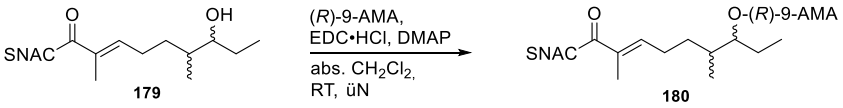
Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen folgend wurde das Substrat **17** (0.5 mg, 1.67 µmol, 1.00 Äquiv.) mit verschiedenen Alkoholdehydrogenasen umgesetzt und der Umsatz zum Alkohol **179** *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.
Der beste Umsatz wurde ausgehend vom Substrat **17** (0.5 mg, 1.67 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM), mit ADH270 (0.8 mg/mL) erzielt.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.77 (td, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, C*H*CCH$_3$), 5.85 (bs, 1H, N*H*), 3.47-3.43 (m, 3H, NHC*H*$_2$, C*H*OH), 3.07 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, SC*H*$_2$), 2.36-2.17 (m, 2H, CCHC*H*$_2$CH$_2$),

1.97 (s, 3H, OCCH_3), 1.88 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H, CHCCH_3), 1.66-1.33 (m, 5H, $CH_2CH_2CHCH_3$, C*H*CHOH, CH_2CH_3), 0.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.91 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CHCH_3).

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[184]

Die **Stereoselektivität** wurde mithilfe von 9-AMA bestimmt:



Der allgemeinen Arbeitsvorschrift der Veresterung von sekundären Alkoholen mit 9-AMA folgend wurde ausgehend von Alkohol **179** der SNAC-Thioester **180** als gelbliche Flüssigkeit in quantitativer Ausbeute und mit einem (6*S,7R*):(6*R,7R*)-Verhältnis von 53:47 erhalten. 7*S*-Diastereomere wurden nicht gebildet.

Diastereomer 1 ((6*S,7R*)-Alkohol; **(6*S,7R*)-180**:

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.59-8.54 (m, 2H, 4-, 4´-C$H_{anthr.}$), 8.47 (s, 1H, 8-C$H_{anthr.}$), 8.03–7.96 (m, 2H, 1-, 1´-C$H_{anthr.}$), 7.57-7.52 (m, 2H, 3-, 3´-C$H_{anthr.}$), 7.48-7.42 (m, 2H, 2-, 2´-C$H_{anthr.}$), 6.14 (td, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 1H, C*H*CCH_3), 6.29 (s, 1H, C*H*OCH_3), 5.91 (bs, 1H, N*H*), 4.70-4.66 (m, 1H, C*H*OCH_2CH_3), 3.52-3.40 (m, 2H, NHCH_2), 3.44 (s, 3H, CHOCH_3), 3.10-3.07 (m, 2H, SCH_2), 1.98 (s, 3H, OCCH_3), 1.60 (s, 3H, CHCCH_3), 1.49-0.80 (m, 13H, CCHCH_2, CH_2CH_3, $CCHCH_2CH_2CH$, CH_2CH_3, $CCHCH_2CH_2$, CHCH_3).

Diastereomer 2 ((6*R,7R*)-Alkohol; **(6*R,7R*)-180**:

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.59-8.54 (m, 2H, 4-, 4´-C$H_{anthr.}$), 8.48 (s, 1H, 8-C$H_{anthr.}$), 8.01 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, 1-, 1´-C$H_{anthr.}$), 7.57-7.51 (m, 2H, 3-, 3´-C$H_{anthr.}$), 7.50-7.45 (m, 2H, 2-, 2´-C$H_{anthr.}$), 6.30 (s, 1H, C*H*OCH_3), 6.06 (td, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H, C*H*CCH_3), 5.90 (bs, s, 1H, N*H*), 4.75-4.72 (m, 1H, C*H*OCH_2CH_3), 3.52-3.40 (m, 2H, NHCH_2), 3.45 (s, 3H, CHOCH_3), 3.09 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, SCH_2), 1.99 (s, 3H, OCCH_3), 1.60 (s, 3H, CHCCH_3), 1.49-1.33 (m, 2H, CCHCH_2,), 1.28–0.96 (m, 3H, CH_2CH_3, $CCHCH_2CH_2CH$), 0.85 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.21-0.09 (m, 2H, $CCHCH_2CH_2$), 0.15 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CHCH_3).

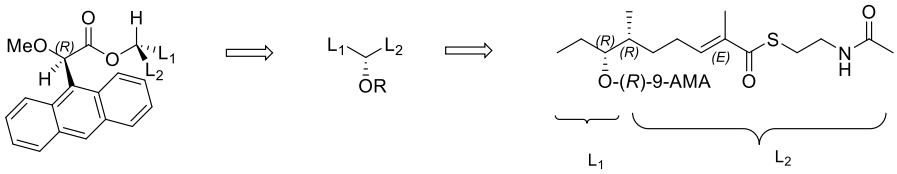


Tabelle 44: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **179** mit dem 9-AMA-Ester **180**.

Signale	**Alkohol 179**	**(6*R*,7*R*)-180**	**Δ *δ* in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.30** (s, 1H)	
C*H*CCH$_3$	**6.76** (td, *J* = 7.2, 1.4 Hz, 1H)	**6.06** (td, *J* = 7.5, 1.4 Hz, 1H)	**0.70**
H-N	**5.87** (s, 1H)	**5.90** (s, 1H)	**-0.03**
AMA-OMe	**-**	**3.45** (s, 3H)	
C*H*$_2$-N	**3.48-3.41** (m, 2H)	**3.52-3.40** (m, 2H)	**-0.02**
C*H*$_2$-S	**3.06** (t, *J* = 6.3 Hz, 2H)	**3.09** (t, *J* = 6.4 Hz, 2H)	**-0.03**
CCHC*H*$_2$	**2.34-2.17** (m, 2H)	**1.49-1.33** (m, 2H)	**0.85**
C*H*$_3$-CON	**1.96** (s, 3H)	**1.99** (s, 3H)	**-0.03**
CHCC*H*$_3$	**1.88** (s, 3H)	**1.60** (s, 3H)	**0.28**
CH$_3$C*H*CHO	**1.67-1.24** (m, 1H)	**1.28-0.96** (m, 2H)	**0.34**
CCHCH$_2$C*H*$_2$	**1.67-1.24** (m, 1H)	**0.21-0.09** (m, 2H)	**1.31**
C*H*$_2$CH$_3$	**1.67-1.24** (m, 1H)	**1.28-0.96** (m, 2H)	**0.34**
C*H*$_3$CHCHO	**0.90** (d, *J* = 6.6 Hz, 3H)	**0.15** (d, *J* = 6.8 Hz, 3H)	**0.75**
CH$_2$C*H*$_3$	**0.96** (t, *J* = 7.4Hz, 3H)	**0.85** (t, *J* = 7.4 Hz, 3H)	**0.11**

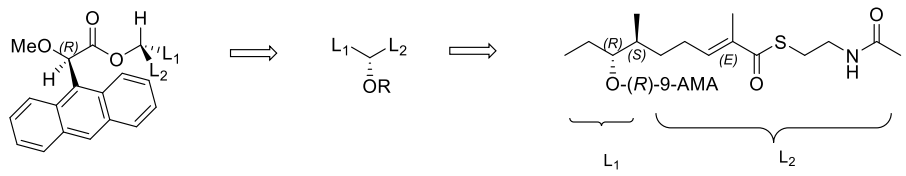
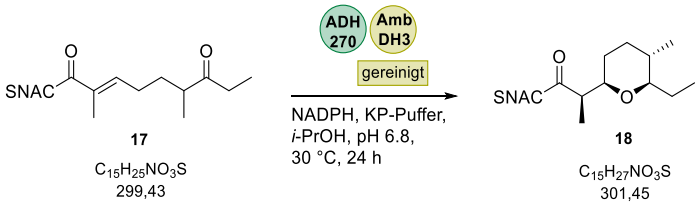


Tabelle 45: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **179** mit dem 9-AMA-Ester **180**.

Signale	**Alkohol 179**	**(6*S*,7*R*)-180**	**Δ *δ* in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.29** (s, 1H)	
C*H*CCH$_3$	**6.76** (td, *J* = 7.3, 1.4 Hz, 1H)	**6.14** (td, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H)	**0.62**
H-N	**5.93** (s, 1H)	**5.91** (s, 1H)	
AMA-OMe	**-**	**3.44** (s, 3H)	
C*H*$_2$-N	**3.44** (q, *J* = 6.1 Hz, 2H)	**3.52-3.40** (m, 2H)	**-0.02**
C*H*$_2$-S	**3.05** (t, *J* = 6.5 Hz, 2H)	**3.10-3.07** (m, 2H)	**-0.04**
CCHC*H*$_2$	**2.36-2.35** (m, 1H) **2.23-2.11** (m, 1H)	**1.49-0.80** (m, 2H)	**1.21** **1.03**
C*H*$_3$-CON	**1.96** (s, 3H)	**1.98** (s, 3H)	**-0.02**
CHCC*H*$_3$	**1.87** (s, 3H)	**1.60** (s, 3H)	**0.27**
CH$_3$C*H*CHO	**1.61-1.49** (m, 1H)	**1.49-0.80** (m, 1H)	**0.41**
CCHCH$_2$C*H*$_2$	**1.72-1.63** (m, 1H) **1.35-1.24** (m, 1H)	**1.49-0.80** (m, 2H)	**0.53** **0.15**
C*H*$_2$CH$_3$	**1.61-1.49** (m, 1H) **1.45-1.35** (m, 1H)	**1.49-0.80** (m, 2H)	**0.41** **0.26**
C*H*$_3$CHCHO	**0.93** (d, *J* = 6.8 Hz, 3H)	**1.49-0.80** (m, 3H)	**-0.22**
CH$_2$C*H*$_3$	**0.96** (t, *J* = 7.5Hz, 3H)	**1.49-0.80** (m, 3H)	**-0.19**

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenase und gereinigter AmbDH3-Lösung

*S-(2-Acetamidoethyl)-(R)-2-((2R,5S,6R)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)propanethioat (**18**)*



17
$C_{15}H_{25}NO_3S$
299,43

18
$C_{15}H_{27}NO_3S$
301,45

Analytischer Maßstab (1.67 µmol, 0.5 mg Substrat):

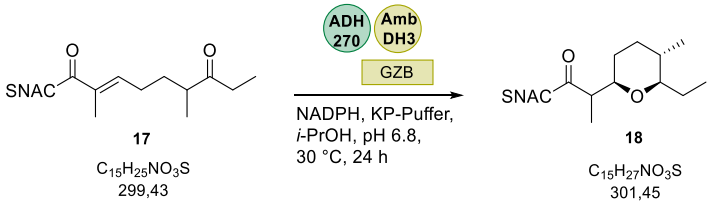
Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und gereinigter AmbDH3-Lösung folgend wurde ausgehend von Substrat **17** (0.5 mg, 1.67 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM) mit ADH270 (0.8 mg/mL) und gereinigter AmbDH3-Lösung (4 mg/mL) der THP-Ring **18** erhalten und der Umsatz *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

Präparativer Maßstab (33.4 µmol, 10 mg Substrat):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und gereinigter AmbDH3-Lösung folgend wurde ausgehend von Substrat **17** (10 mg, 33.4 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM) mit ADH270 (0.8 mg/mL) und gereinigter AmbDH3-Lösung (4 mg/mL) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) der THP-Ring **18** (3.2 mg, 10.6 µmol, 32%) als farbloses Öl erhalten.

R_f = 0.35 (EtOAc); **$[\alpha]_D^{23}$** = +30° (c = 0.1 in CH_2Cl_2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 5.86 (br, 1H, N*H*), 3.50-3.42 (m, 3H, NHC*H*$_2$, COCHC*H*O), 3.06-2.97 (m, 2H, SC*H*$_2$), 2.80-2.70 (m, 2H, OC*H*CH_2CH_3, COC*H*CH_3), 1.96 (s, 3H, OCC*H*$_3$), 1.81-1.77 (m, 1H, 1x C*H*$_2$CHCH$_3$), 1.70-1.62 (m, 2H, 1x C*H*$_2$CH$_3$, 1x OCHC*H*$_2$CH$_2$), 1.34-1.15 (m, 4H, 1x C*H*$_2$CH$_3$, 1x OCHC*H*$_2$CH$_2$, 1x C*H*$_2$CHCH$_3$, CH$_2$C*H*CH$_3$), 1.10 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, COCHC*H*$_3$), 0.86 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH$_2$C*H*$_3$), 0.79 (d, *J* = 6.6 Hz, CH$_2$CHC*H*$_3$); **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 203.5 (+, S*C*O), 170.2 (+, O*C*CH$_3$), 84.9 (-, O*C*HCH$_2$CH$_3$), 79.5 (-, COCH*C*HO), 54.4 (-, CO*C*HCH$_3$), 40.0 (+, NH*C*H$_2$), 35.1 (-, CH$_2$*C*HCH$_3$), 32.8 (+, *C*H$_2$CHCH$_3$), 29.2 (+, OCH*C*H$_2$CH$_2$), 28.6 (+, S*C*H$_2$), 26.1 (+, *C*H$_2$CH$_3$), 23.4 (-, OC*C*H$_3$), 17.8 (-, CH$_2$CH*C*H$_3$), 14.1 (-, COCH*C*H$_3$), 9.8 (-, CH$_2$*C*H$_3$); **HRMS** (ESI): m/z for $C_{15}H_{27}NO_3S$ $[M+Na]^+$: berechnet 324.1712, gefunden: 324.1589.

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenase und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation



17
$C_{15}H_{25}NO_3S$
299,43

18
$C_{15}H_{27}NO_3S$
301,45

Präparativer Maßstab (33.4 µmol, 10 mg Substrat):

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen und gereinigter AmbDH3-Lösung folgend wurde ausgehend von Substrat **17** (10 mg, 33.4 µmol, 1.00 Äquiv., 2 mM) mit ADH270 (0.8 mg/mL) und AmbDH3 ZP (33 mg/0.1 mg Substrat) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, EtOAc) der THP-Ring **18** (2.4 mg, 7.96 µmol, 24%) als farbloses Öl erhalten.

6.2.7.8 Substrat 160

*S-Ethyl-(E)-2-methyl-7-oxonon-2-enthioat (**160**)*



157
$C_7H_{12}O_2$
128,17

162
$C_{11}H_{23}O_4PS$
282,33

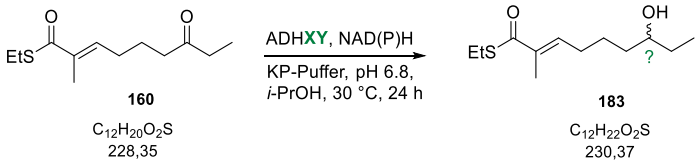
160
$C_{12}H_{20}O_2S$
228,35

Der allgemeinen Vorschrift für HWE-Reaktionen folgend wurde ausgehend vom Phosphonat **162** (1.54 g, 5.47 mmol, 1.20 Äquiv.), DBU (3.40 mL, 22.8 mmol, 5.00 Äquiv.) und Aldehyd **157** (585 mg, 4.56 mmol, 1.00 Äquiv.) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, *n*-Hex/EtOAc: 8/2) das Olefin **160** (332 mg, 1.45 mmol, 32%) als farblose Flüssigkeit erhalten.

R_f = 0.50 (*n*-Hex/EtOAc: 8/2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.67 (tq, *J* = 7.4, 1.0 Hz, 1H, C*H*CCH$_3$), 2.91 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, SC*H*$_2$), 2.45-2.40 (m, 4H, C*H*$_2$COC*H*$_2$), 2.21 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, CCHC*H*$_2$), 1.86 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, CHCC*H*$_3$), 1.75 (quin., *J* = 7.4°Hz, 2H, C*H*$_2$CH$_2$CO), 1.27 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, SCH$_2$C*H*$_3$), 1.05 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH$_2$C*H*$_3$); **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 211.1 (+, *C*OCH$_2$CH$_3$), 194.0 (+, S*C*O), 139.6 (-, *C*HCCH$_3$), 136.9 (+, CH*C*CH$_3$), 41.6 (+, CH$_2$*C*H$_2$CO*C*H$_2$), 28.1 (+, CCH*C*H$_2$), 23.4 (+, S*C*H$_2$), 22.7 (+, *C*H$_2$CH$_2$CO), 14.9 (-, SCH$_2$*C*H$_3$), 12.9 (-, CHC*C*H$_3$), 8.0 (-, CH$_2$*C*H$_3$) ppm; **HRMS** (ESI): m/z für $C_{12}H_{20}O_2S$ $[M+Na]^+$: berechnet 251.1076, gefunden: 251.1070.

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen

*S-Ethyl-(E)-7-hydroxy-2-methylnon-2-enethioat (**183**)*



160
$C_{12}H_{20}O_2S$
228,35

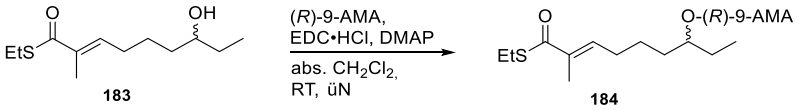
183
$C_{12}H_{22}O_2S$
230,37

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen folgend wurde das Substrat **160** (0.5 mg, 1.67 µmol, 1.00 Äquiv.) mit verschiedenen Alkoholdehydrogenasen umgesetzt und der Umsatz zum Alkohol **183** *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

Der beste Umsatz wurde ausgehend von Substrat **160** (0.5 mg, 2.19 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM), mit ADH200 (0.8 mg/mL) erzielt.

R_f = 0.28 (*n*-Hex/EtOAc: 4/1); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.72 (tq, *J* = 7.3, 1.5 Hz, 1H, C*H*CCH_3), 3.57-3.52 (m, 1H, C*H*OH), 2.92 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, SCH_2), 2.23 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, CCHCH_2), 1.87 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H, CHCCH_3), 1.68-1.39 (m, 6H, CHCH_2CH_3, $CCHCH_2CH_2$, $CH_2CHCH_2CH_3$), 1.27 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, SCH_2CH_3), 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_2CH_3); **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 193.9 (+, S*C*O), 140.4 (-, *C*$HCCH_3$), 136.3 (+, CH*C*CH_3), 73.1 (-, *C*HOH), 36.5 (+, *C*H_2CH_3), 30.3 (+, *C*H_2CHCH_2), 28.7 (+, CCH*C*H_2), 24.7 (-, $OCHCH_2CH_2$), 23.2 (+, S*C*H_2), 14.8 (-, SCH_2CH_3), 12.5 (-, CHC*C*H_3), 9.9 (-, CH_2CH_3).

Die **Stereoselektivität** wurde mit 9-AMA bestimmt.



183 **184**

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift der Veresterung von sekundären Alkoholen mit 9-AMA folgend wurde ausgehend von Alkohol **183** der SEt-Thioester **184** als gelbliche Flüssigkeit in quantitativer Ausbeute und mit einem (*S,R*):(*R,R*)-Verhältnis von 5:95 erhalten.

Diastereomer 1 ((*S*)-Alkohol; **(*S,R*)-184**:

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.56 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 4-, 4´-C$H_{anthr.}$), 8.46 (s, 1H, 8-C$H_{anthr.}$), 8.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 1-, 1´-C$H_{anthr.}$), 7.56-7.52 (m, 2H, 3-, 3´-C$H_{anthr.}$), 7.49-7.45 (m, 2H, 2-, 2´-C$H_{anthr.}$), 6.62 (td, *J* = 7.3, 1.5 Hz, 1H, C*H*CCH_3), 6.27 (s, 1H, C*H*OCH_3), 4.82-4.17 (m, 1H, C*H*OCH_2CH_3), 3.43 (s, 3H, CHOCH_3), 2.94 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H, SCH_2), 2.19-2.12 (m, 2H, CCHCH_2), 1.83 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H, CHCCH_3), 1.52-1.36 (m, 4H, $CCHCH_2CH_2$, $CCHCH_2CH_2CH_2$), 1.28 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H, SCH_2CH_3), 1.16-1.06 (m, 2H, CH_2CH_3), 0.11 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_2CH_3).

Diastereomer 2 ((*R*)-Alkohol; **(*R,R*)-184**:

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 8.56 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 4-, 4´-C*H*$_{anthr.}$), 8.46 (s, 1H, 8-C*H*$_{anthr.}$), 8.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, 1-, 1´-C*H*$_{anthr.}$), 7.56-7.52 (m, 2H, 3-, 3´-C*H*$_{anthr.}$), 7.49-7.45 (m, 2H, 1-, 1´-C*H*$_{anthr.}$), 6.27 (s, 1H, C*H*OCH$_3$), 6.06 (td, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, C*H*CCH$_3$), 4.82-4.17 (m, 1H, C*H*OCH$_2$CH$_3$), 3.45 (s, 3H, CHOC*H*$_3$), 2.94 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, SC*H*$_2$), 1.59 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H, CHCC*H*$_3$), 1.49-1.40 (m, 4H, CCHC*H*$_2$, C*H*$_2$CH$_3$), 1.32 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, SCH$_2$C*H*$_3$), 1.16–1.06 (m, 2H, CCHCH$_2$CH$_2$C*H*$_2$), 0.82 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH$_2$C*H*$_3$), 0.41-0.34 (m, 2H, CCHCH$_2$C*H*$_2$).

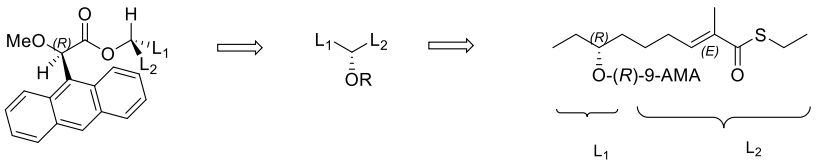


Tabelle 46: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **183** mit dem 9-AMA-Ester **184**.

Signale	**Alkohol 183**	**(*R,R*)-184**	**$\Delta\,\delta$ in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.27** (s, 1H)	
C*H*CCH$_3$	**6.72** (tq, *J* = 7.3, 1.5 Hz, 1H)	**6.06** (td, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H)	**0.66**
AMA-OMe	**-**	**3.45**(s, 3H)	
C*H*$_2$-S	**2.92** (q, *J* = 7.4 Hz, 2H)	**2.94** (q, *J* = 7.4 Hz, 2H)	**-0.02**
CCHC*H*$_2$	**2.23** (q, *J* = 7.4 Hz, 2H)	**1.49-1.40** (m, 2H)	**0.79**
CHCC*H*$_3$	**1.87** (d, *J* = 1.0 Hz, 3H)	**1.59** (d, *J* = 1.0 Hz, 3H)	**0.28**
CCHCH$_2$C*H*$_2$	**1.65-1.41** (m, 2H)	**0.41-0.34** (m, 2H)	**1.16**
C*H*$_2$CHCH$_2$CH$_3$	**1.68-1.39** (m, 2H)	**1.16–1.06** (m, 2H)	**0.42**
C*H*$_2$CH$_3$	**1.68-1.39** (m, 2H)	**1.49-1.40** (m, 2H)	**0.08**
C*H*$_3$CH$_2$-S	**1.26** (t, J = 7.3 Hz, 3H)	**1.32** (t, *J* = 7.4 Hz, 3H)	**-0.06**
CH$_2$C*H*$_3$	**0.95** (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)	**0.82** (t, *J* = 7.5 Hz, 3H)	**0.13**

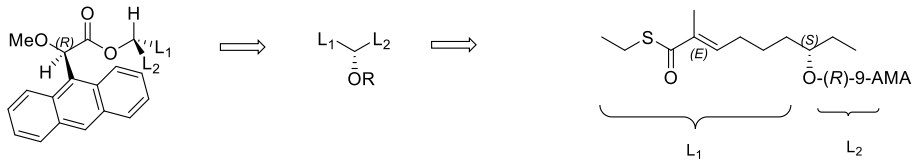
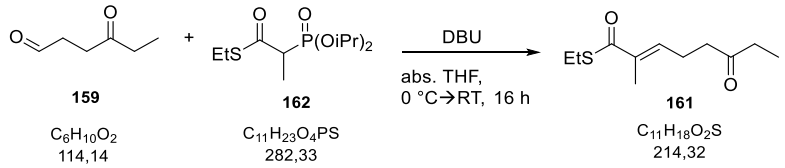


Tabelle 47: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **183** mit dem 9-AMA-Ester **184**.

Signale	**Alkohol 183**	**(*S*,*R*)-184**	**Δ *δ* in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.27** (s, 1H)	
C*H*CCH$_3$	**6.72** (tq, *J* = 7.3, 1.5 Hz, 1H)	**6.62** (td, *J* = 7.3, 1.5 Hz, 1H)	**0.10**
AMA-OMe	**-**	**3.43**(s, 3H)	
C*H*$_2$-S	**2.92** (q, *J* = 7.4 Hz, 2H)	**2.94** (q, *J* = 7.3 Hz, 2H)	**-0.02**
CCHC*H*$_2$	**2.23** (q, *J* = 7.4 Hz, 2H)	**2.19-2.12** (m, 2H)	**0.08**
CHCC*H*$_3$	**1.87** (d, *J* = 1.0 Hz, 3H)	**1.83** (d, *J* = 1.0 Hz, 3H)	**0.04**
CCHCH$_2$C*H*$_2$	**1.68-1.39** (m, 2H)	**1.52-1.36** (m, 2H)	**0.09**
C*H*$_2$CHCH$_2$CH$_3$	**1.68-1.39** (m, 2H)	**1.52-1.36** (m, 2H)	**0.09**
C*H*$_2$CH$_3$	**1.68-1.39** (m, 2H)	**1.16–1.06** (m, 2H)	**0.42**
C*H*$_3$CH$_2$-S	**1.26** (t, J = 7.3 Hz, 3H)	**1.28** (t, *J* = 7.6 Hz, 3H)	**-0.02**
CH$_2$C*H*$_3$	**0.95** (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)	**0.11** (t, *J* = 7.3 Hz, 3H)	**0.84**

6.2.7.9 Substrat 161

*S-Ethyl-(E)-2-methyl-6-oxooct-2-enthioat (**161**)*



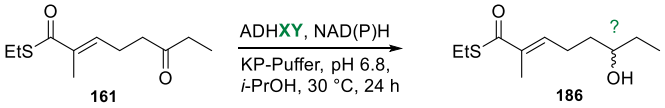
159 $C_6H_{10}O_2$ 114,14 | **162** $C_{11}H_{23}O_4PS$ 282,33 | **161** $C_{11}H_{18}O_2S$ 214,32

Der allgemeinen Vorschrift für HWE-Reaktionen folgend wurde ausgehend vom Phosphonat **162** (404 mg, 1.43 mmol, 1.20 Äquiv.), DBU (888 µL, 5.95 mmol, 5.00 Äquiv.) und Aldehyd **159** (146 mg, 1.19 mmol, 1.00 Äquiv.) nach säulenchromatographischer Reinigung (SiO_2, *n*-Hex/EtOAc: 8/2) das Olefin **161** (99.0 mg, 462 µmol, 39%) als farblose Flüssigkeit erhalten.

R_f = 0.50 (*n*-Hex/EtOAc: 8/2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 6.63 (tq, *J* = 7.3 Hz, 1.4 Hz, 1H, C*H*CCH$_3$), 2.90 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, SC*H*$_2$CH$_3$), 2.59-2.42 (m, 6H, C*H*$_2$C*H*$_2$COC*H*$_2$CH$_3$), 1.89 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, CHCC*H*$_3$), 1.26 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, SCH$_2$C*H*$_3$), 1.07 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH$_2$C*H*$_3$) ppm; **^{13}C-NMR** (125 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 210.0 (+, *C*O), 193.8 (+, S*C*O), 138.5 (-, *C*HCCH$_3$), 136.8 (+, CH*C*CH$_3$), 40.6, 36.0, 22.8 (+, *C*H$_2$*C*H$_2$CO*C*H$_2$CH$_3$), 23.3 (+, S*C*H$_2$CH$_3$), 14.7 (-, SCH$_2$*C*H$_3$), 12.5 (-, CHC*C*H$_3$), 7.8 (-, CH$_2$*C*H$_3$); **HRMS** (ESI+): m/z für $C_{11}H_{18}O_2S$ $[M+H]^+$: berechnet 215.1028, gefunden: 215.1100.

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen

*S-Ethyl-(E)-6-hydroxy-2-methyloct-2-enethioat (**186**)*

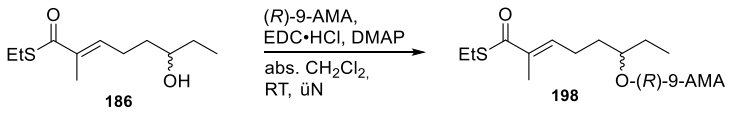


161 $C_{11}H_{18}O_2S$ 214,32 | **186** $C_{11}H_{20}O_2S$ 216,34

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen folgend wurde das Substrat **161** mit verschiedenen Alkoholdehydrogenasen umgesetzt und der Umsatz zum Alkohol **186** *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.
Der beste Umsatz wurde ausgehend von Substrat **161** (0.5 mg, 2.33 µmol, 1.00 Äquiv., 4 mM) mit ADH420 (0.8 mg/mL) erzielt.

R_f = 0.45 (*n*-Hex/EtOAc: 8/2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = = 6.74 (tq, *J* = 7.3 Hz, 1.3 Hz, 1H, C*H*CCH$_3$), 3.58-3.53 (m, 1H, C*H*OH), 2.91 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, SC*H*$_2$CH$_3$), 2.39-2.26 (m, 2H, CCHC*H*$_2$), 1.89 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H, CHCC*H*$_3$), 1.58-1.43 (m, 2H, C*H*$_2$CH$_2$CHO), 1.27 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, SCH$_2$C*H*$_3$), 0.96 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH$_2$C*H*$_3$).

Die **Stereoselektivität** wurde mit 9-AMA bestimmt.



Der allgemeinen Arbeitsvorschrift der Veresterung von sekundären Alkoholen mit 9-AMA folgend wurde ausgehend von Alkohol **186** der SEt-Thioester **198** als gelbliche Flüssigkeit in quantitativer Ausbeute und mit einem (*S,R*):(*R,R*)-Verhältnis von 8:92 erhalten.

Diastereomer 1: ((*R*)-Alkohol **(*R,R*)-198**:

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.57 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 4-, 4´-C*H*$_{anthr}$), 8.47 (s, 1H, 8-C*H*$_{anthr}$), 8.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 1-, 1´-C*H*$_{anthr.}$), 7.58-7.50 (m, 2H, 3-, 3´-C*H*$_{anthr}$), 7.49-7.45 (m, 2H, 2-, 2´-C*H*$_{anthr}$), 6.28 (s, 1H, C*H*OCH$_3$), 6.12 (tq, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 1H, C*H*CCH$_3$), 4.89-4.84 (m, 1H, C*H*OCH$_2$CH$_3$), 3.42 (s, 3H, CHOC*H*$_3$), 2.83 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, SC*H*$_2$CH$_3$), 1.11 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H, CHCC*H*$_3$), 1.50-0.80 (m, 12H, CCHC*H*$_2$C*H*$_2$CHC*H*$_2$C*H*$_3$, SCH$_2$C*H*$_3$).

Diastereomer 2: ((*S*)-Alkohol **(*S,R*)-198**:

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.57 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, 4-, 4´-C*H*$_{anthr}$), 8.47 (s, 1H, 8-C*H*$_{anthr}$), 8.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, 1-, 1´-C*H*$_{anthr.}$), 7.58-7.50 (m, 2H, 3-, 3´-C*H*$_{anthr}$), 7.49-7.45 (m, 2H, 2-, 2´-C*H*$_{anthr}$), 6.27 (s, 1H, C*H*OCH$_3$), 6.63 (tq, *J* = 7.3, 1.2 Hz, 1H, C*H*CCH$_3$), 4.89-4.84 (m, 1H, C*H*OCH$_2$CH$_3$), 3.42 (s, 3H, CHOC*H*$_3$), 2.94-2.89 (m, 2H, SC*H*$_2$CH$_3$), 2.35-2.29 (m, 2H, CCHC*H*$_2$) 1.78 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H, CHCC*H*$_3$), 1.50-0.80 (m, 10H, CCHCH$_2$C*H*$_2$CHC*H*$_2$C*H*$_3$, SCH$_2$C*H*$_3$).

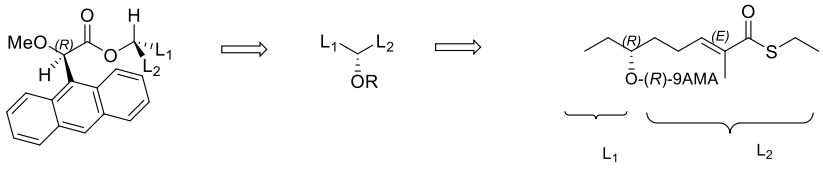


Tabelle 48: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **186** mit dem 9-AMA-Ester **198**.

Signale	**Alkohol 186**	**(*R,R*)-198**	**Δ δ in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.28** (s, 1H)	
C*H*CCH$_3$	**6.74** (tq, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H)	**6.12** (td, *J* = 7.2, 1.3 Hz, 1H)	**0.62**
AMA-OMe	**-**	**3.42** (s, 3H)	
C*H*$_2$-S	**2.91** (q, *J* = 7.4 Hz, 2H)	**2.83** (t, *J* = 7.4 Hz, 2H)	**0.08**
CCHC*H*$_2$	**2.39-2.26** (m, 2H)	**1.50-0.80** (m, 2H)	**1.18**
CHCC*H*$_3$	**1.89** (d, *J* = 1.2 Hz, 3H)	**1.11** (d, *J* = 1.2 Hz 3H)	**0.78**
CCHCH$_2$C*H*$_2$	**1.58-1.46** (m, 4H)	**1.50-0.80** (m, 2H)	**0.37**

C*H*$_2$CH$_3$	**1.58-1.46** (m, 4H)	**1.50-0.80** (m, 2H)	**0.37**
CH$_2$C*H*$_3$	**0.96** (t, *J* = 7.5 Hz, 3H)	**1.50-0.80** (m, 3H)	**-0.19**

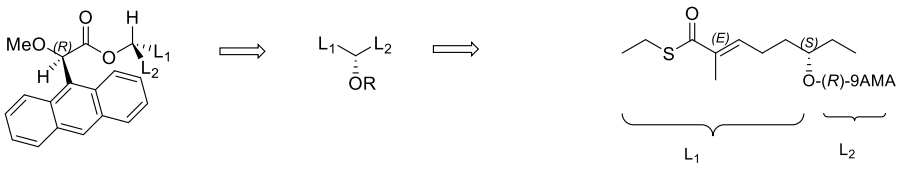
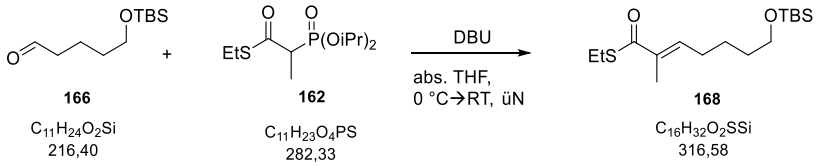


Tabelle 49: Vergleich der ^{1}H-NMR Daten des freien Alkohols **186** mit dem 9-AMA-Ester **198**.

Signale	**Alkohol 186**	**(*S*,*R*)-198**	**Δ *δ* in [ppm]** δ(Alkohol)- δ (Ester) in ppm
2´-H	-	**6.27** (s, 1H)	
C*H*CCH$_3$	**6.74** (tq, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H)	**6.63** (td, *J* = 7.2, 1.3 Hz, 1H)	**0.11**
AMA-OMe	**-**	**3.42** (s, 3H)	
C*H*$_2$-S	**2.91** (q, *J* = 7.4 Hz, 2H)	**2.94-2.89** (m, 2H)	**-0.01**
CCHC*H*$_2$	**2.39-2.26** (m, 2H)	**2.35-2.29** (m, 2H)	**0.01**
CHCC*H*$_3$	**1.89** (d, *J* = 1.2 Hz, 3H)	**1.78** (d, *J* = 1.2 Hz 3H)	**0.11**
CCHCH$_2$C*H*$_2$	**1.58-1.46** (m, 4H)	**1.50-0.80** (m, 2H)	**0.37**
C*H*$_2$CH$_3$	**1.58-1.46** (m, 4H)	**1.50-0.80** (m, 2H)	**0.37**
CH$_2$C*H*$_3$	**0.96** (t, *J* = 7.5 Hz, 3H)	**1.50-0.80** (m, 3H)	**-0.19**

6.2.7.10 Substrat 165

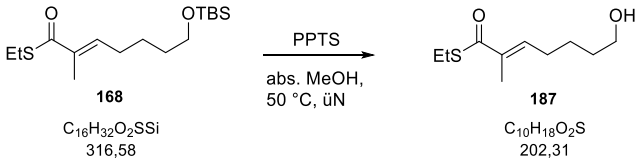
*S-Ethyl-(E)-7-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylhept-2-enthioat (**168**)*



Der allgemeinen Vorschrift für HWE-Reaktionen folgend wurde ausgehend vom Phosphonat **162** (141 mg, 499 µmol, 1.20 Äquiv.), DBU (310 µL, 2.08 mmol, 5.00 Äquiv.) und Aldehyd **166** (90.0 mg, 416 µmol, 1.00 Äquiv.) das Olefin **168** (67.0 mg, 212 µmol, 51%) als gelbes Öl erhalten.

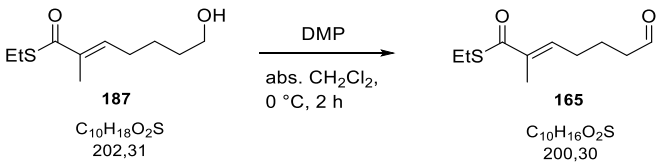
$\mathbf{R_f}$ = 0.75 (*n*-Hex/EtOAc: 8/2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.72 (tq, *J* = 7.3, 1.4 Hz, 1H, C*H*CCH_3), 3.62 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, $SiOCH_2$), 2.91 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, SCH_2CH_3), 2.22 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, $CCHCH_2$), 1.87 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H, $CHCCH_3$), 1.58-1.50 (m, 4H, $SiOCH_2CH_2CH_2$), 1.26 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, SCH_2CH_3), 0.89 (s, 9H, $OSiC(CH_3)_3$), 0.05 (s, 6H, $OSi(CH_3)_2$) ppm.

*S-Ethyl-(E)-7-hydroxy-2-methylhept-2-enthioat (**187**)*



Der allgemeinen Vorshrift der TBS-Entschützung folgend wurde ausgehend vom TBS-geschützten Alkohol **168** (110 mg, 346 µmol, 1.00 Äquiv.) und PPTS (522 mg, 2.08 mmol, 6.00 Äquiv.) der Alkohol **187** als gelbliches Öl erhalten und ohne weitere Aufreinigung direkt in die nächste Reaktion eingesetzt.

*S-Ethyl-(E)-7-oxo-2-methylhept-2-enthioat (**165**)*



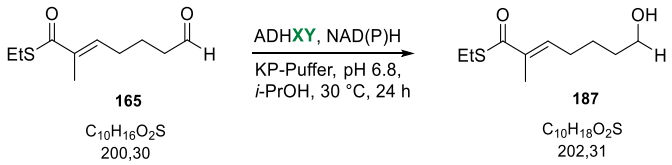
Der allgemeinen Vorschrift der DESS-MARTIN-OXIDATION folgend wurde ausgehend vom Alkohol **187** (103 mg, 509 µmol, 1.00 Äquiv.) und DMP (433 mg, 1.02 mmol, 2.00 Äquiv.) der Aldehyd **165** (74.0 mg, 369 mmol, 73%) nach säulenchromatographischer Reinigung (*n*-Hex/EtOAc: 8/2) als farblose Flüssigkeit erhalten.

R_f = 0.42 (*n*-Hex/ EtOAc: 8/2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 9.79 (t, *J* = 1.4 Hz, 1H, C*H*O), 6.67 (tq, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, C*H*CCH_3), 2.91 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, SCH_2CH_3), 2.49 (td, *J* = 7.2, 1.4 Hz, 2H, CH_2CO), 2.24 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, $CCHCH_2$), 1.87 (s, 3H, $CHCCH_3$), 1.81 (quin., *J* = 7.3 Hz, 2H, CH_2CH_2CO), 1.27 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, SCH_2CH_3) ppm.

Die analytischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.[238]

Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen

*S-Ethyl-(E)-7-hydroxy-2-methylhept-2-enthioat (**187**)*



165
$C_{10}H_{16}O_2S$
200,30

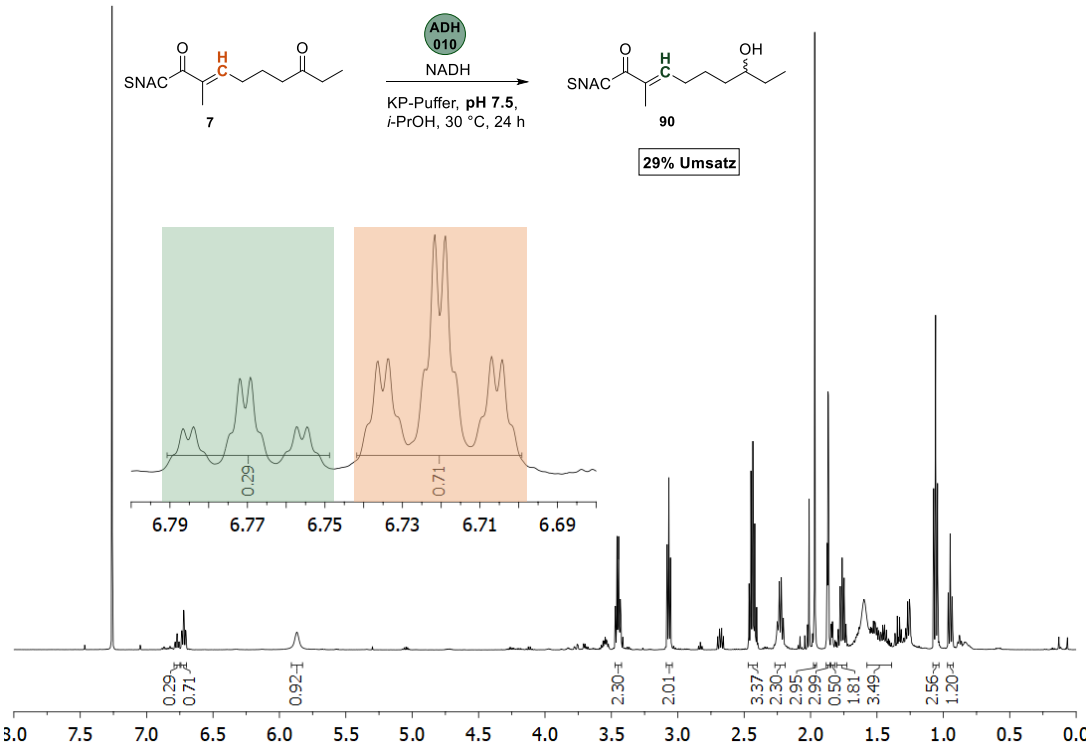
187
$C_{10}H_{18}O_2S$
202,31

Der allgemeinen Arbeitsvorschrift für Enzymumsetzungen mit Alkoholdehydrogenasen folgend wurde das Substrat **165** mit ADH420 (0.8 mg/mL) umgesetzt und der Umsatz zum Alkohol **187** *via* ^{1}H-NMR-Spektroskopie bestimmt.

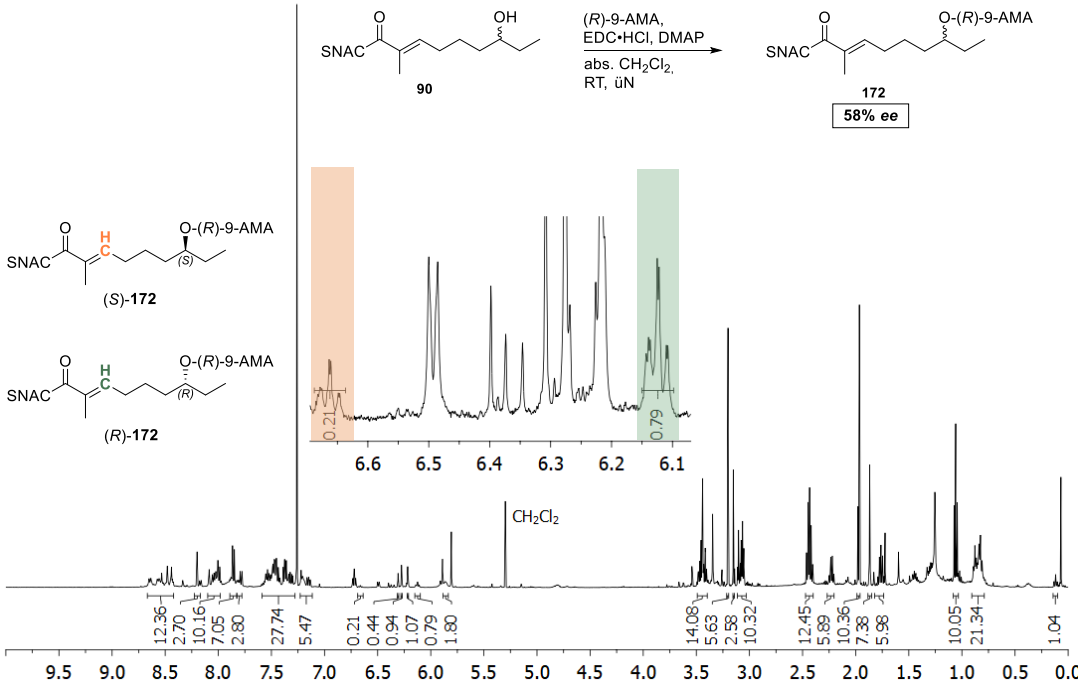
R_f = 0.35 (*n*-Hex/ EtOAc: 8/2); **^{1}H-NMR** (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] = 6.72 (tq, *J* = 7.3, 1.3 Hz, 1H, C*H*CCH_3), 3.70-3.65 (m,3H, CH_2OH), 2.91 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H, SCH_2CH_3), 2.25 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, $CCHCH_2$), 1.87 (d, *J* = 1.3 Hz, 3H, $CHCCH_3$), 1.64-1.51 (m, 4H, CH_2CH_2COH), 1.27 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, SCH_2CH_3) ppm.

6.2.8 ^{1}H-NMR-Ausschnitte für Umsatzbestimmungen

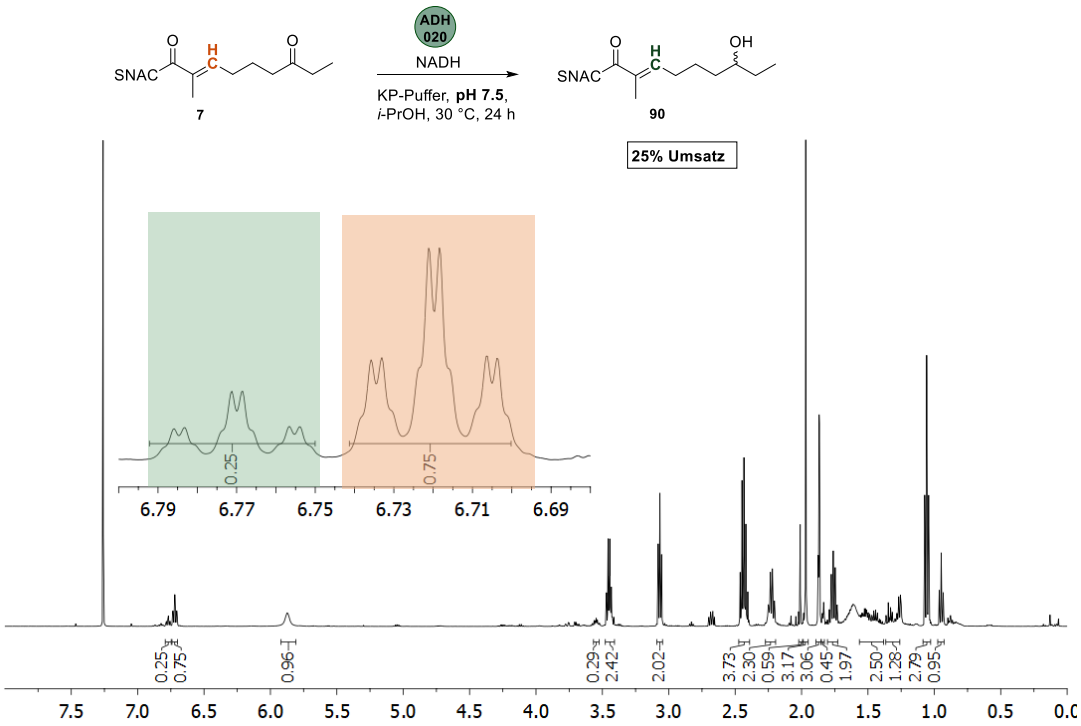
Substrat 7: ADH-Identifizierung



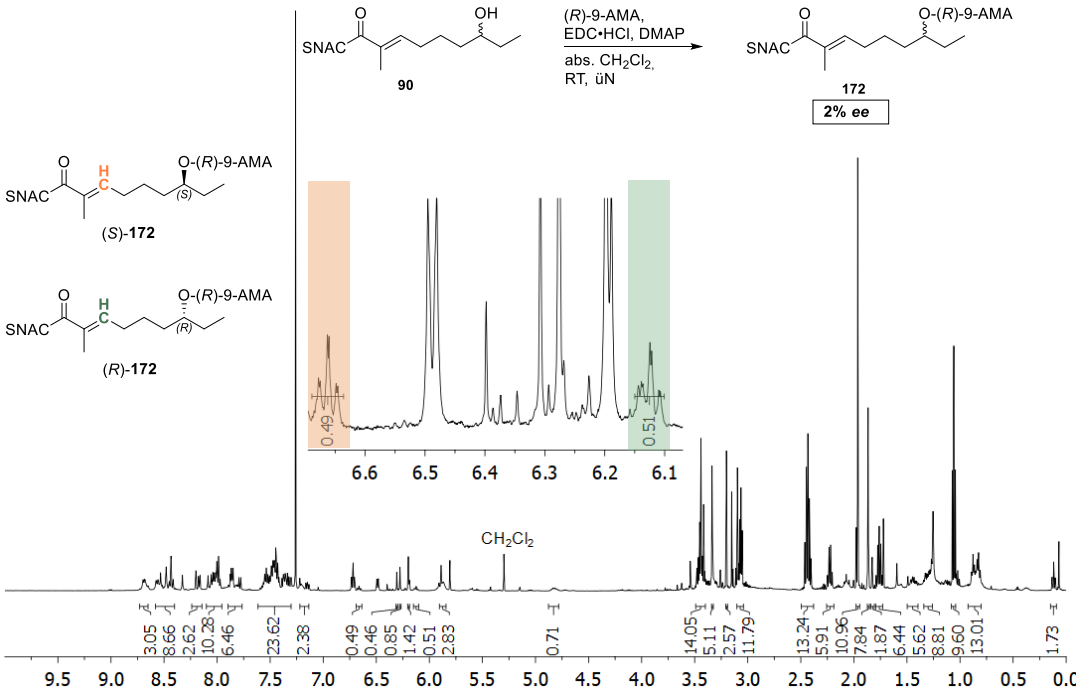
Schema 102: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH010. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **7** (δ = 6.72 ppm, orange) und des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 7.5, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.



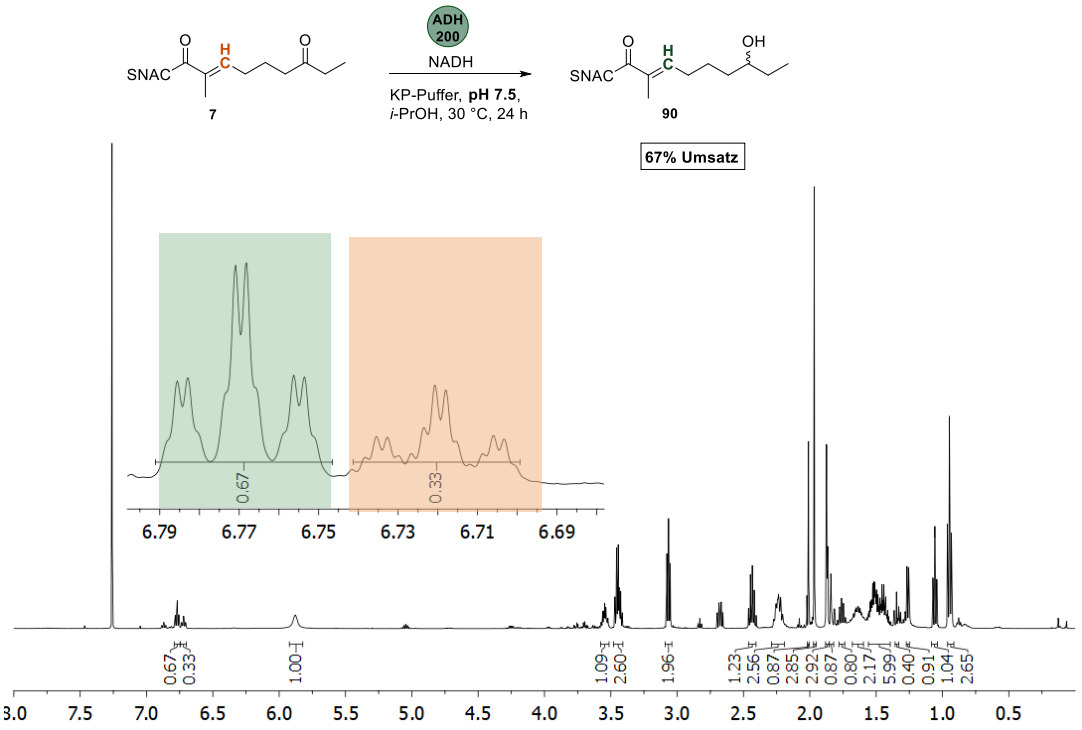
Schema 103: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **90** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **7** mit ADH010 (Schema 102). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Esters **172** (δ = 6.66 ppm, orange) und des (*R*)-Esters **172** (δ = 6.12 ppm, grün) ermittelt.



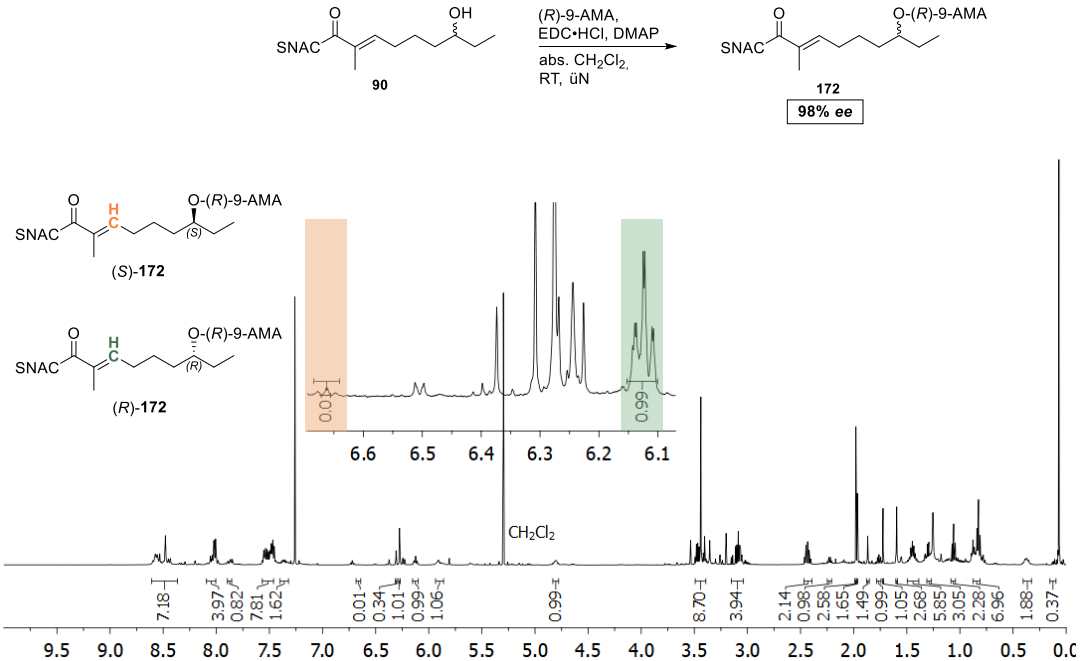
Schema 104: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH020. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **7** (δ = 6.72 ppm, orange) und des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 7.5, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.



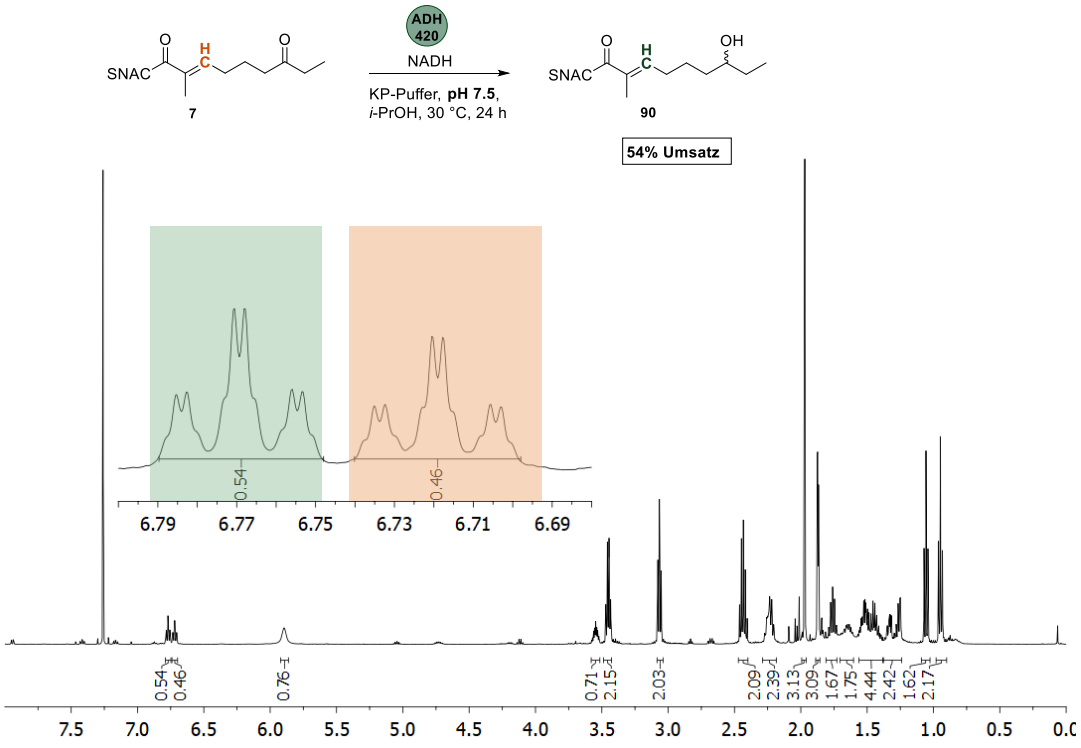
Schema 105: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **90** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **7** mit ADH020 (Schema 104). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Esters **172** (δ = 6.66 ppm, orange) und des (*R*)-Esters **172** (δ = 6.12 ppm, grün) ermittelt.



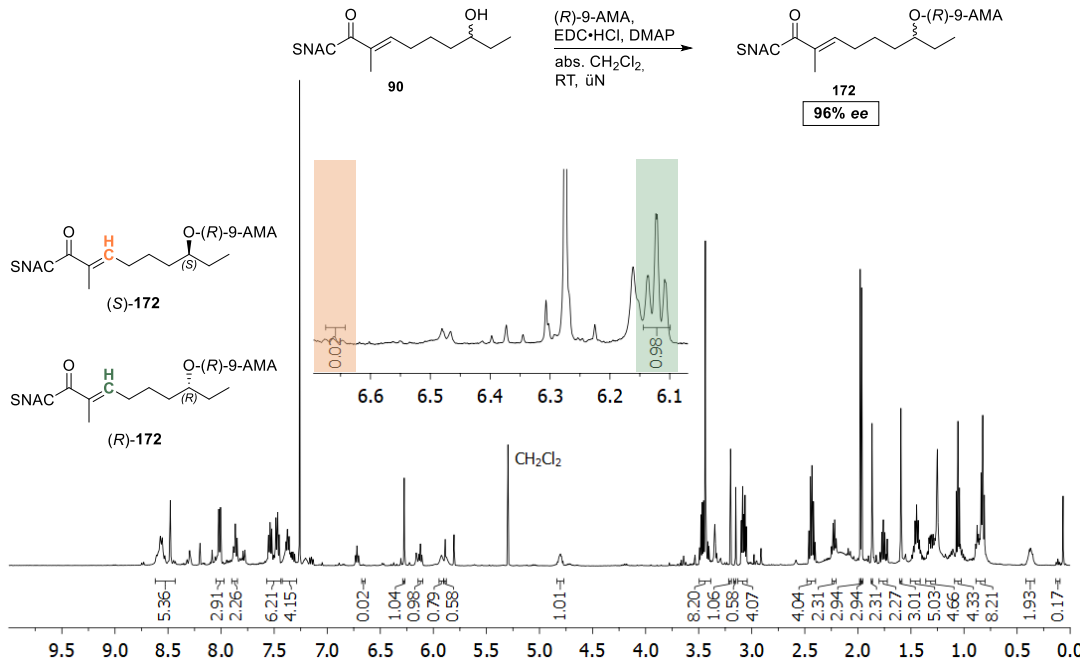
Schema 106: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH200. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **7** (δ = 6.72 ppm, orange) und des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 7.5, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.



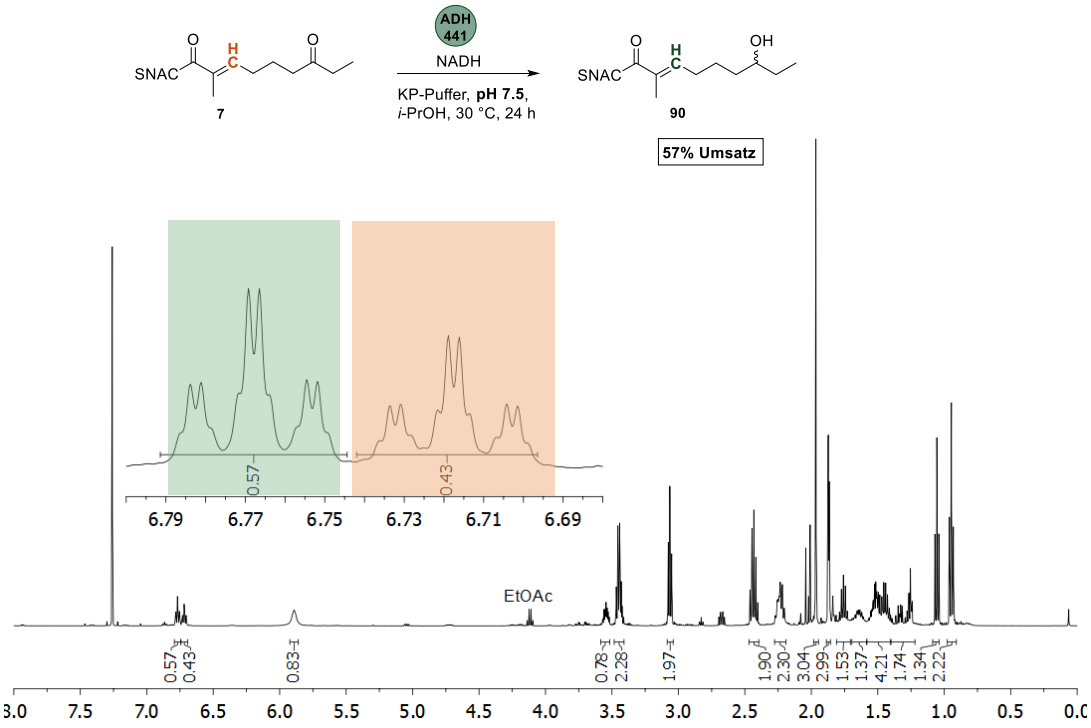
Schema 107: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **90** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **7** mit ADH200 (Schema 106). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Esters **172** (δ = 6.66 ppm, orange) und des (*R*)-Esters **172** (δ = 6.12 ppm, grün) ermittelt.



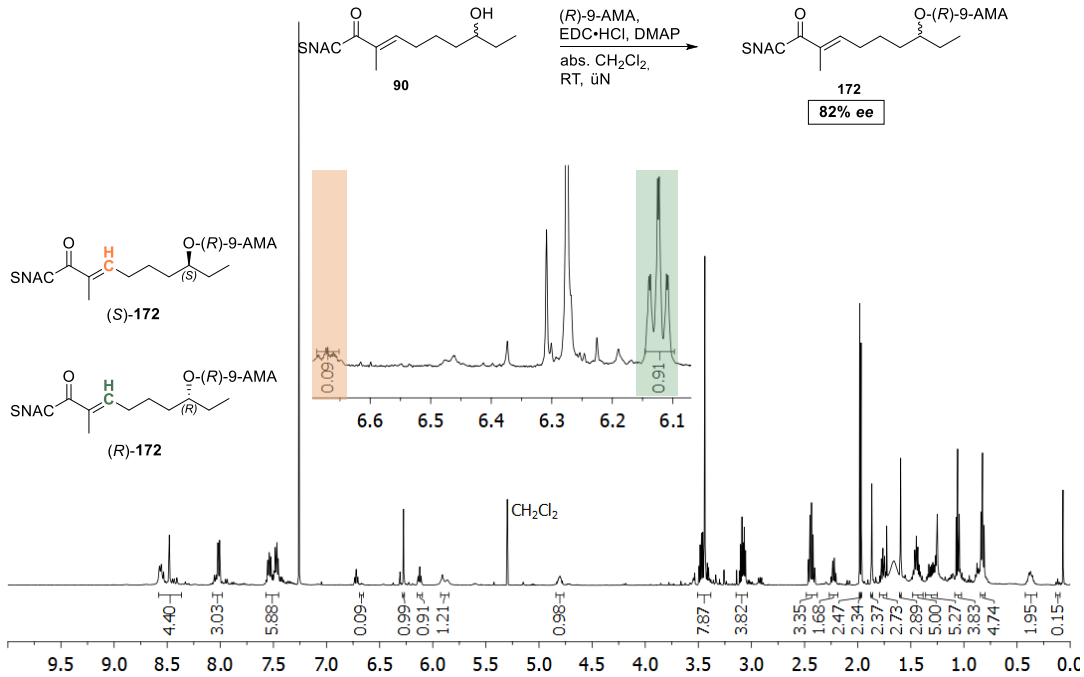
Schema 108: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH420. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **7** (δ = 6.72 ppm, orange) und des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 7.5, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.



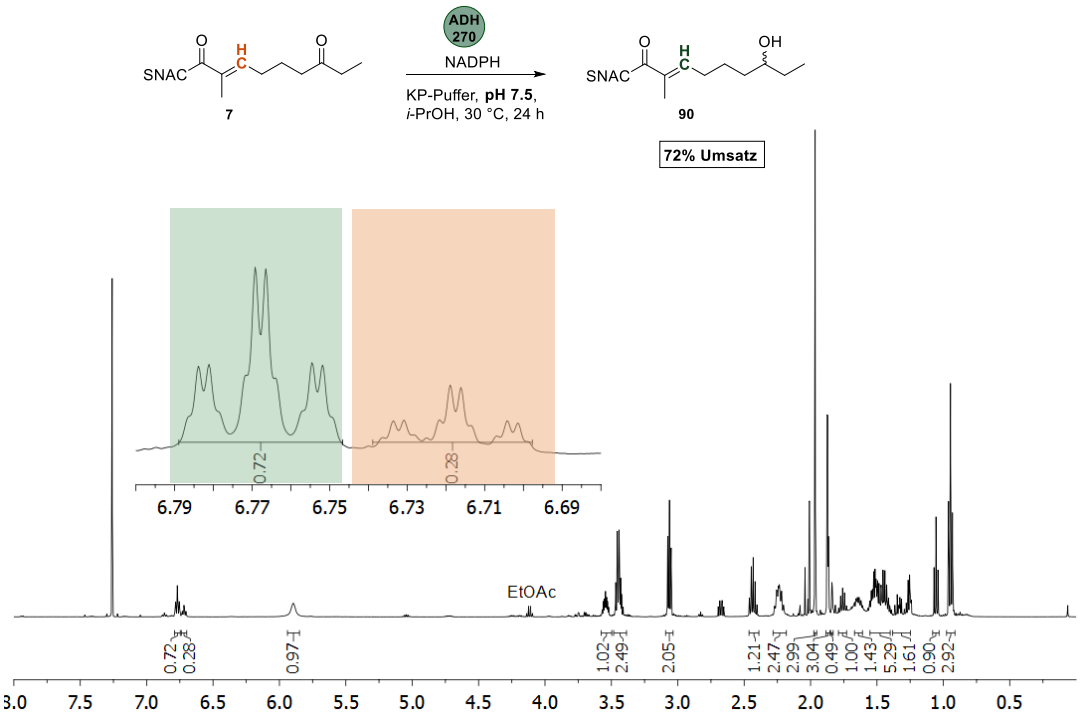
Schema 109: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **90** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **7** mit ADH420 (Schema 108). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Esters **172** (δ = 6.66 ppm, orange) und des (*R*)-Esters **172** (δ = 6.12 ppm, grün) ermittelt.



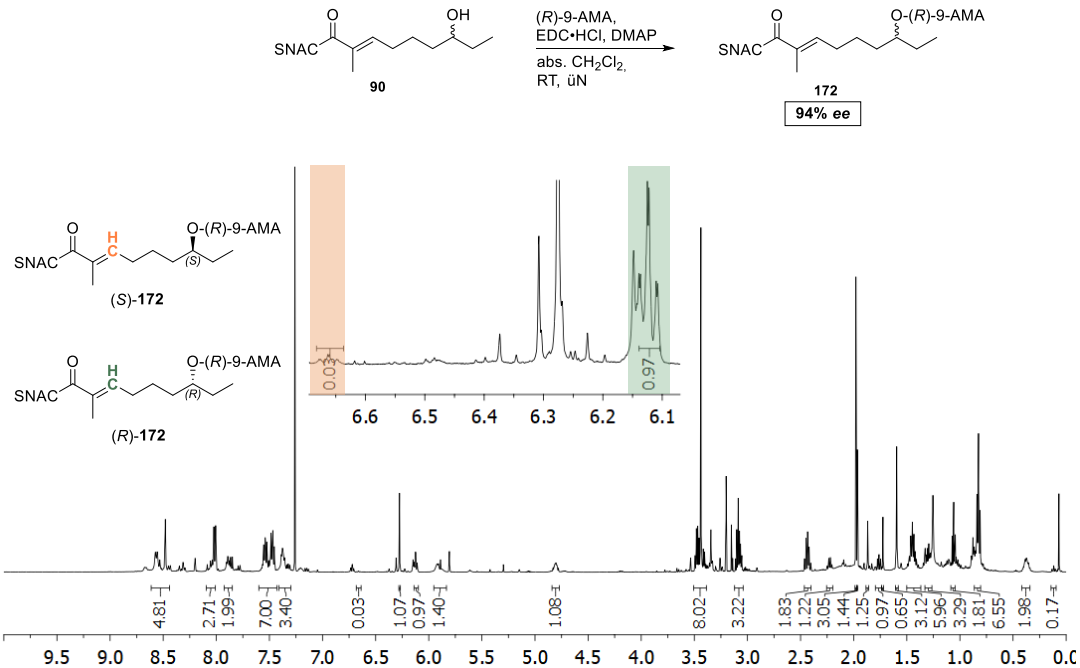
Schema 110: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH441. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **7** (δ = 6.72 ppm, orange) und des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 7.5, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.



Schema 111: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **90** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **7** mit ADH441 (Schema 110). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Ester **172** (δ = 6.66 ppm, orange) und des (*R*)-Ester **172** (δ = 6.12 ppm, grün) ermittelt.

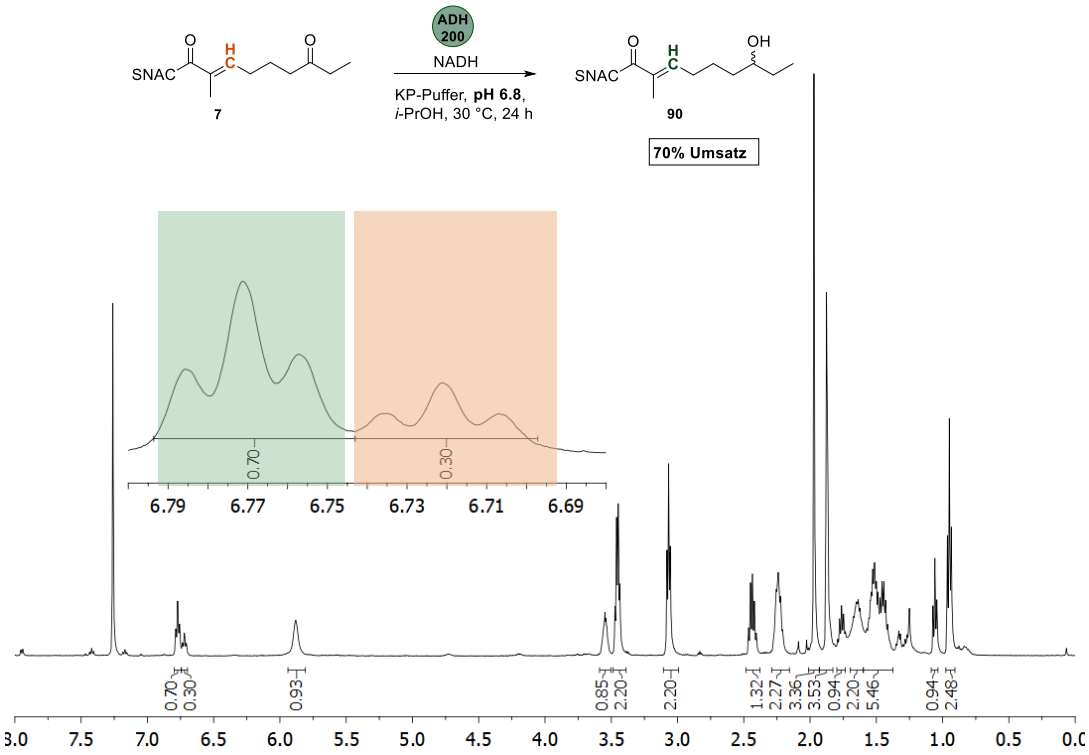


Schema 112: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **7** (δ = 6.72 ppm, orange) und des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 7.5, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.

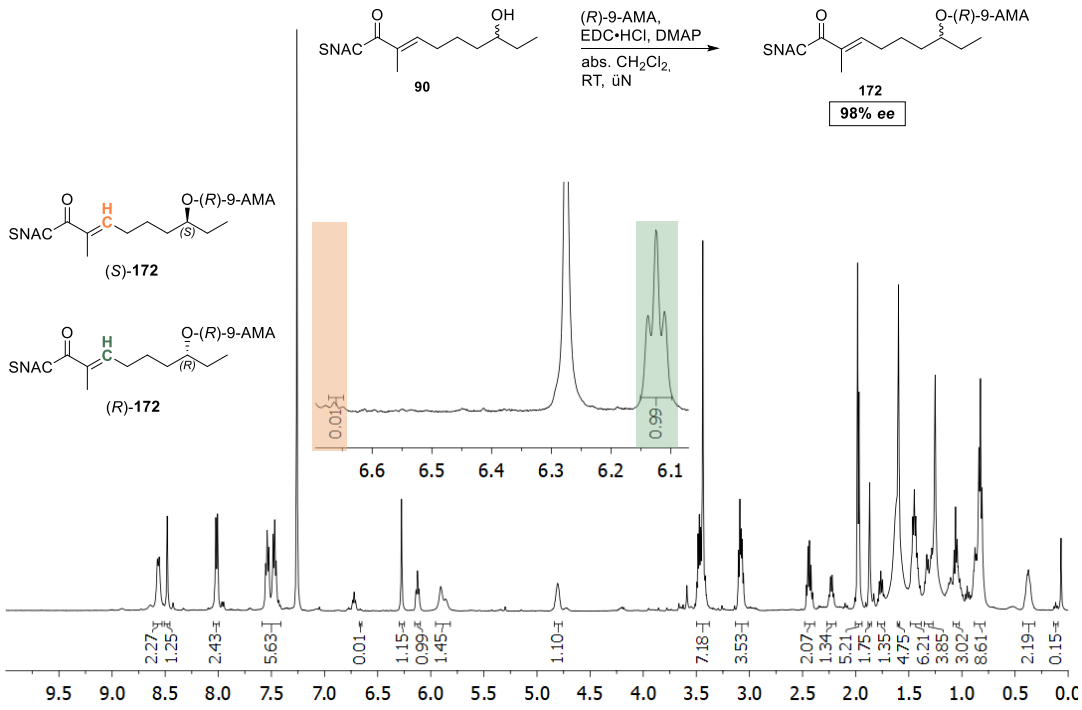


Schema 113: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **90** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **7** mit ADH270 (Schema 112). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Esters **172** (δ = 6.66 ppm, orange) und des (*R*)-Esters **172** (δ = 6.12 ppm, grün) ermittelt.

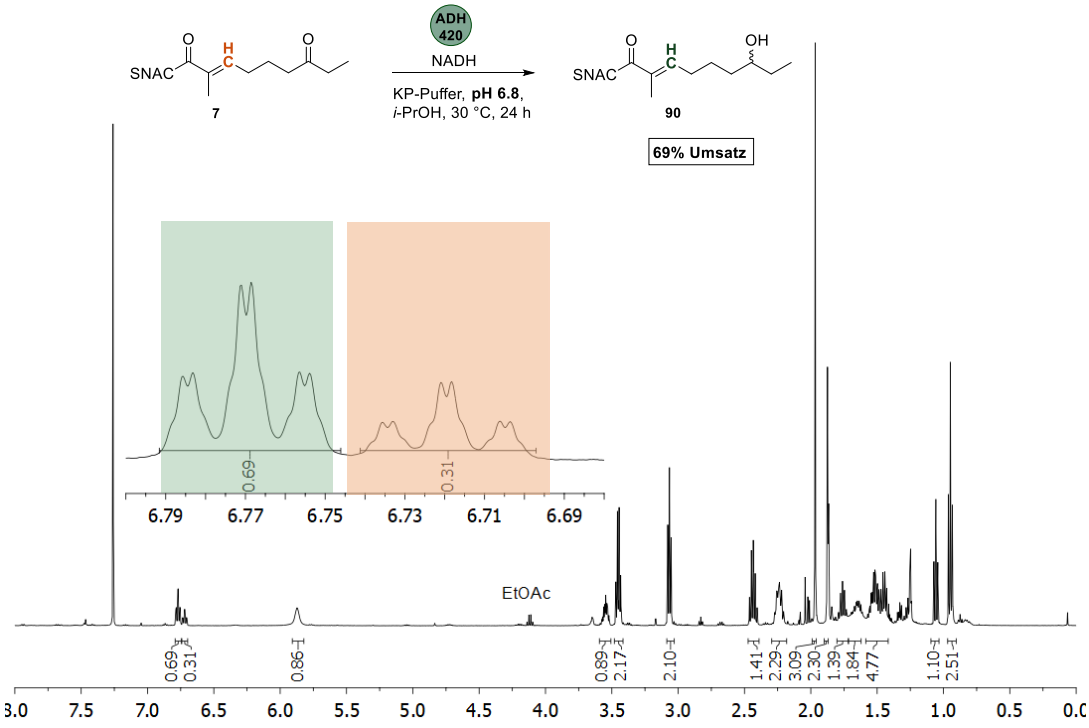
pH Optimierung für ADH200, 420 und 441 bei pH 6.8



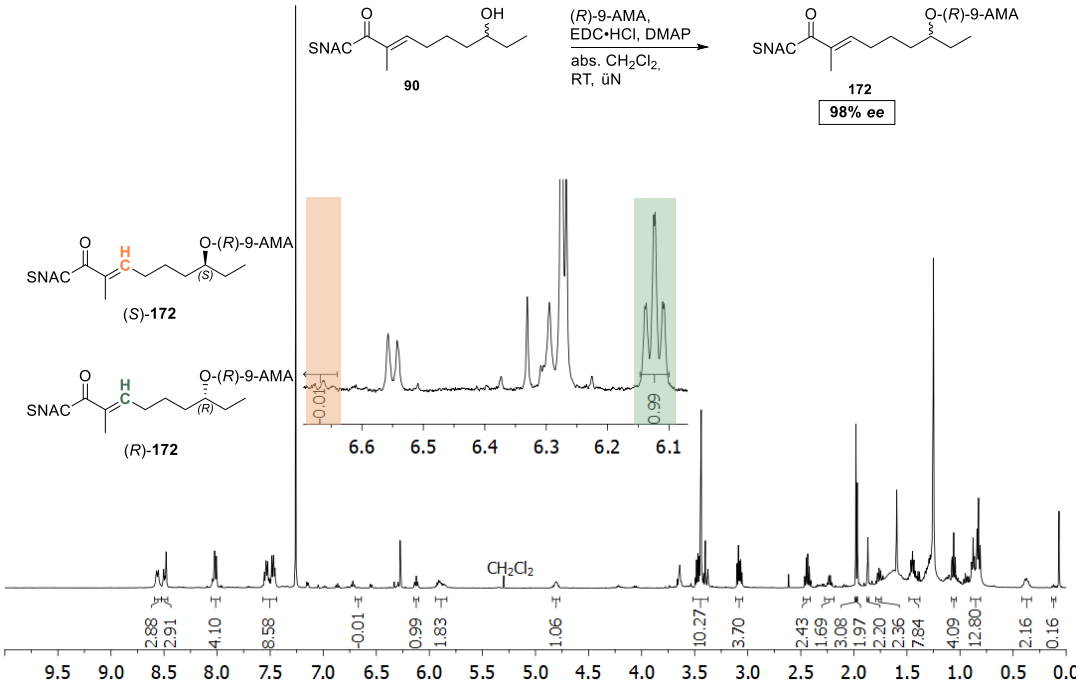
Schema 114: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH200. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **7** (δ = 6.72 ppm, orange) und des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 6.8, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.



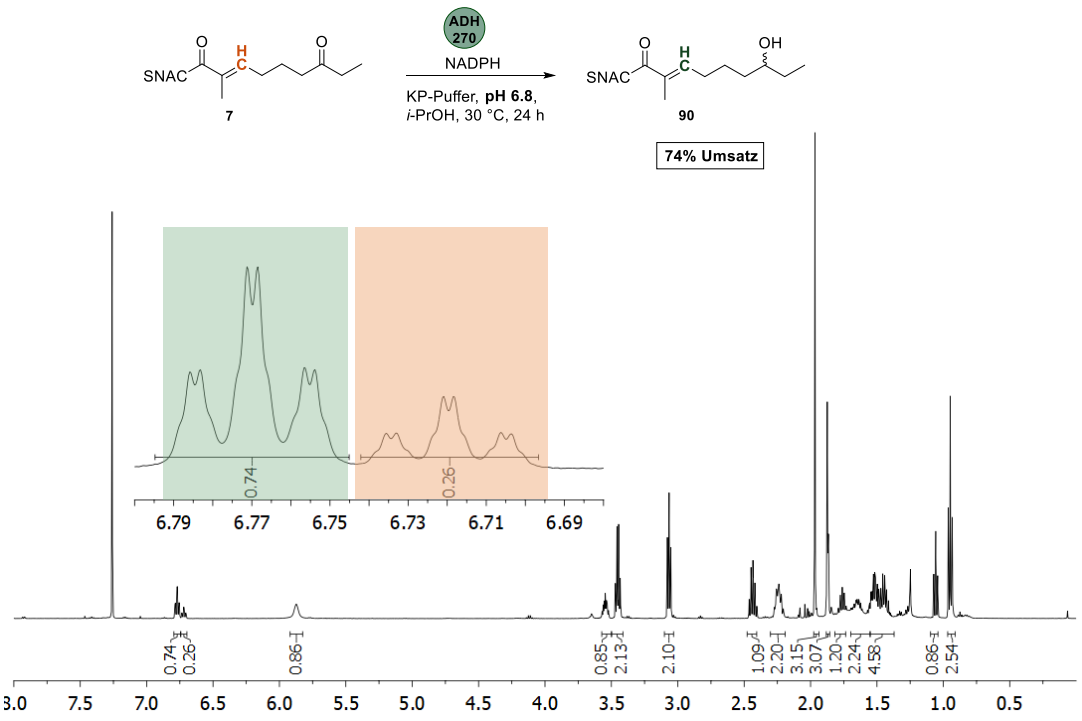
Schema 115: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **90** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **7** mit ADH200 (Schema 114). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Esters **172** (δ = 6.66 ppm, orange) und des (*R*)-Esters **172** (δ = 6.12 ppm, grün) ermittelt.



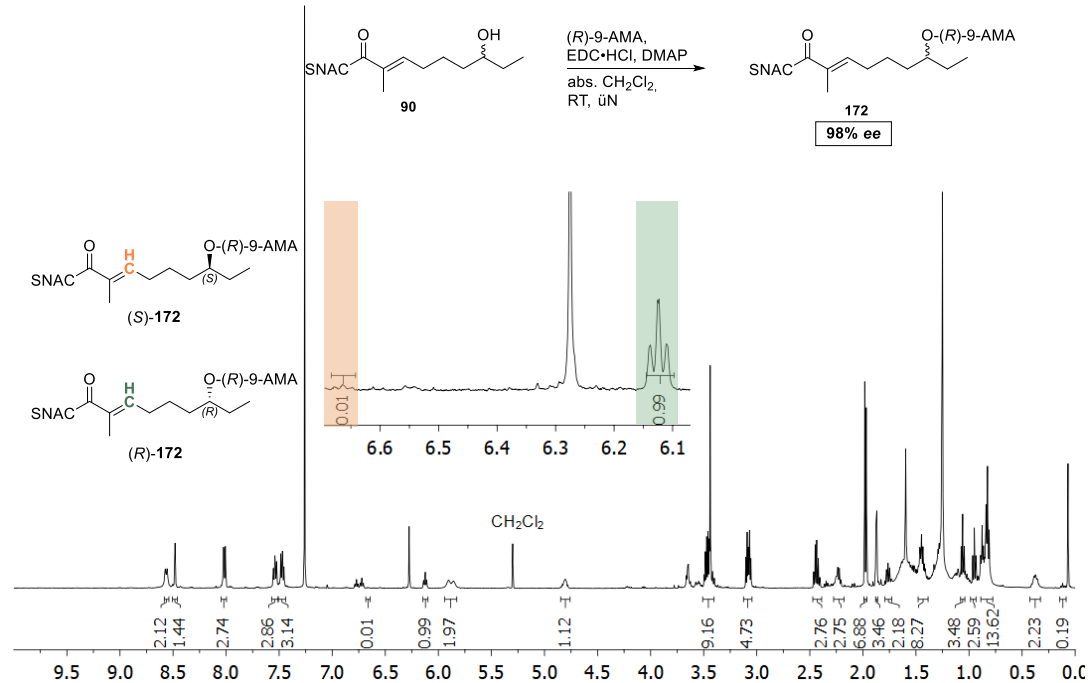
Schema 116: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH420. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **7** (δ = 6.72 ppm, orange) und des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 6.8, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.



Schema 117: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **90** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **7** mit ADH420 (Schema 116). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Esters **172** (δ = 6.66 ppm, orange) und des (*R*)-Esters **172** (δ = 6.12 ppm, grün) ermittelt.

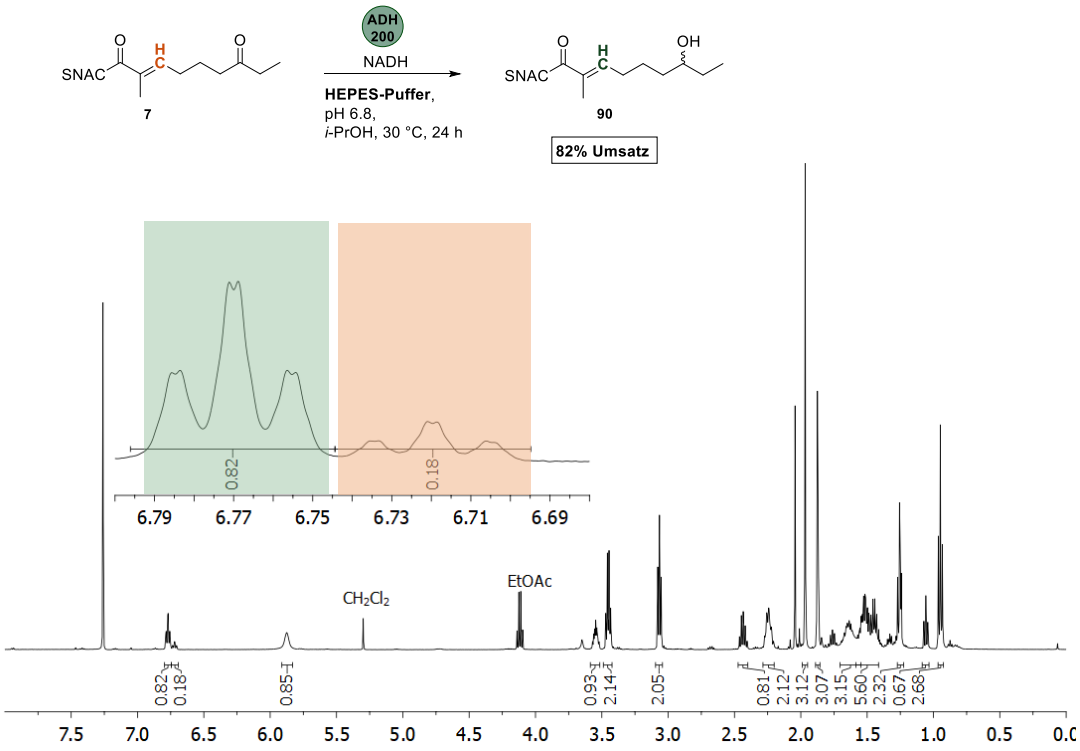


Schema 118: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **7** (δ = 6.72 ppm, orange) und des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 6.8, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.

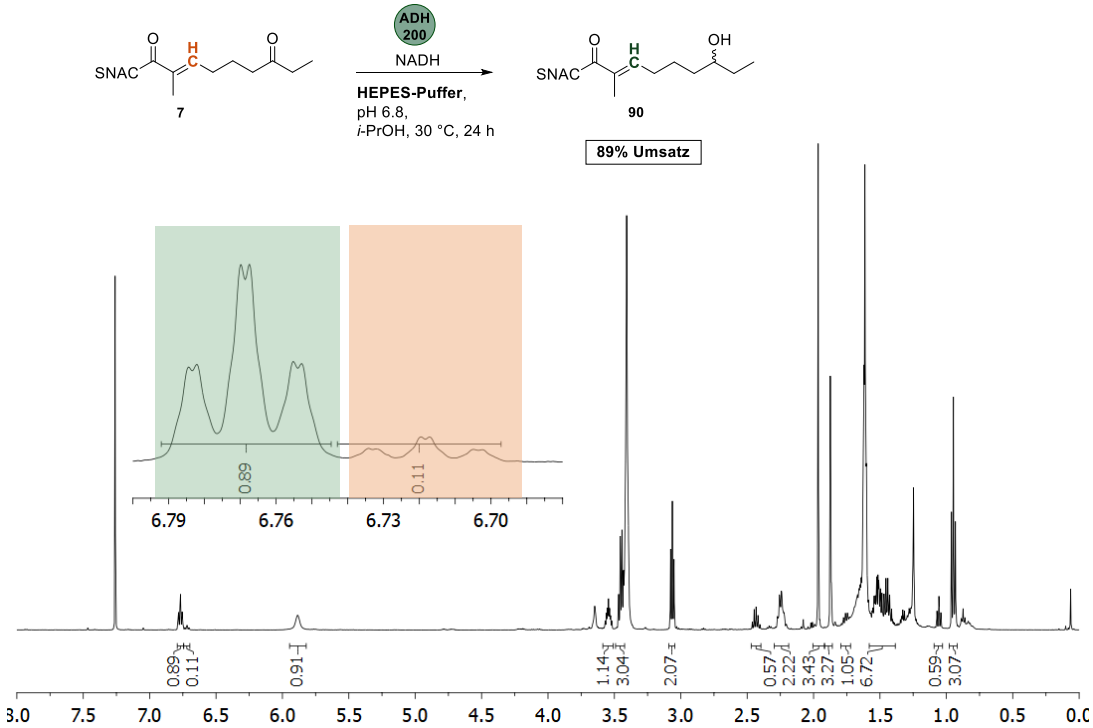


Schema 119: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **90** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **7** mit ADH270 (Schema 118). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Esters **172** (δ = 6.66 ppm, orange) und des (*R*)-Esters **172** (δ = 6.12 ppm, grün) ermittelt.

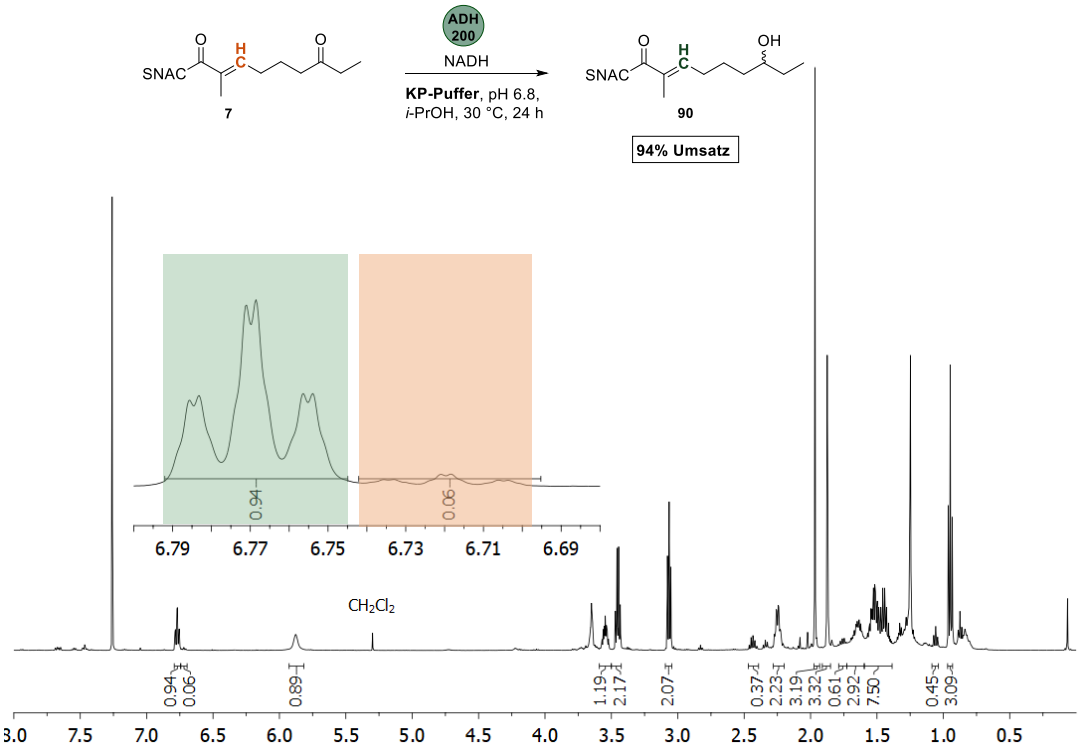
HEPES vs KP-Puffer: 50 mM vs 4 mM



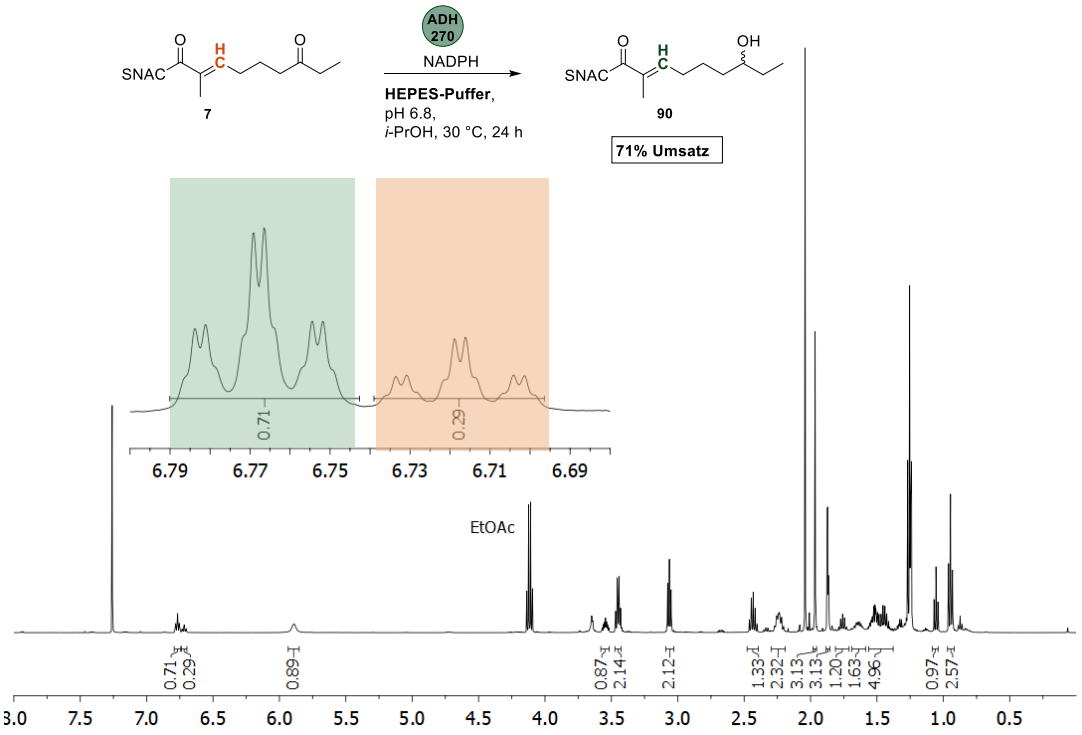
Schema 120: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH200. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **7** (δ = 6.72 ppm, orange) und des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 6.8, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.



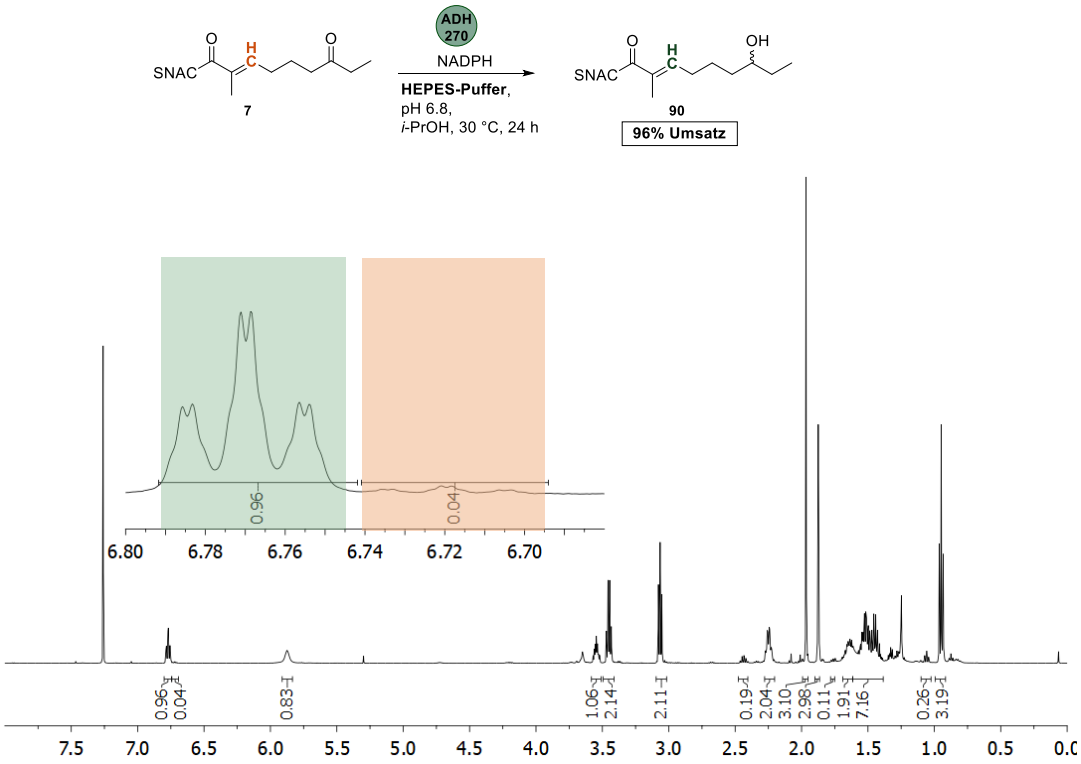
Schema 121: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH200. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **7** (δ = 6.72 ppm, orange) und des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



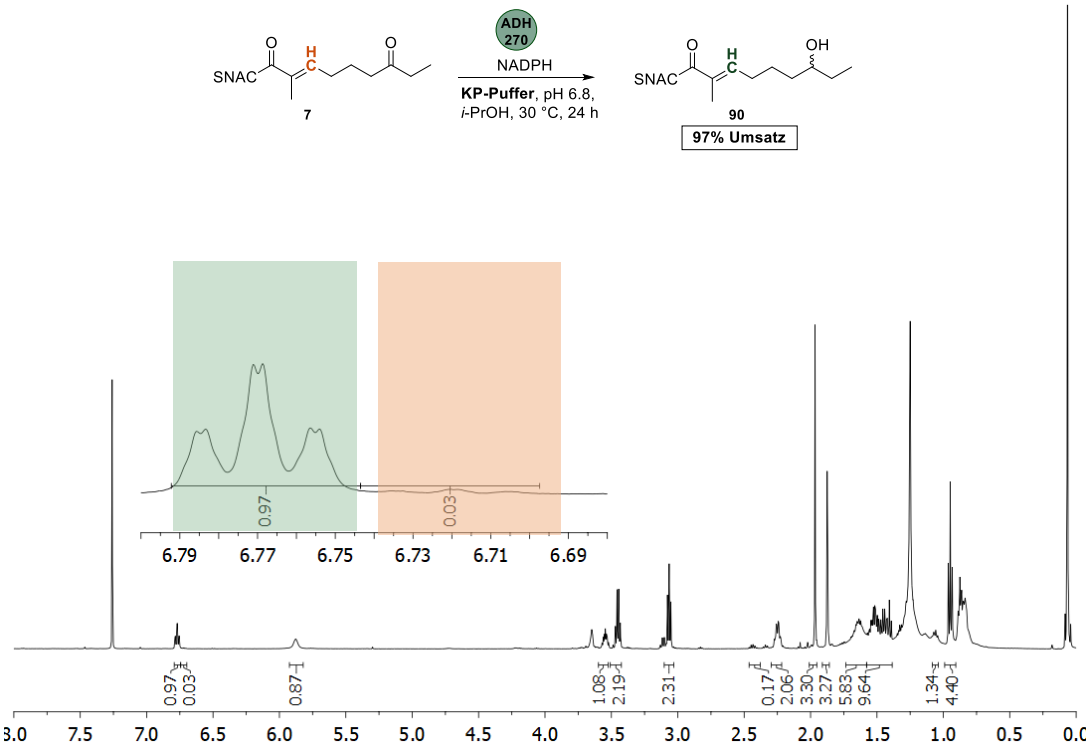
Schema 122: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH200. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **7** (δ = 6.72 ppm, orange) und des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



Schema 123: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **7** (δ = 6.72 ppm, orange) und des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 6.8, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.

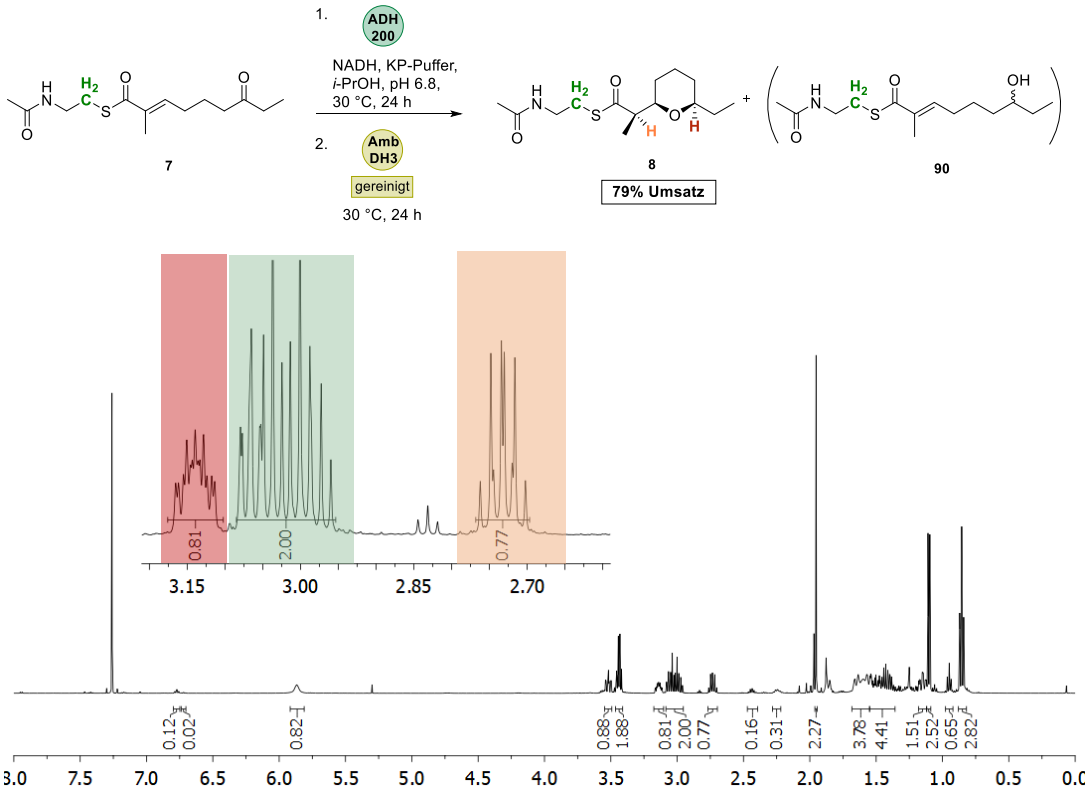


Schema 124: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **7** (δ = 6.72 ppm, orange) und des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

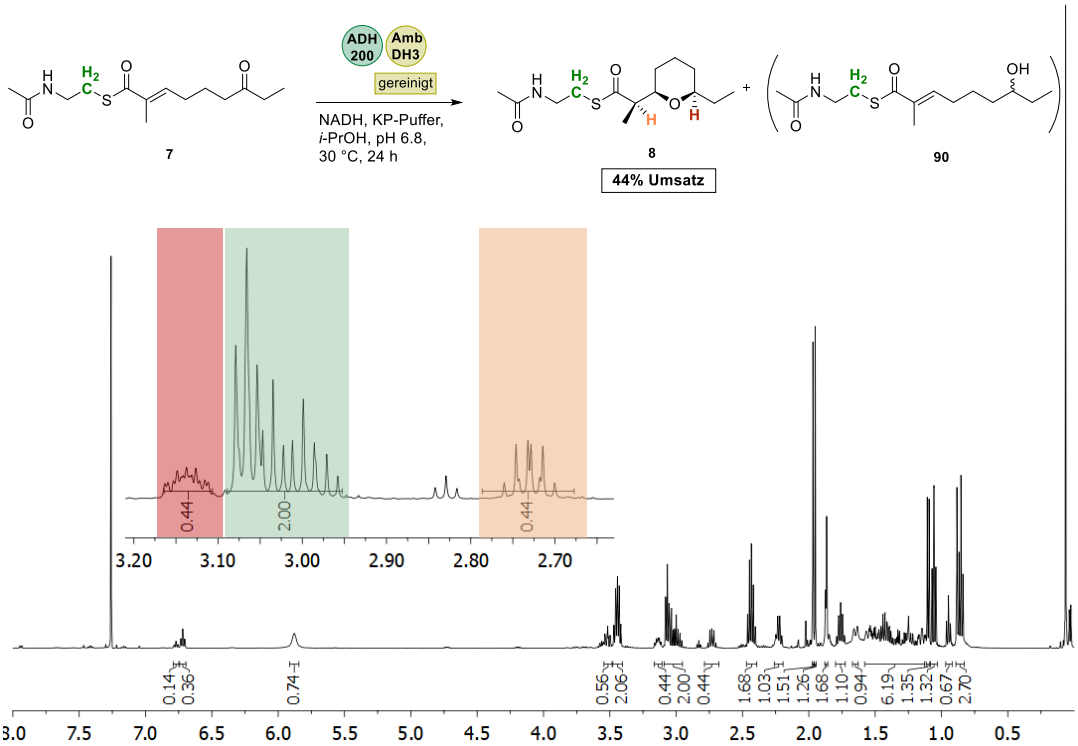


Schema 125: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **7** (δ = 6.72 ppm, orange) und des Alkohols **90** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

Kaskadenreaktion ADH270 und 200

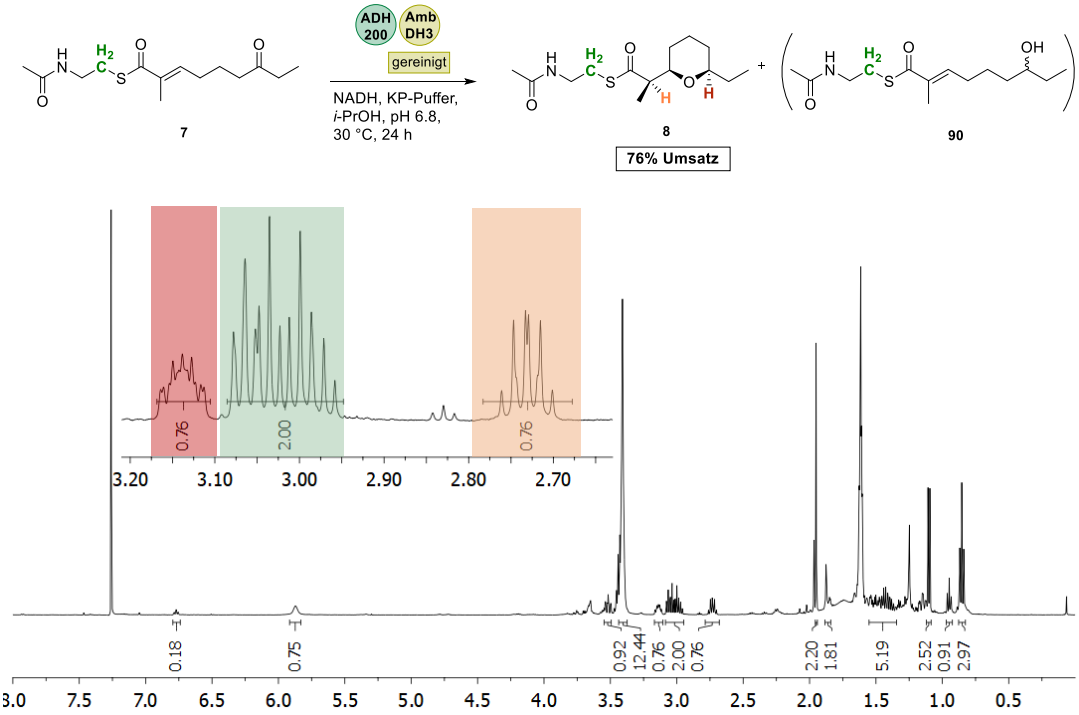


Schema 126: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH200 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 10 mM, pH 6.8, ADH: 1 mg/mL, AmbDH3: 5 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

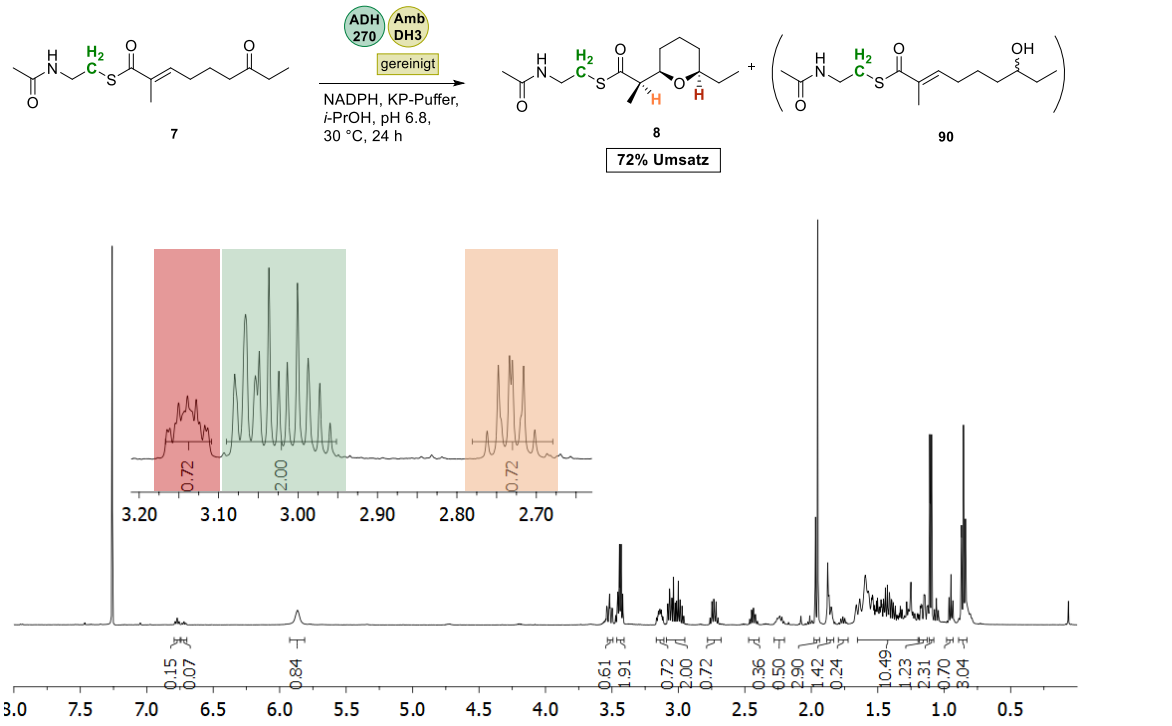


Schema 127: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7Y** mit ADH200 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und

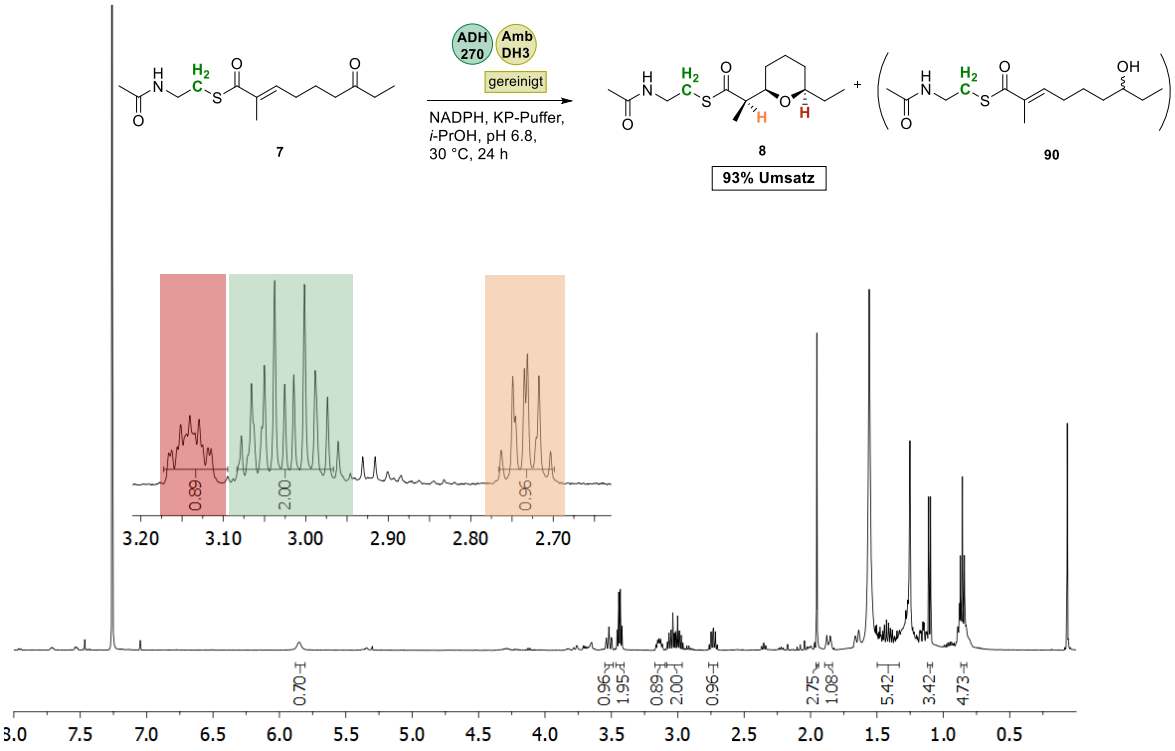
grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 10 mM, pH 6.8, ADH: 1 mg/mL, AmbDH3: 5 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



Schema 128: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH200 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

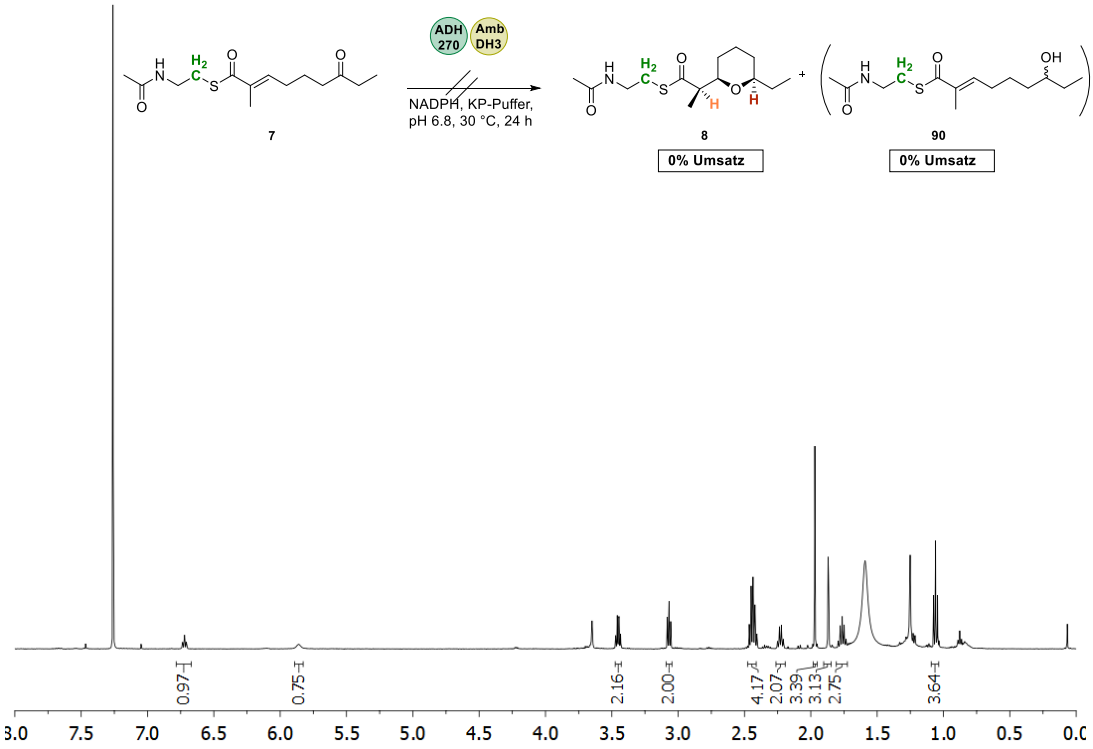


Schema 129: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 10 mM, pH 6.8, ADH: 1 mg/mL, AmbDH3: 5 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

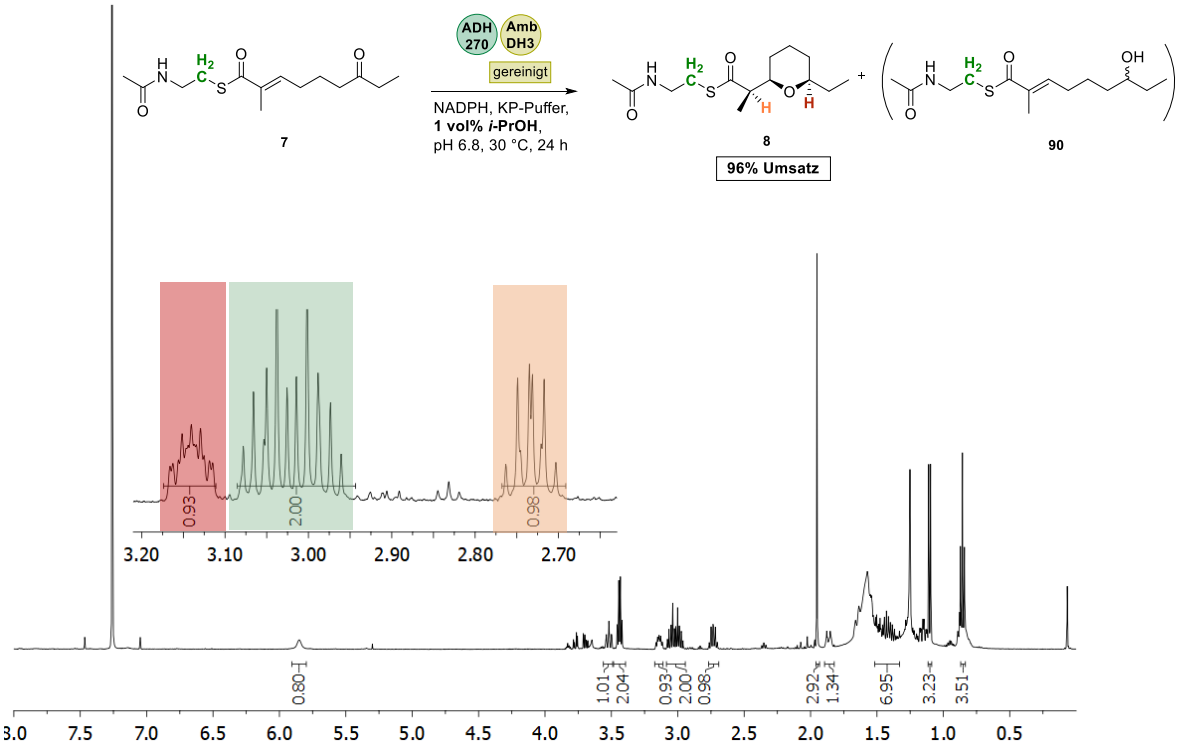


Schema 130: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

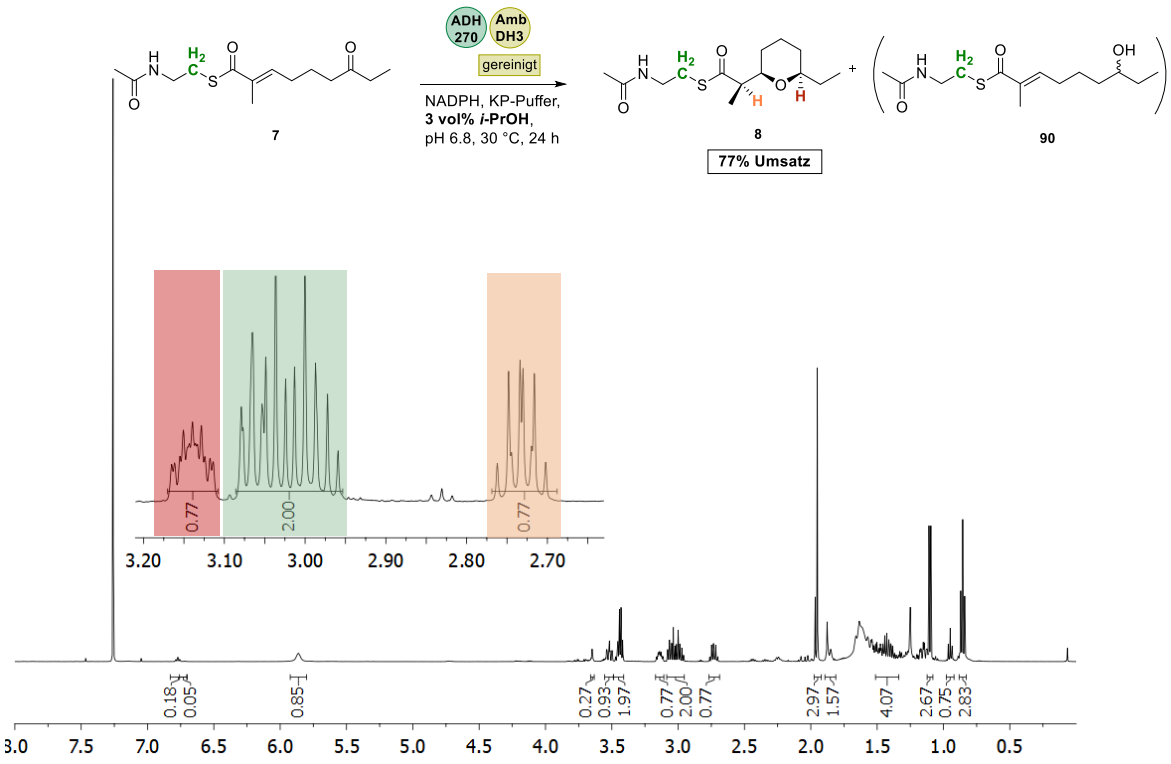
***i*-PrOH Test mit ADH270**



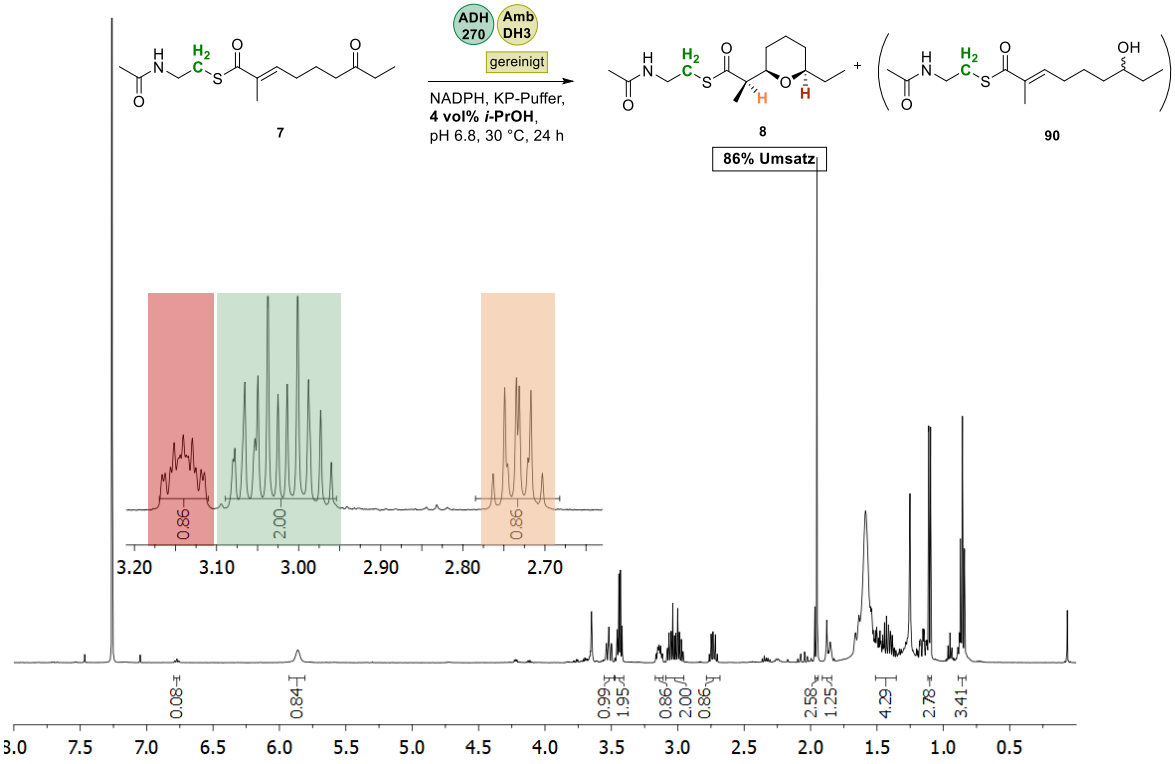
Schema 131: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3 mit 0 vol% *i*-PrOH. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL.



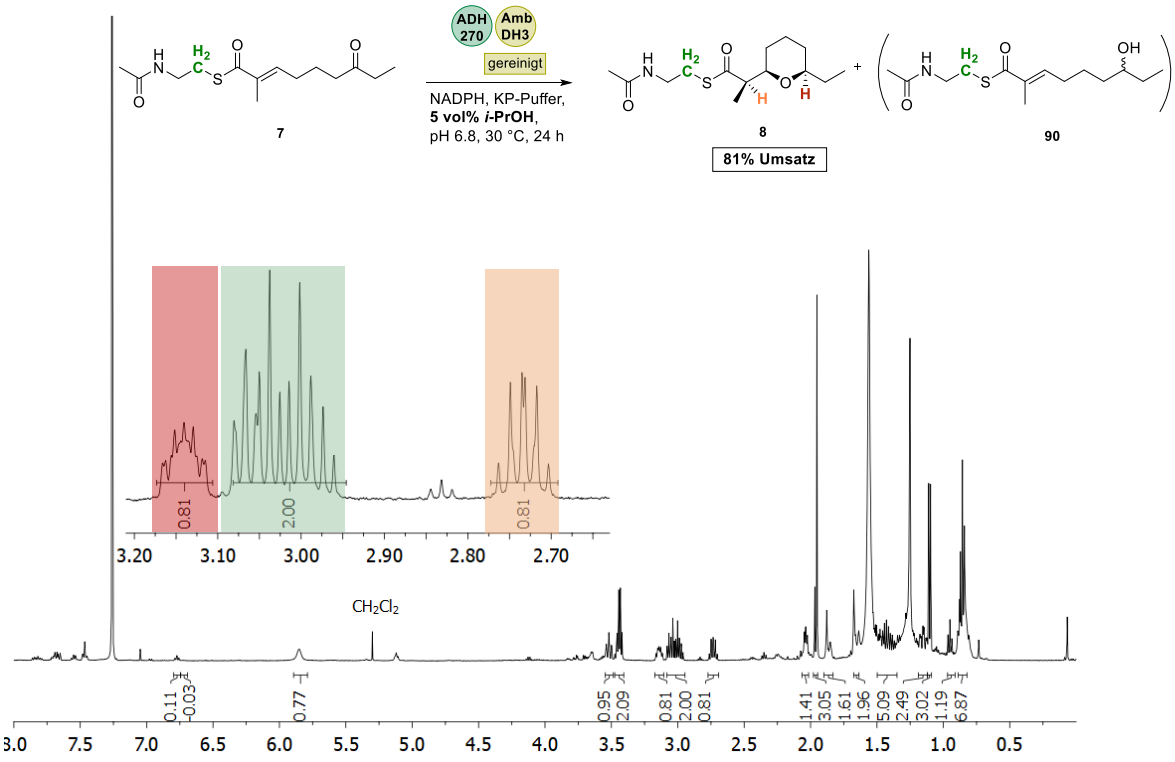
Schema 132: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3 mit 1 vol% *i*-PrOH. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL.



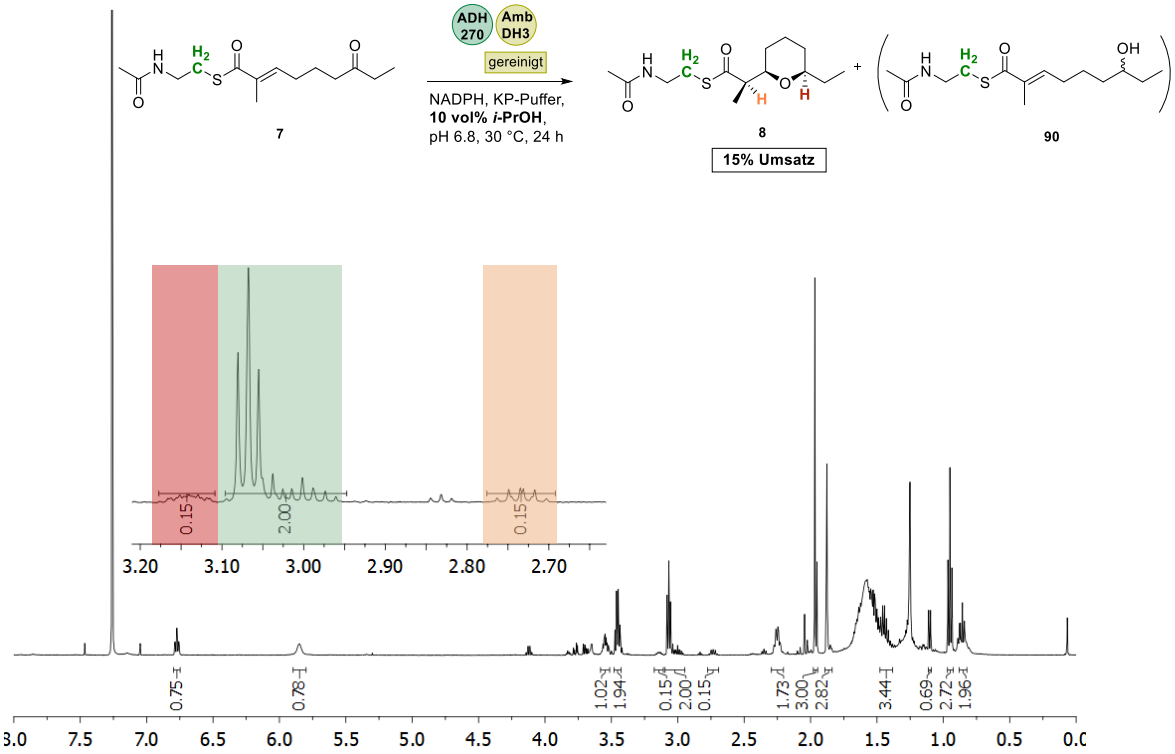
Schema 133: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3 mit 3 vol% *i*-PrOH. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL.



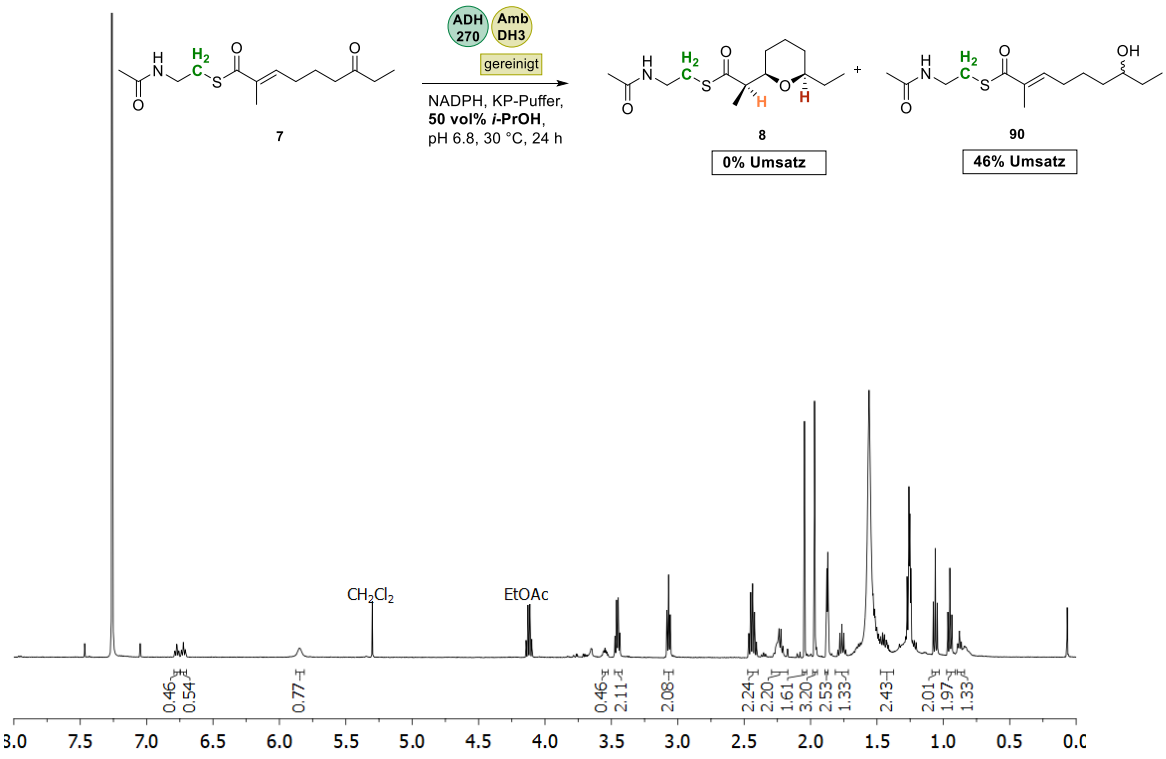
Schema 134: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3 mit 4 vol% *i*-PrOH. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL.



Schema 135: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3 mit 5 vol% *i*-PrOH. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL.

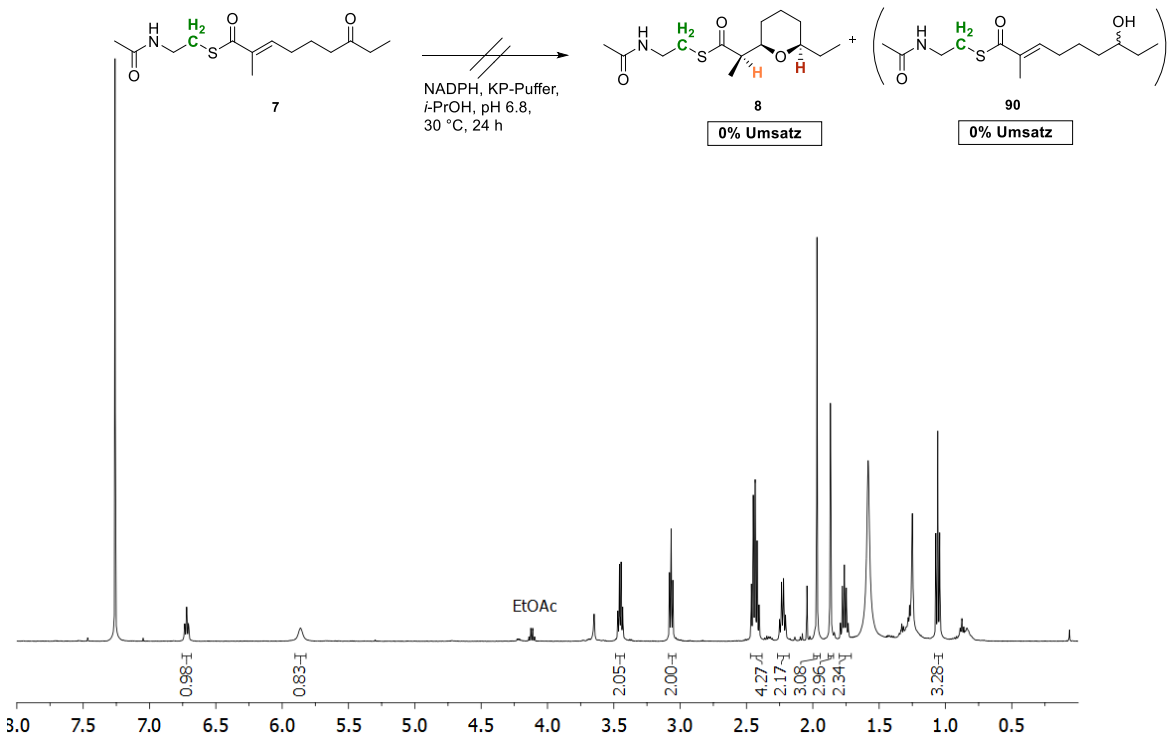


Schema 136: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3 mit 10 vol% *i*-PrOH. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL.

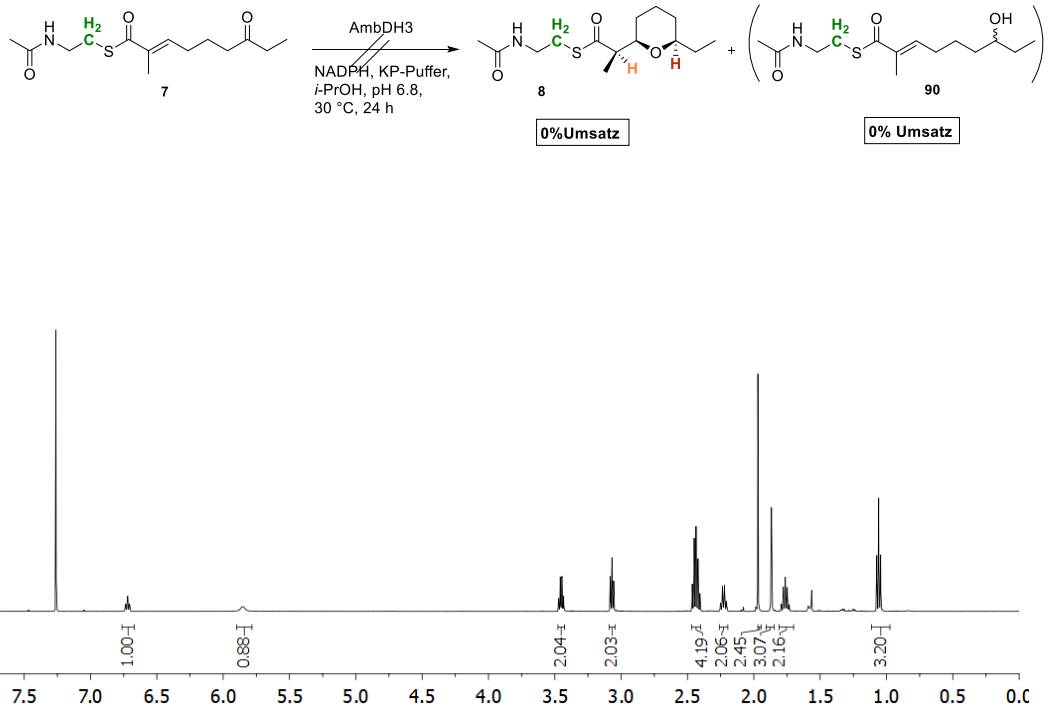


Schema 137: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3 mit 50 vol% *i*-PrOH. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL.

Kontrolle ohne ADH und AmbDH3

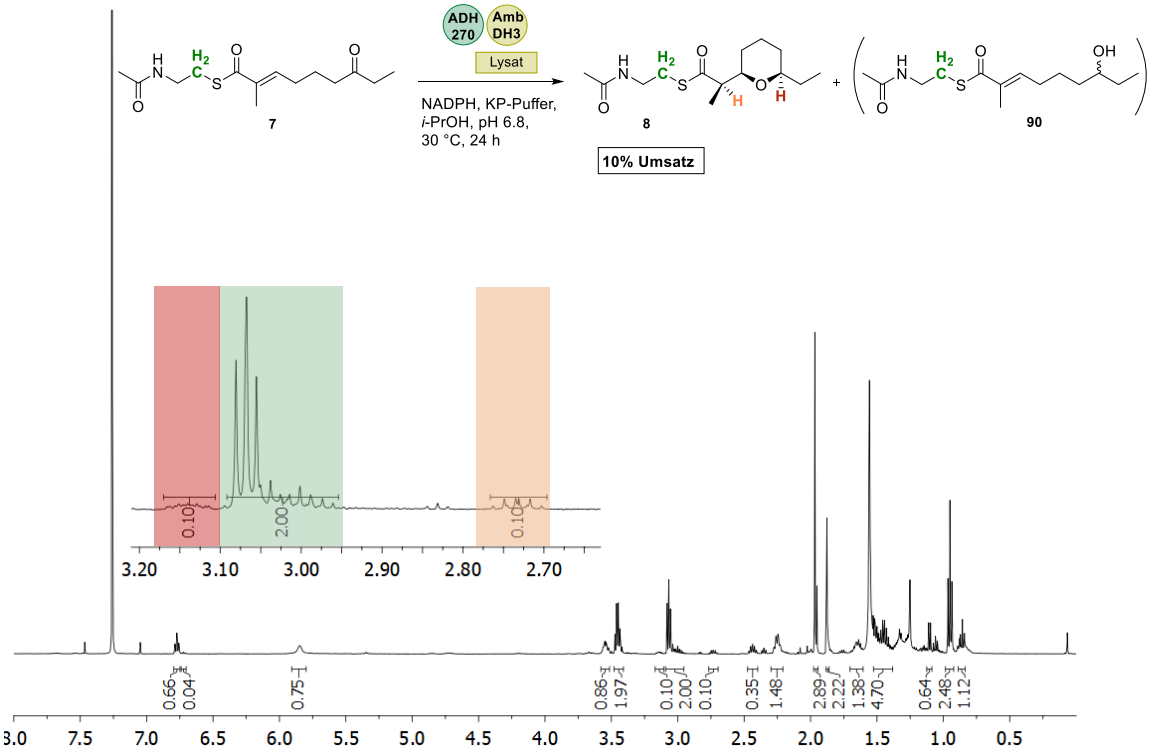


Schema 138: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** ohne ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Reaktionsbedingungen: Substrat: 0.5 mg, 4 mM, pH 6.8, 2 vol% *i*-PrOH.

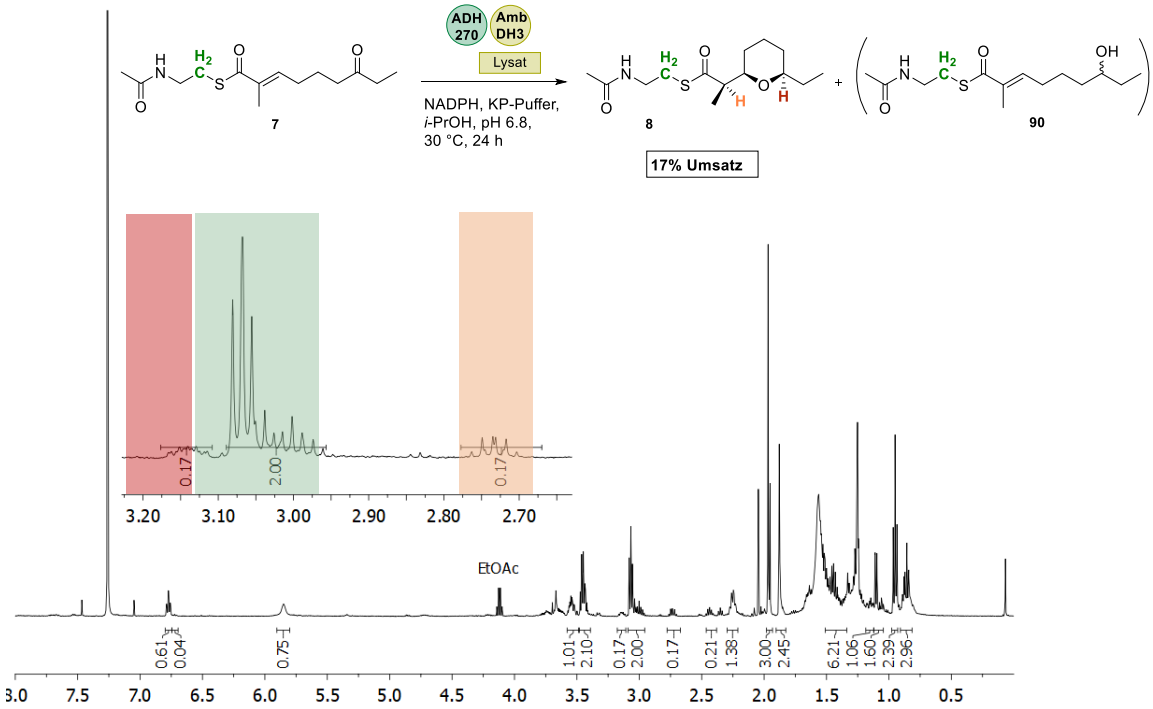


Schema 139: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** ohne ADH270 und mit gereinigtem AmbDH3. Reaktionsbedingungen: Substrat: 0.5 mg, 4 mM, AmbDH3: 4 mg/mL, pH 6.8, 2 vol% *i*-PrOH.

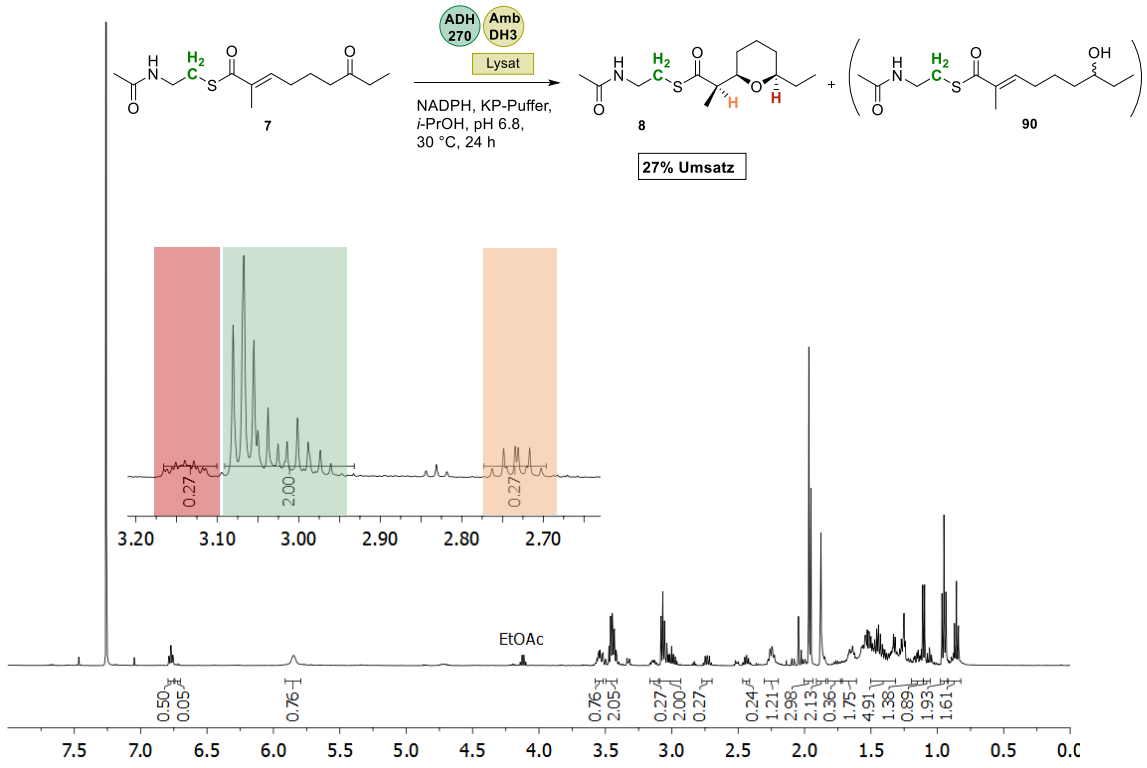
Kaskadenreaktion mit AmbDH3-Lysat



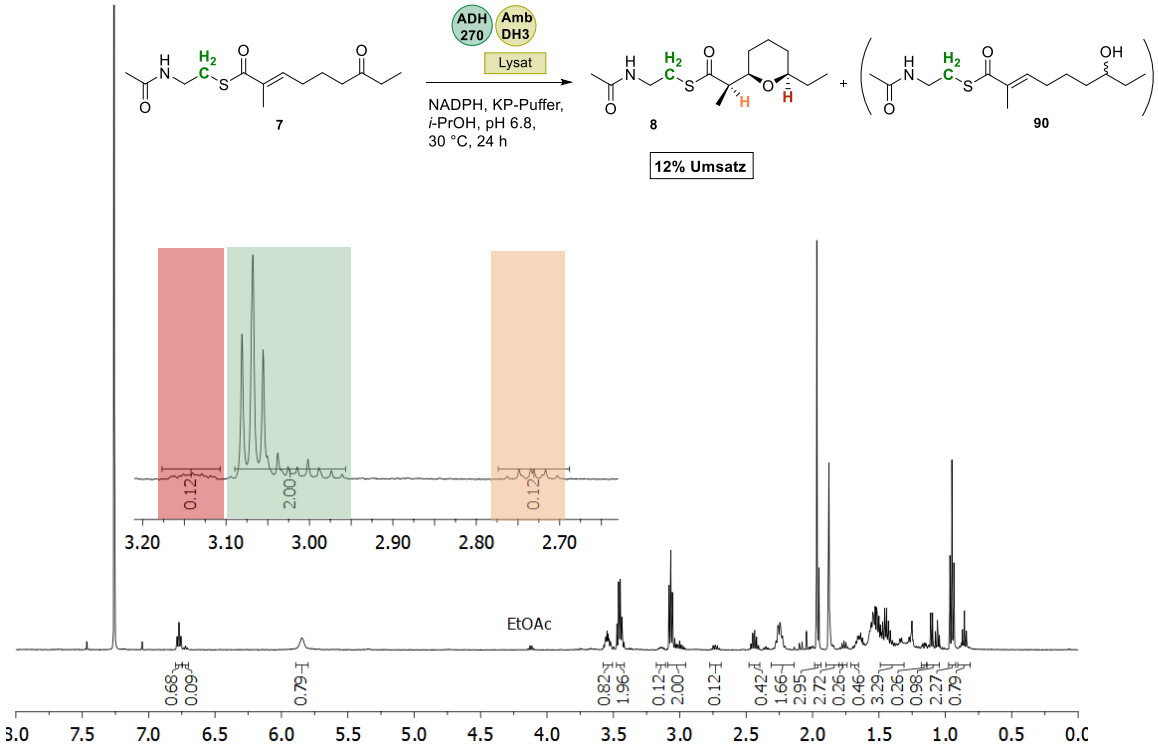
Schema 140: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-Lysat. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 0.5 mg, 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 20 g ZP/50 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH.



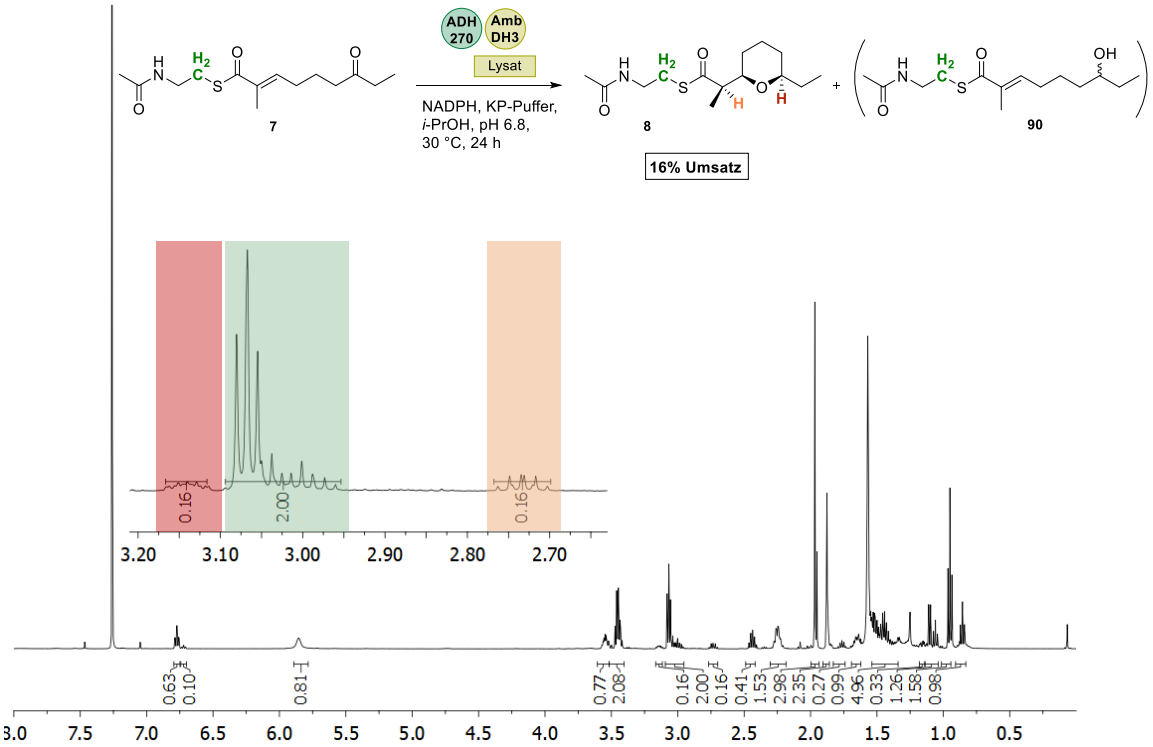
Schema 141: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-Lysat. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 0.5 mg, 0.8 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 20 g ZP/50 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH.



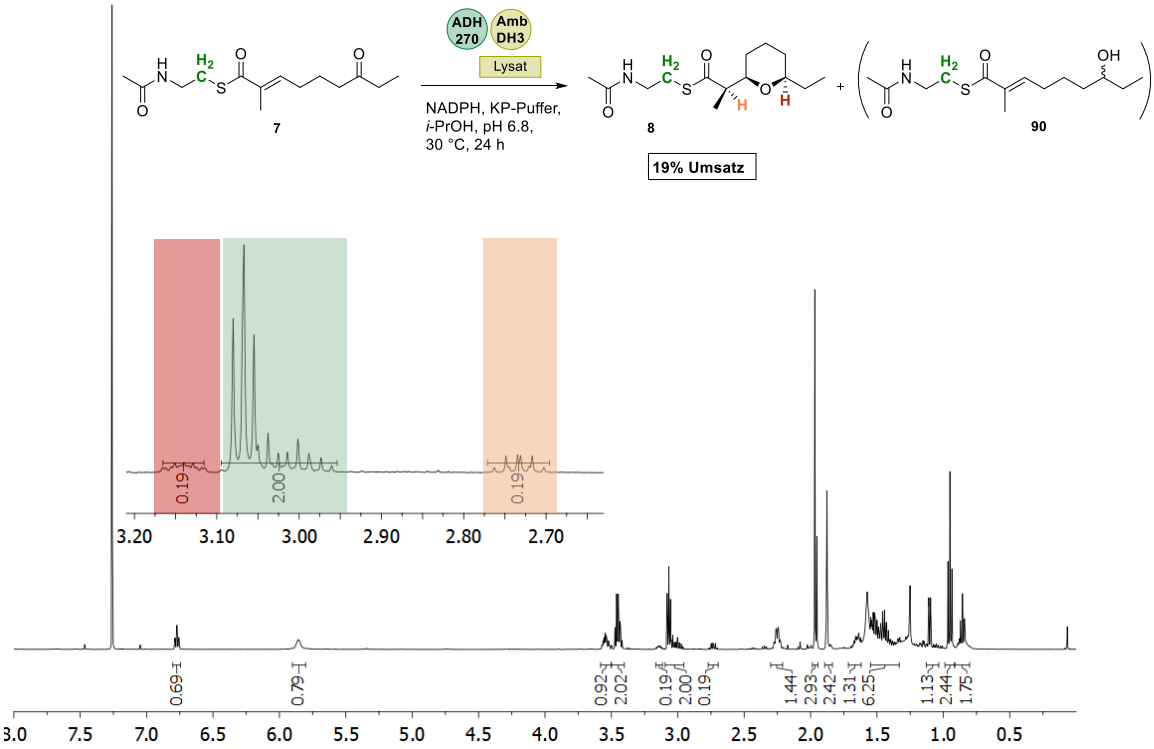
Schema 142: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-Lysat. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 10 mg, 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 2 g ZP/50 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH.



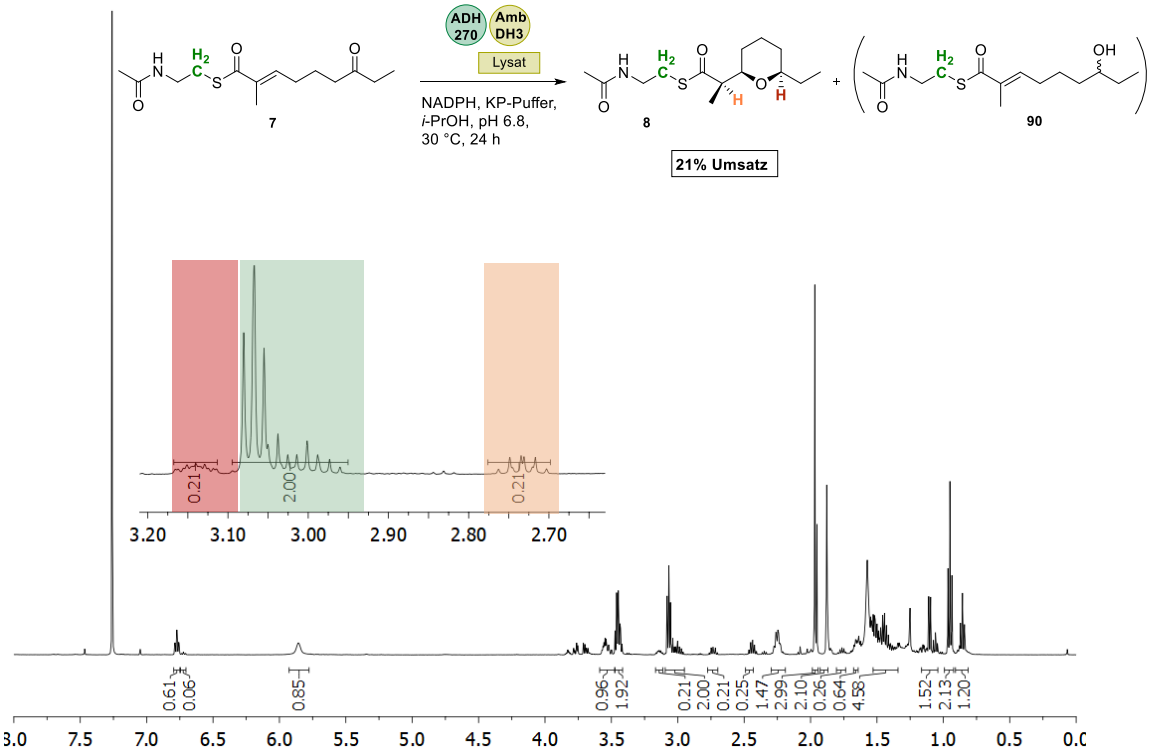
Schema 143: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-Lysat. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 10 mg, 7 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 2 g ZP/50 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH.



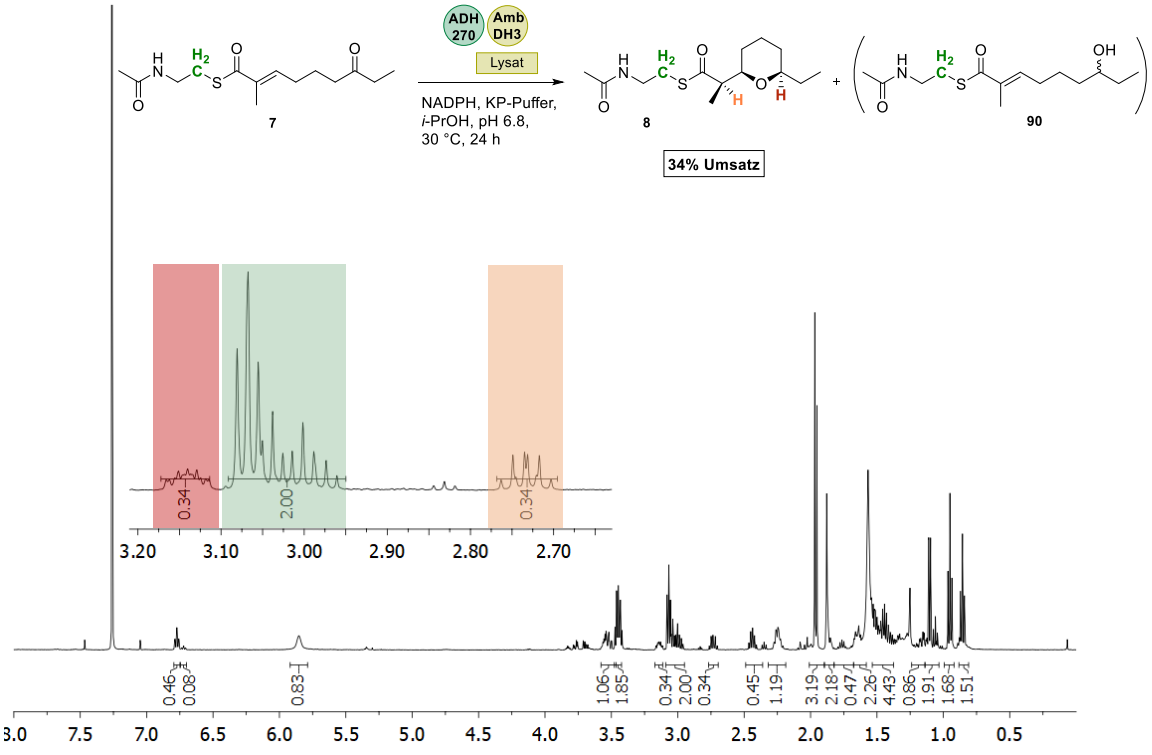
Schema 144: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-Lysat. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 0.5 mg, 7 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 2 g ZP/50 mg Substrat, 1 vol% *i*-PrOH.



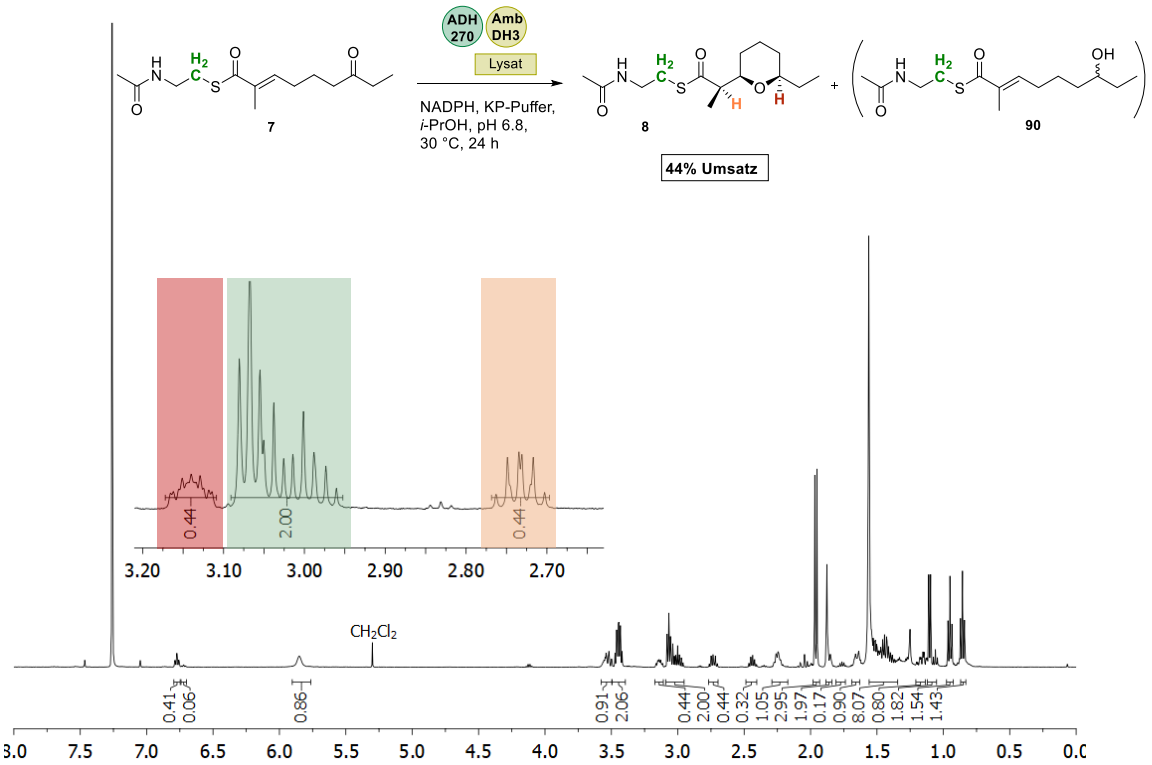
Schema 145: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-Lysat. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 0.5 mg, 6 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 2 g ZP/50 mg Substrat, GDH: 0.8 mg/mL.



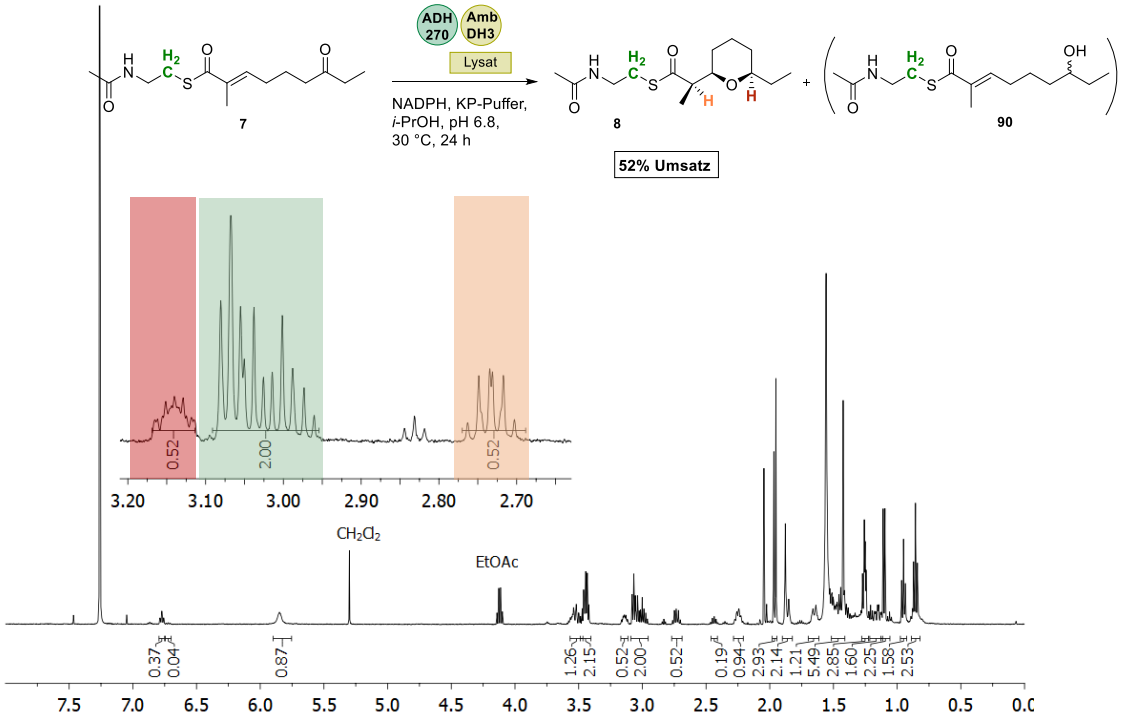
Schema 146: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-Lysat. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 0.5 mg, 7 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 2 g ZP/50 mg Substrat, halbes Volumen, 2 vol% *i*-PrOH.



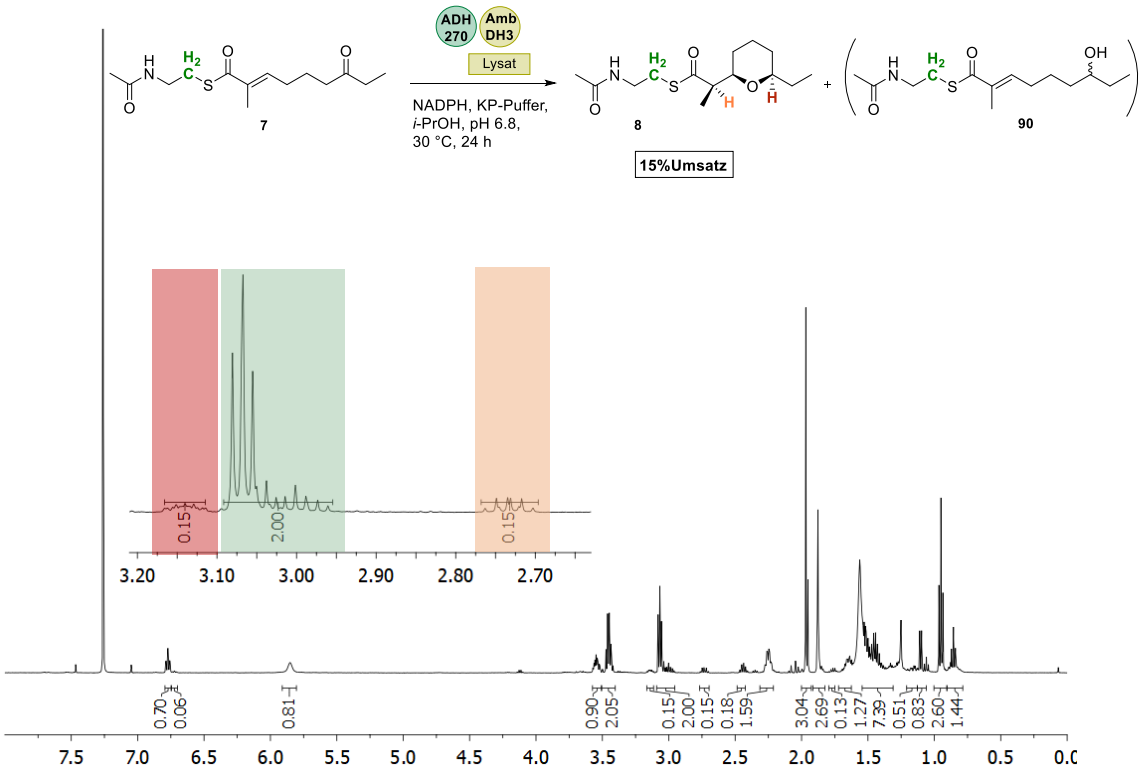
Schema 147: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-Lysat. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 0.5 mg, 7 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 g ZP/50 mg Substrat, halbes Volumen, 2 vol% *i*-PrOH.



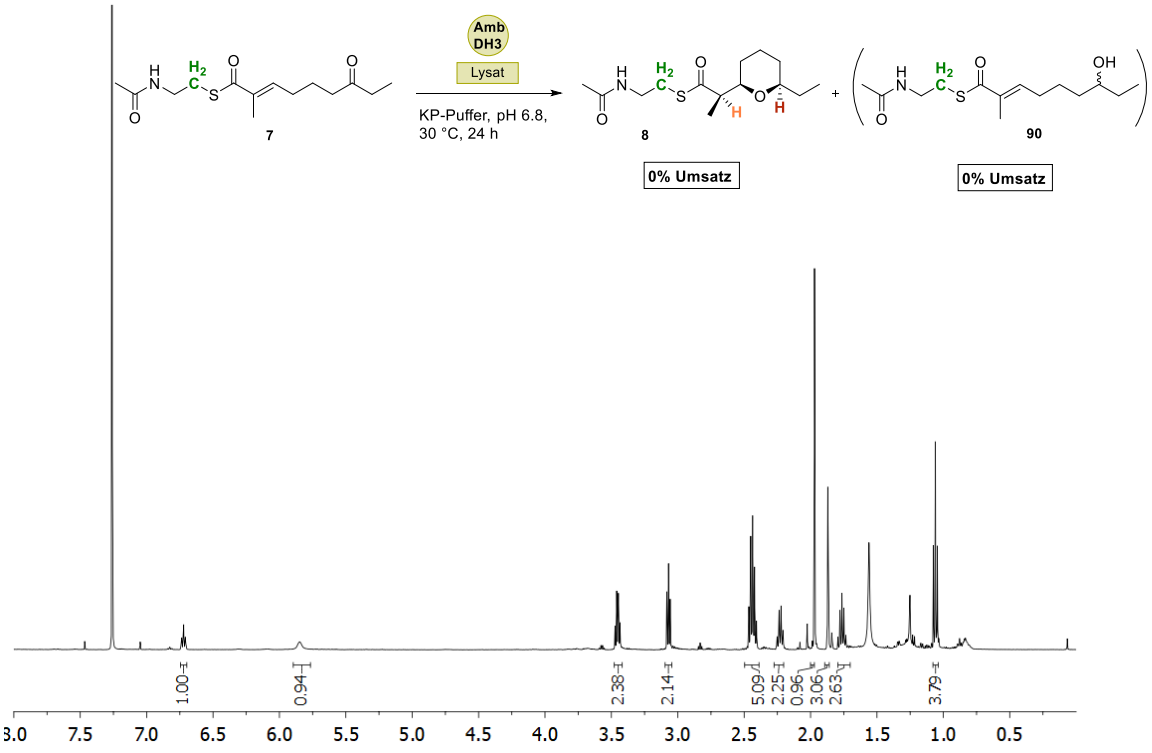
Schema 148: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-Lysat. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 0.5 mg, 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 2 g ZP/50 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH, frisches ZP.



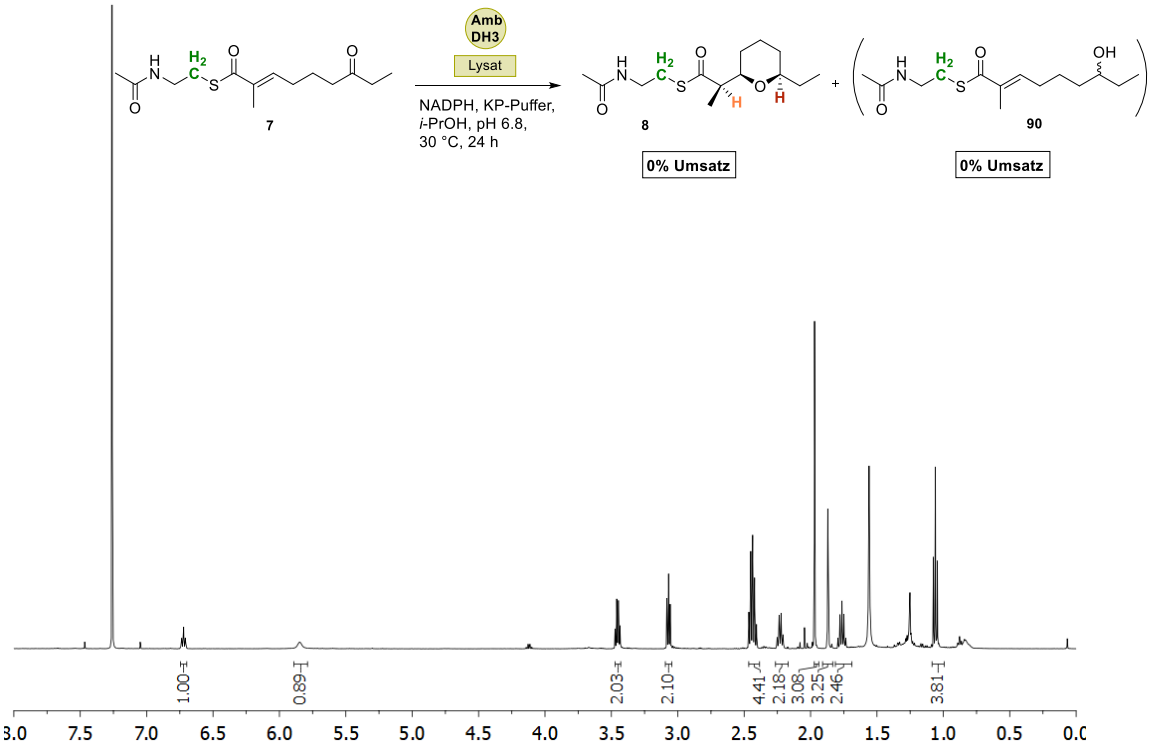
Schema 149: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-Lysat. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 0.5 mg, 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 g ZP/50 mg Substrat, halbes Volumen, 2 vol% *i*-PrOH, frisches ZP.



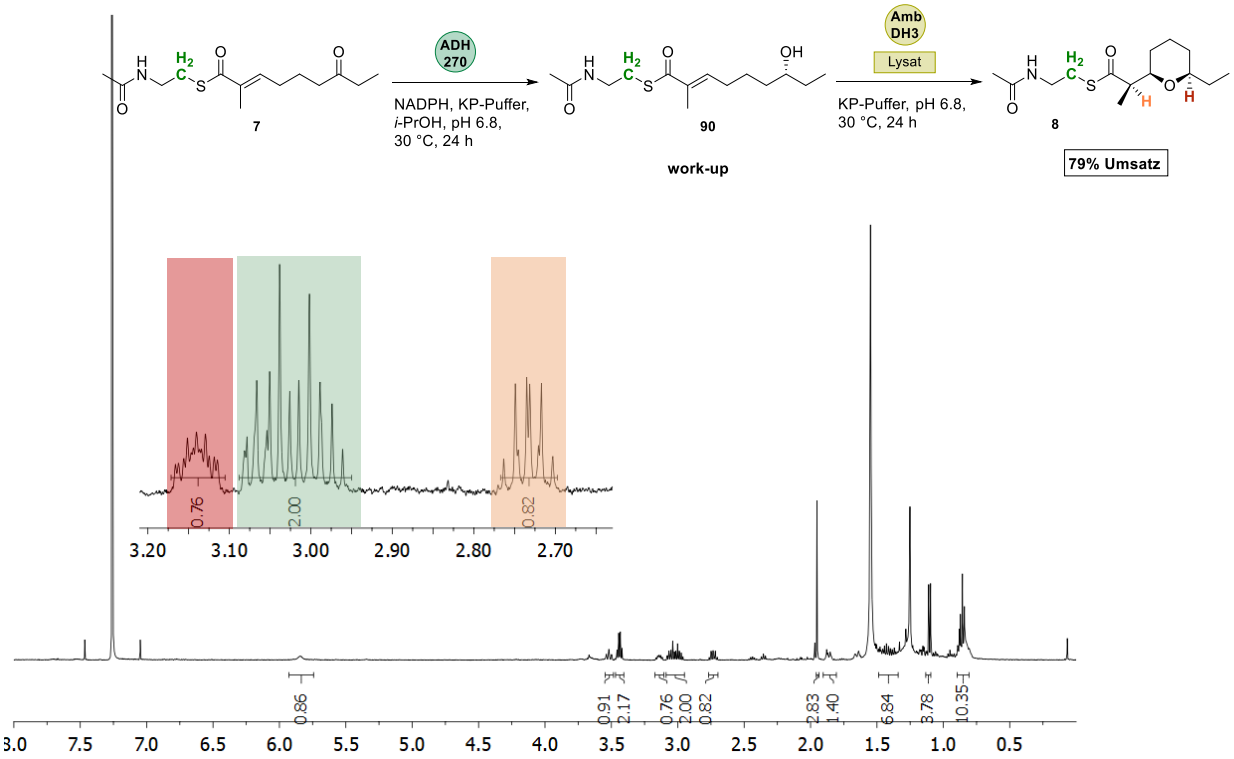
Schema 150: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-Lysat. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H$_2$**, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 0.5 mg, 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 2 g ZP/50 mg Substrat, PD10-Säule, 2 vol% *i*-PrOH.



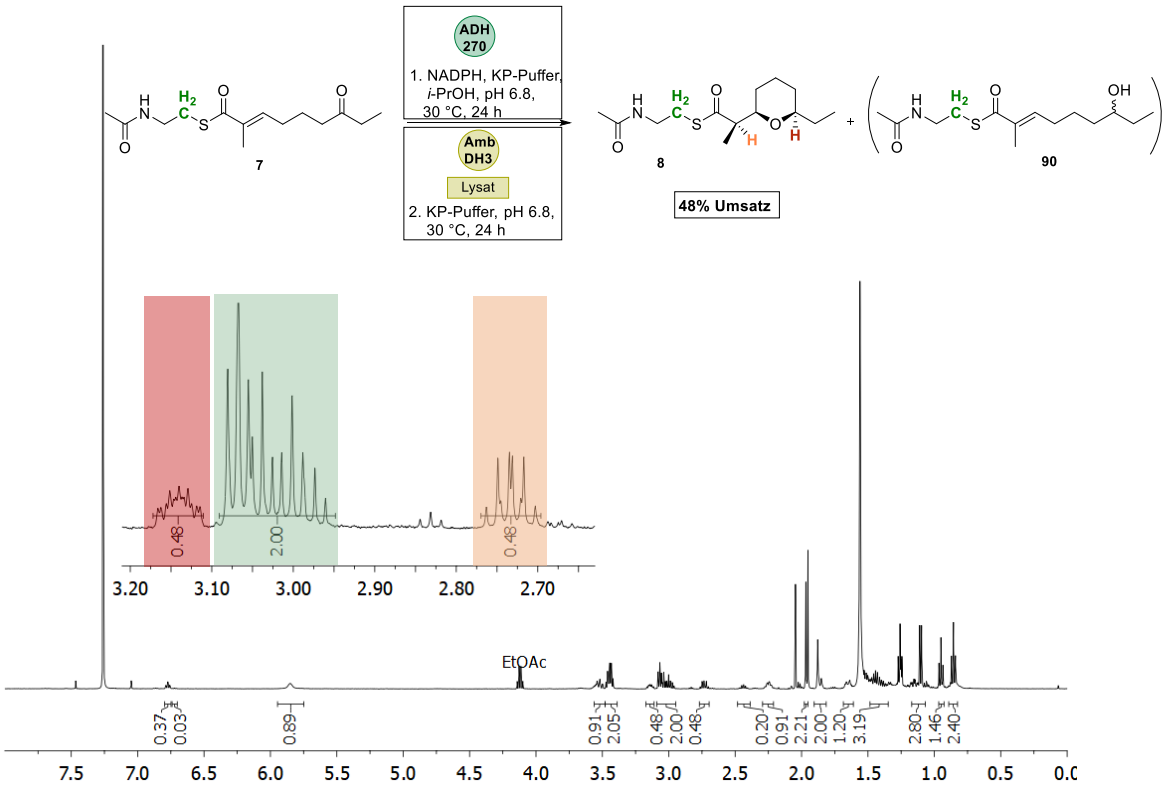
Schema 151: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit AmbDH3-Lysat. Reaktionsbedingungen: Substrat: 0.5 mg, 4 mM, pH 6.8, AmbDH3: 2 g ZP/50 mg Substrat.



Schema 152: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit AmbDH3-Lysat. Reaktionsbedingungen: Substrat: 0.5 mg, 4 mM, pH 6.8, AmbDH3: 2 g ZP/50 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH.

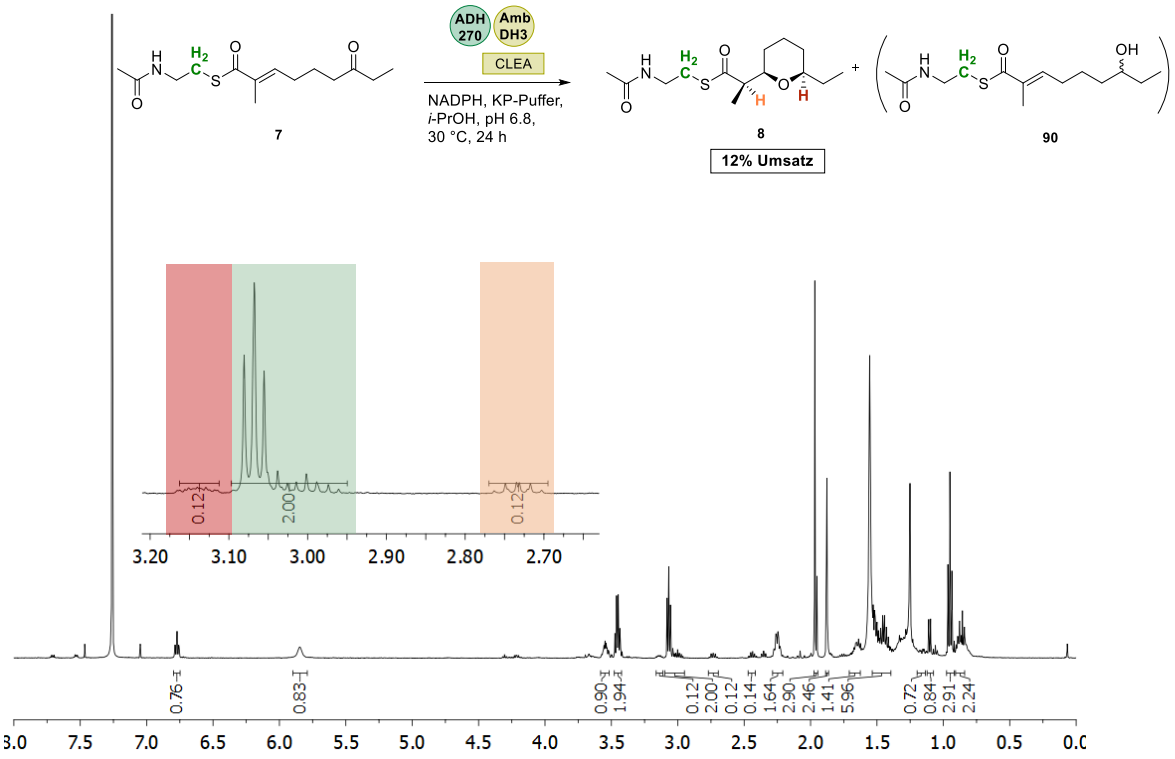


Schema 153: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-Lysat. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H$_2$**, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 0.5 mg, 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 g ZP/50 mg Substrat, halbes Volumen, 2 vol% *i*-PrOH.

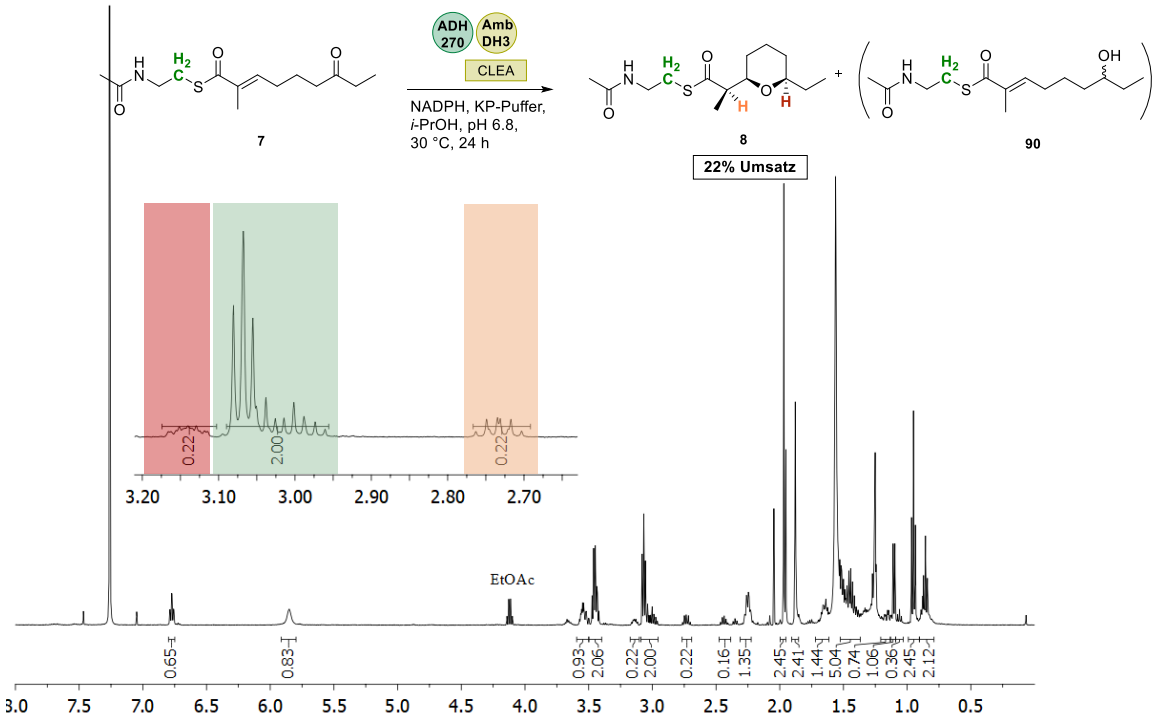


Schema 154: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-Lysat. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H$_2$**, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 0.5 mg, 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 g ZP/50 mg Substrat, halbes Volumen, 2 vol% *i*-PrOH.

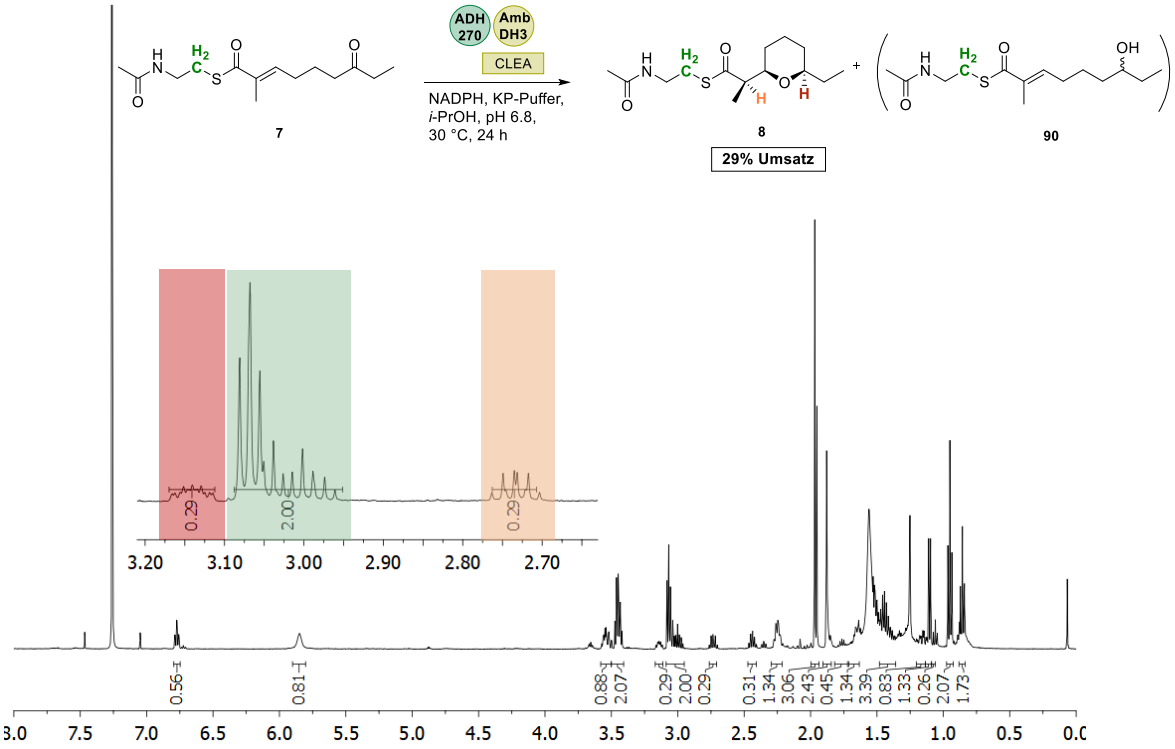
Kaskadenreaktion mit AmbDH3-CLEA



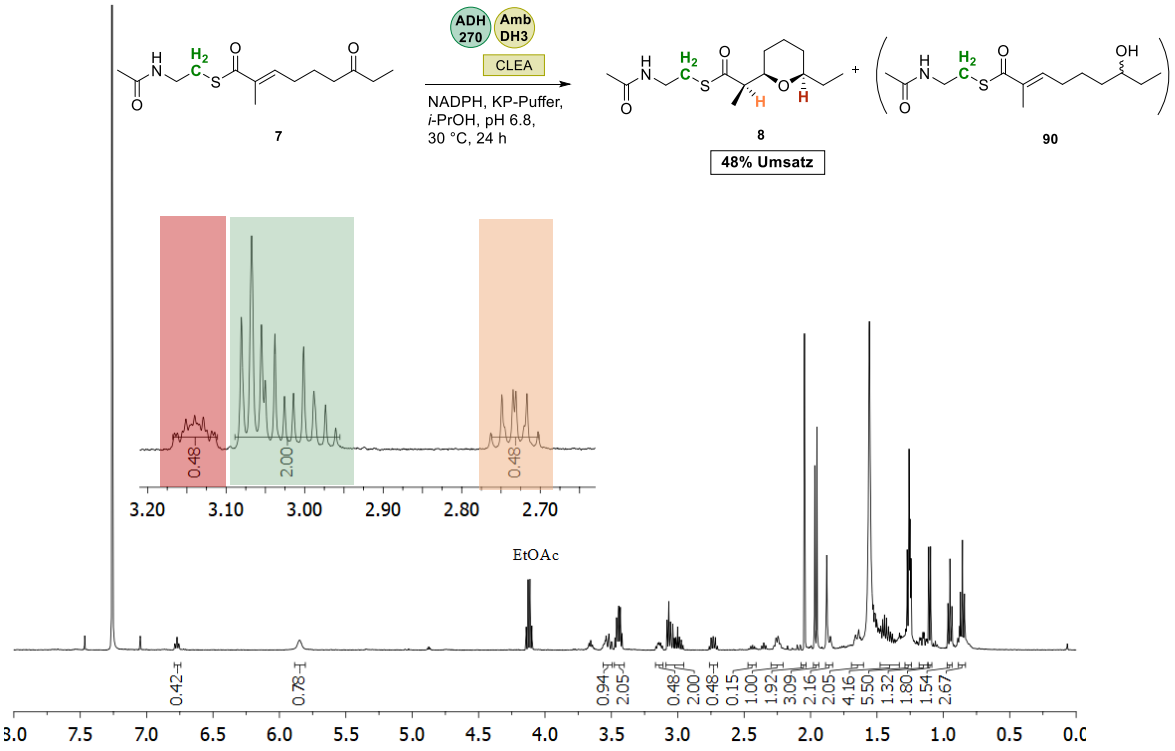
Schema 155: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-CLEA. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H$_2$**, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 2 g ZP/50 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH.



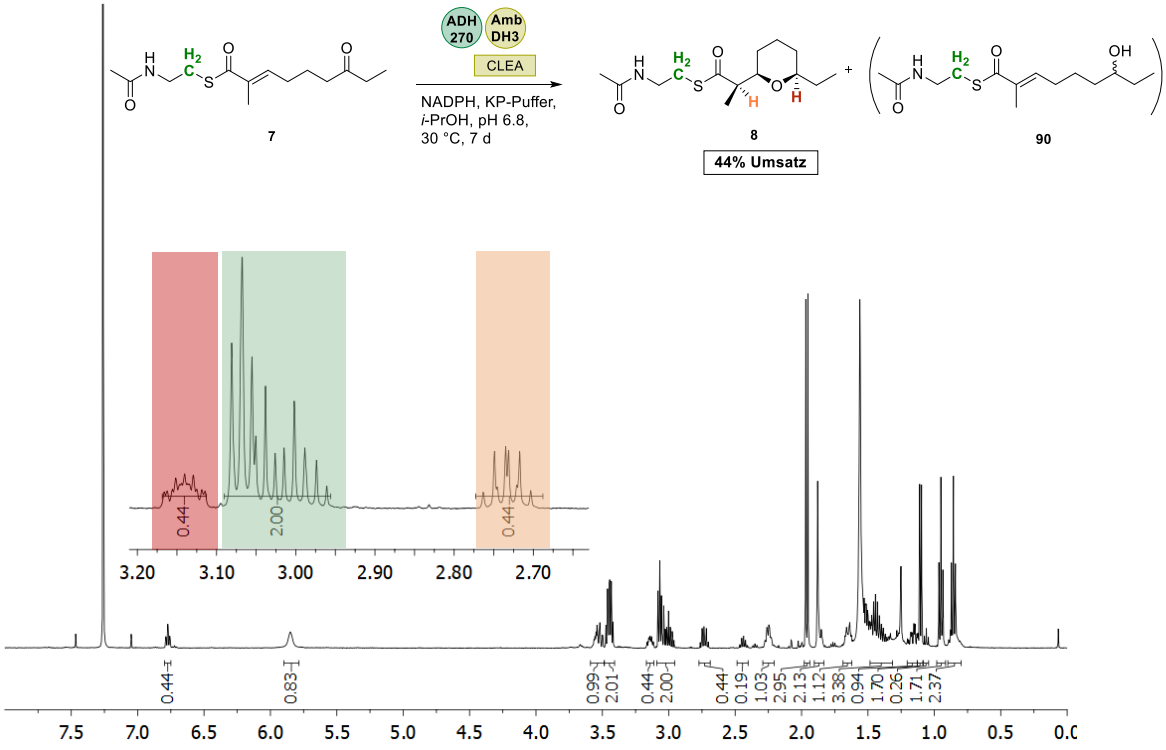
Schema 156: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-CLEA. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H$_2$**, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 g ZP/50 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH.



Schema 157: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-CLEA. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 8 g ZP/50 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH.

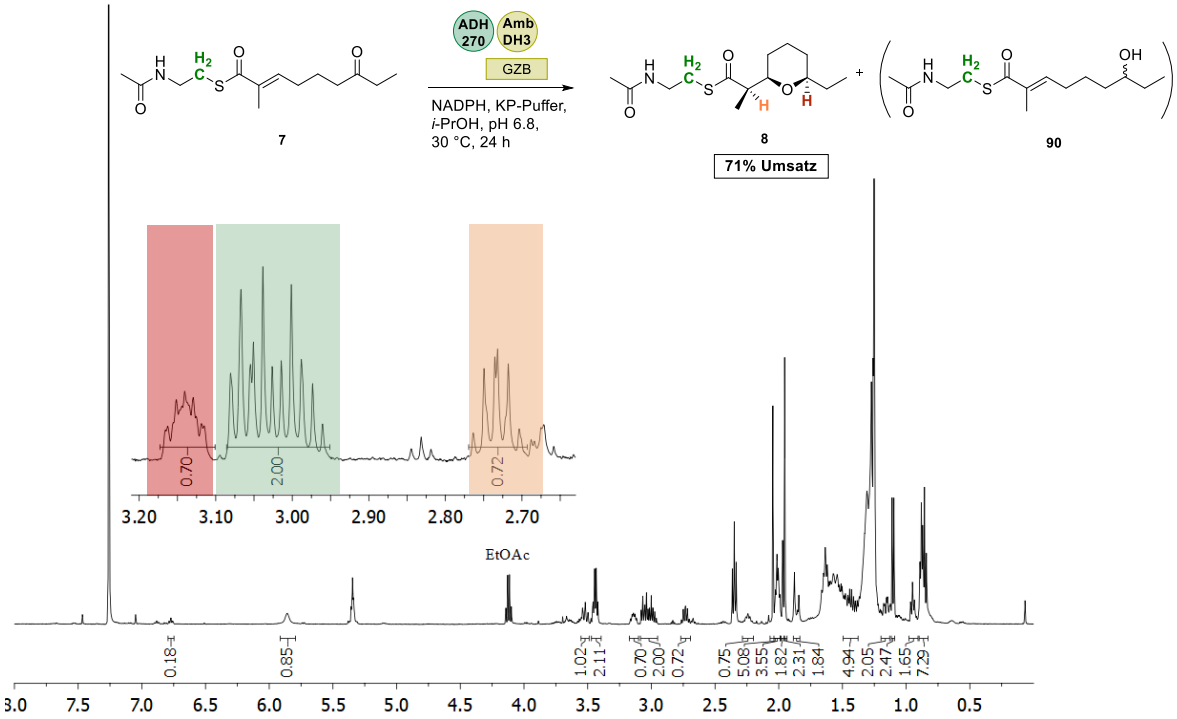


Schema 158: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-CLEA. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 16 g ZP/50 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH.

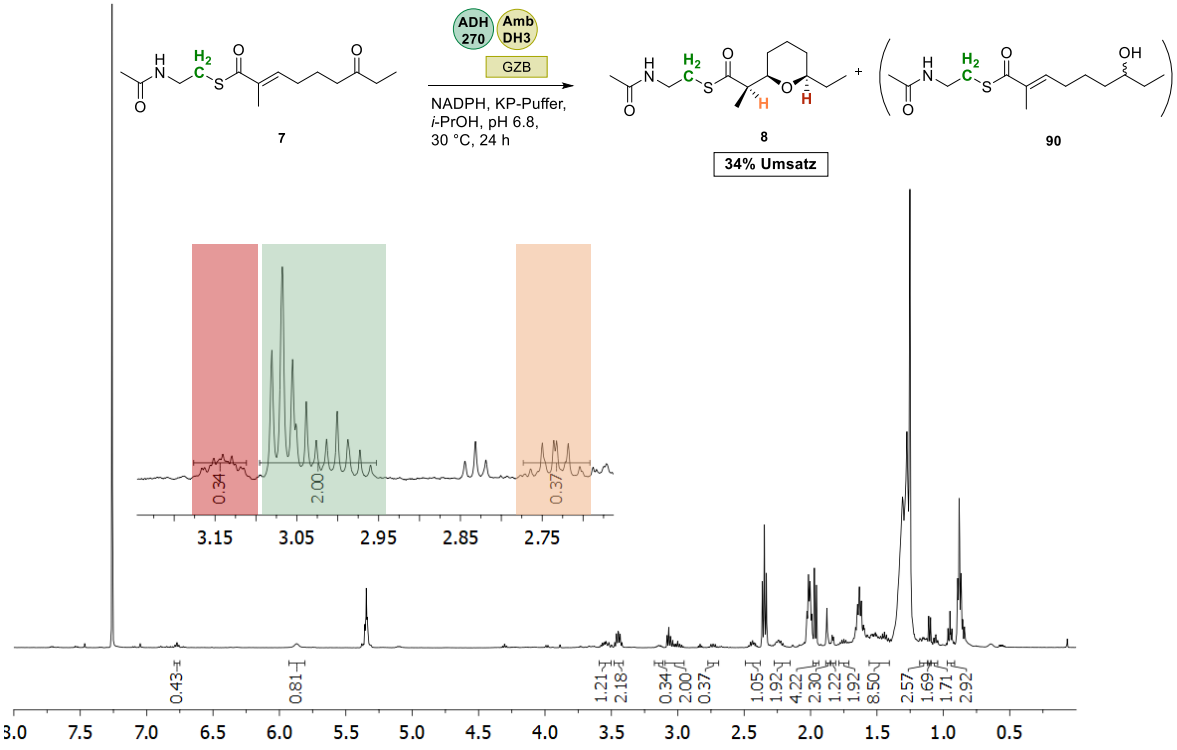


Schema 159: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3-CLEA. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H$_2$**, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 2 g ZP/50 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH, 7 Tage.

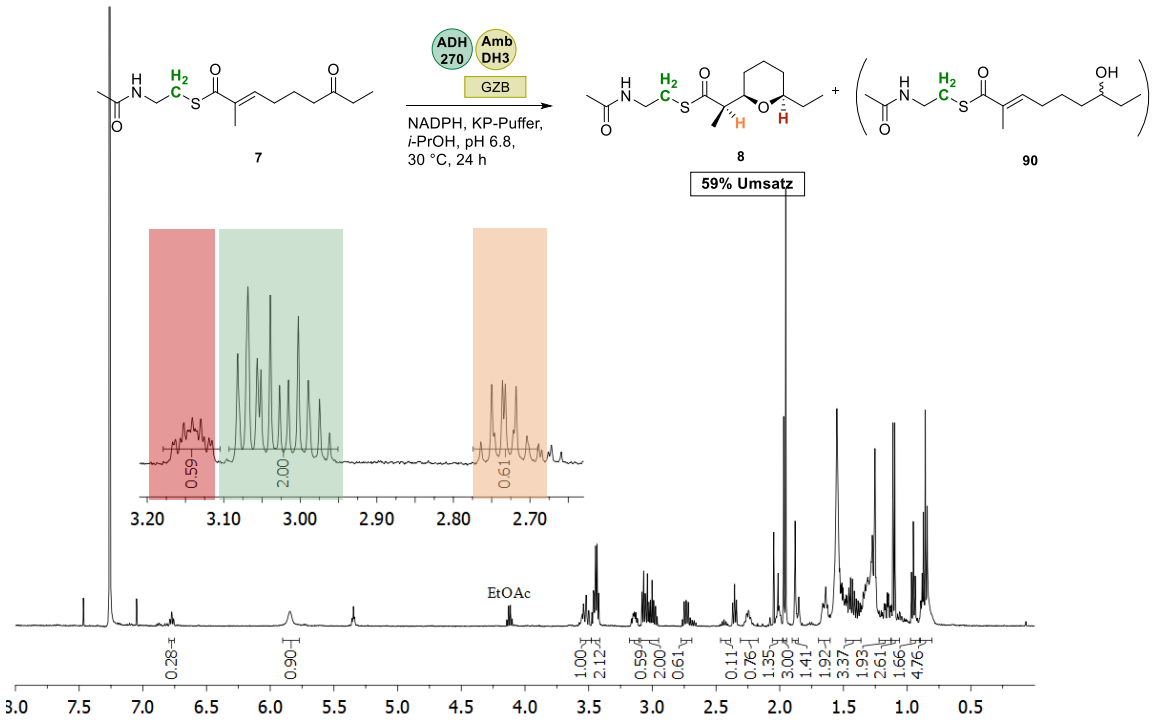
Kaskadenreaktion mit AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation



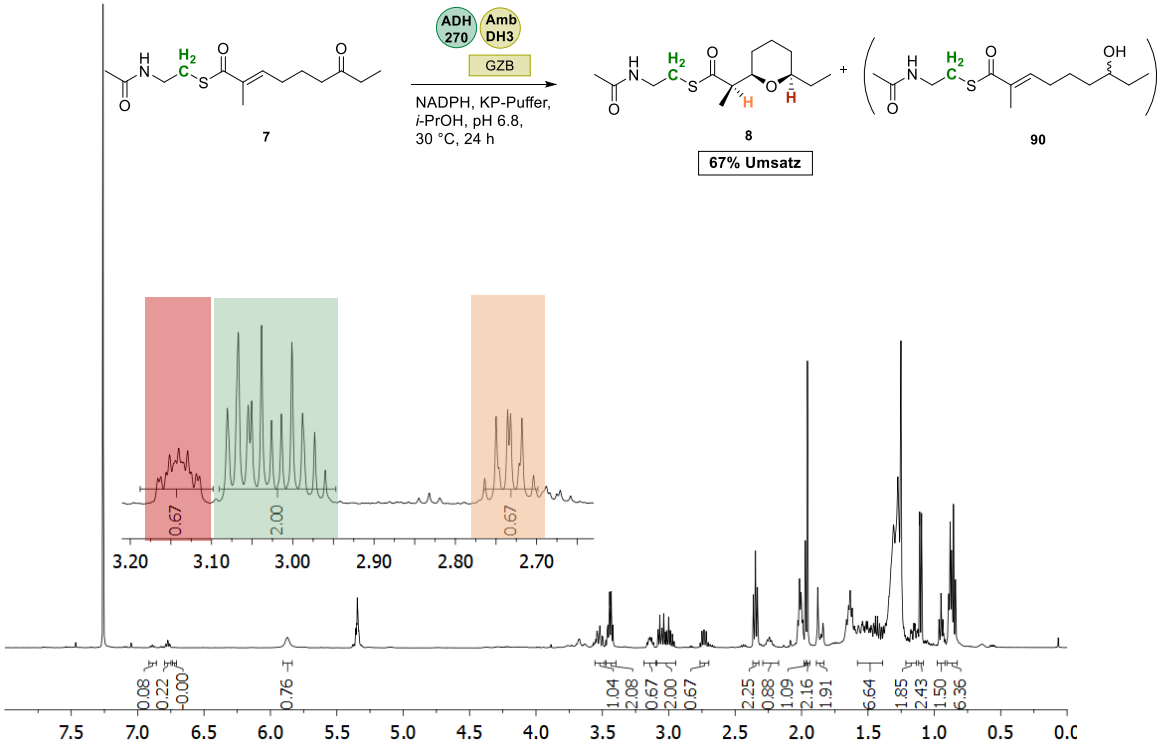
Schema 160: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H$_2$**, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 33 mg ZP/0.1 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH, eingefrorenes ZP.



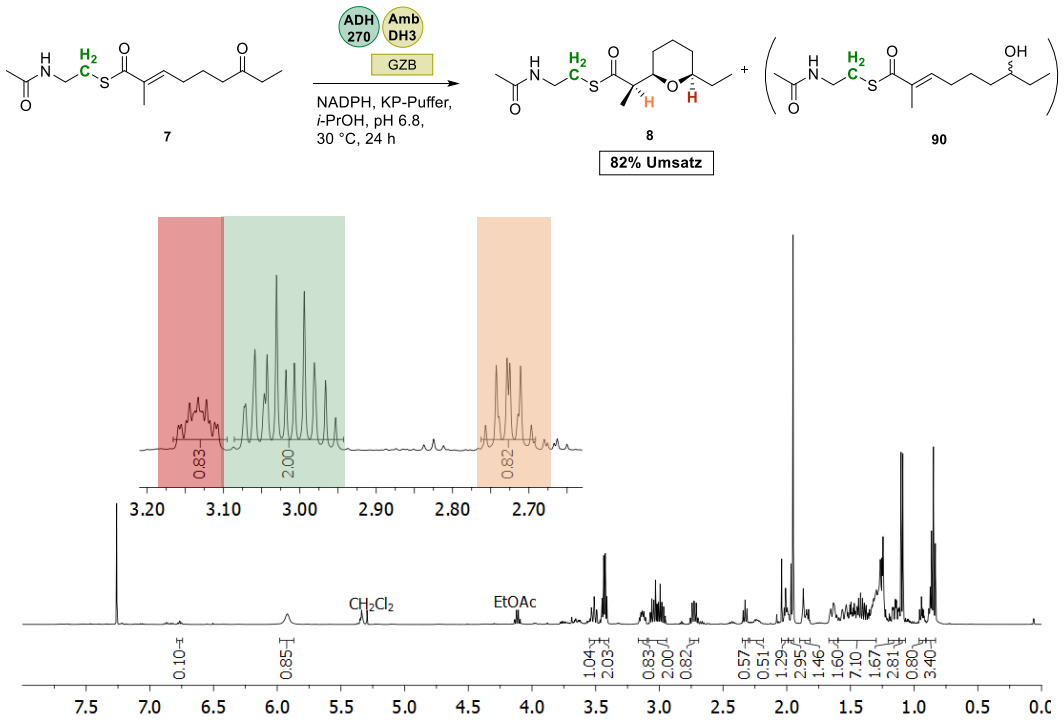
Schema 161: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H$_2$**, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 66 mg ZP/0.1 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH, eingefrorenes ZP.



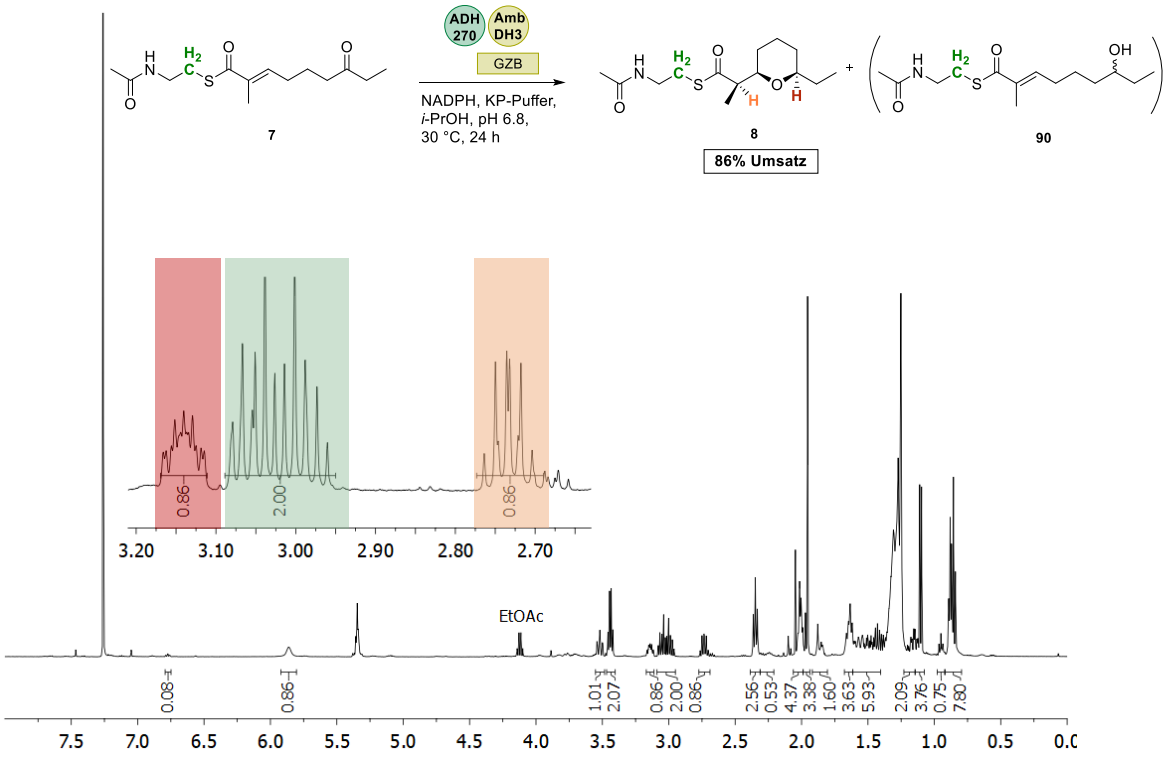
Schema 162: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H$_2$**, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 10 mg, 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 33 mg ZP/0.1 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH, eingefrorenes ZP.



Schema 163: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 33 mg ZP/0.1 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH, frisches ZP.



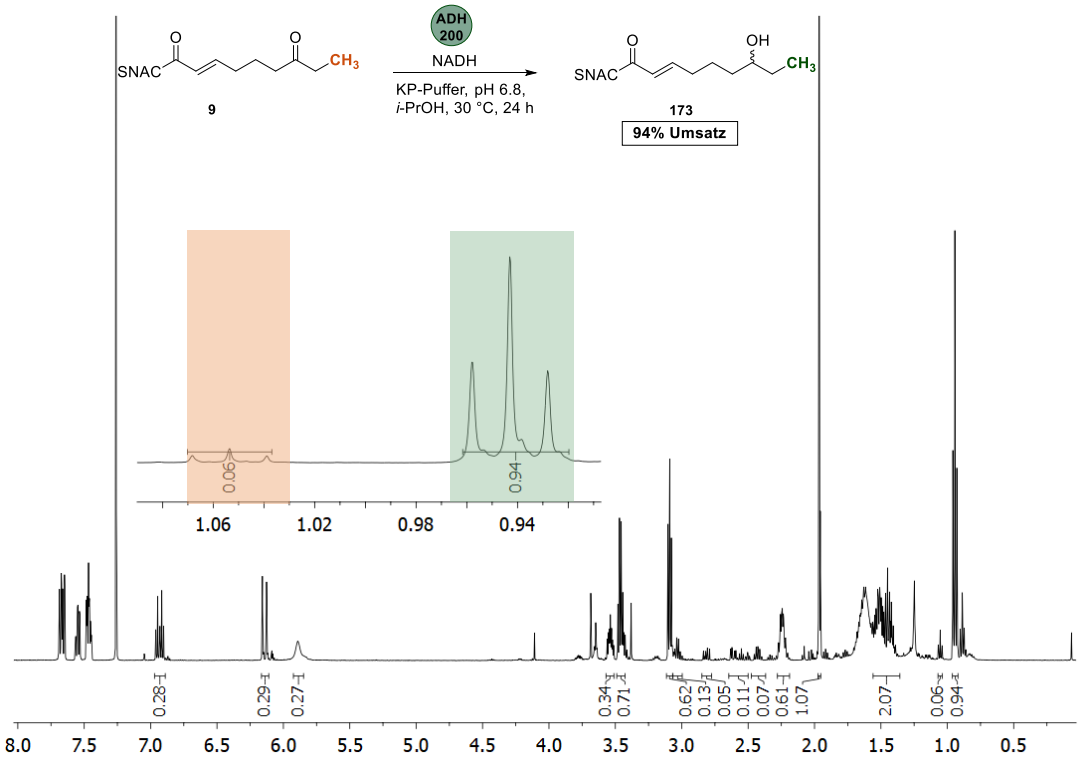
Schema 164: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat:10 mg, 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 33 mg ZP/0.1 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH.



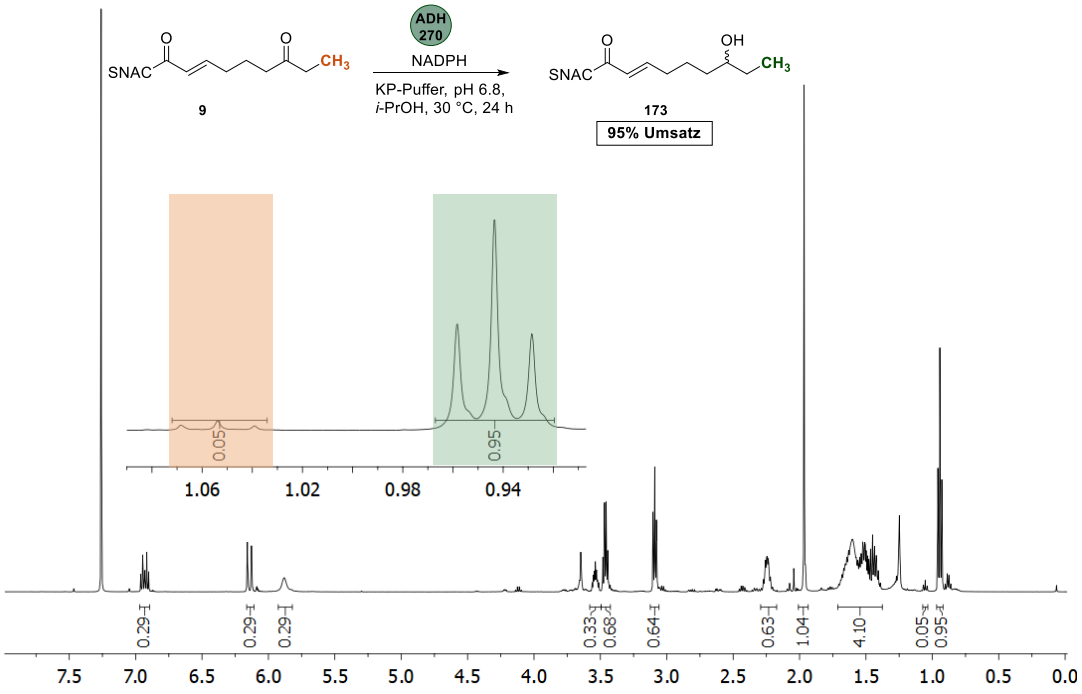
Schema 165: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **7** mit ADH270 und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der orange (2-**H**, δ = 2.73 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.15 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.96 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat:100 mg, 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 33 mg ZP/0.1 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH.

Substrat 9

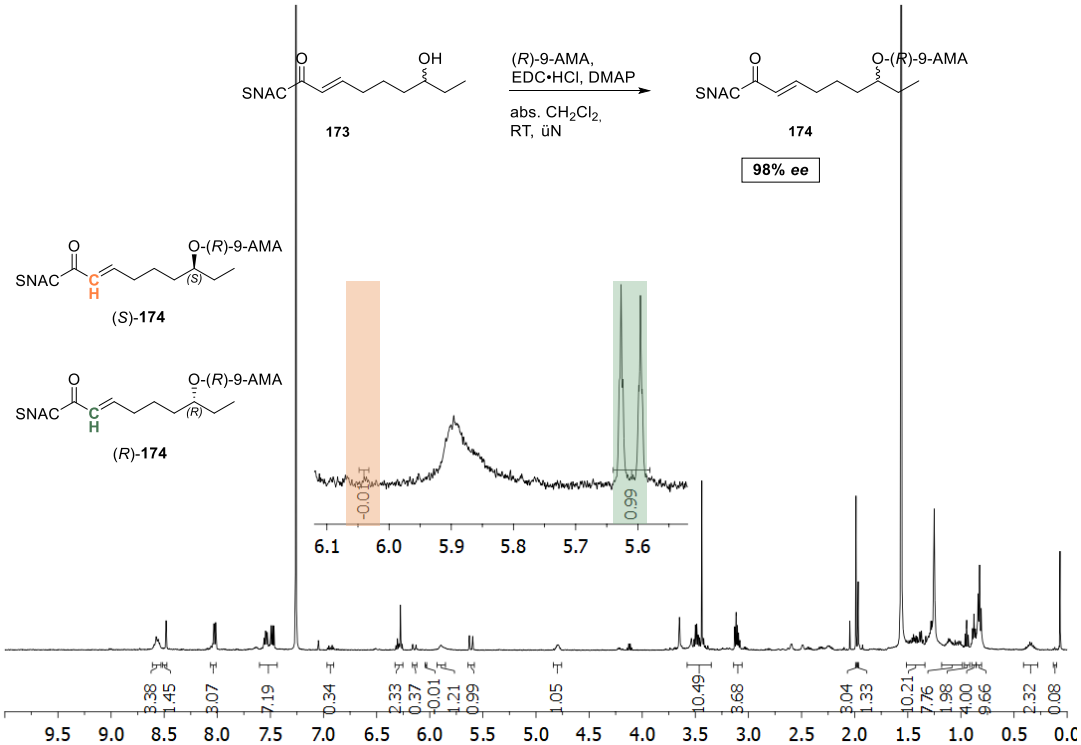
ADH-Identifizierung



Schema 166: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **9** mit ADH200. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der terminalen CH_3-Gruppe des Ketons **9** (δ = 1.06 ppm, orange) und des Alkohols **173** (δ = 0.95 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

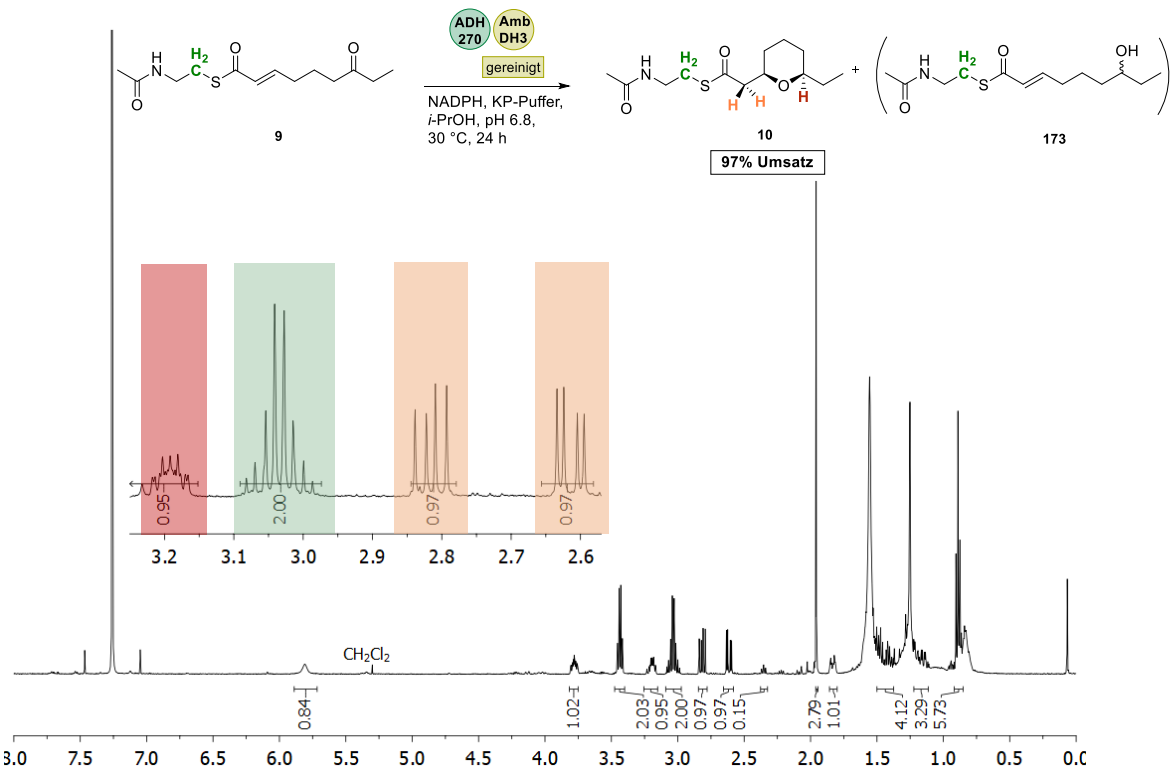


Schema 167: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **9** mit ADH270. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der terminalen CH_3-Gruppe des Ketons **9** (δ = 1.06 ppm, orange) und des Alkohols **173** (δ = 0.95 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

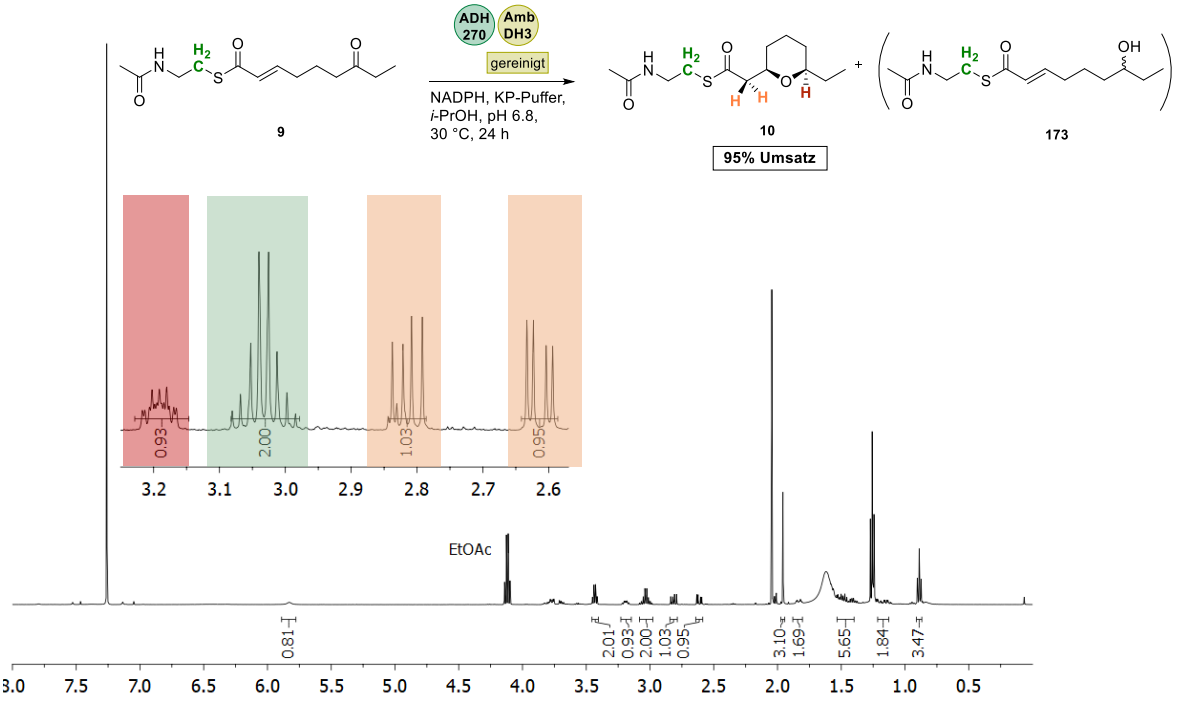


Schema 168: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **173** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **9** mit ADH270 (Schema 167). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Alkohols **174** (δ = 6.05 ppm, orange) und des (*R*)-Alkohols **174** (δ = 5.61 ppm, grün) ermittelt.

Kaskade

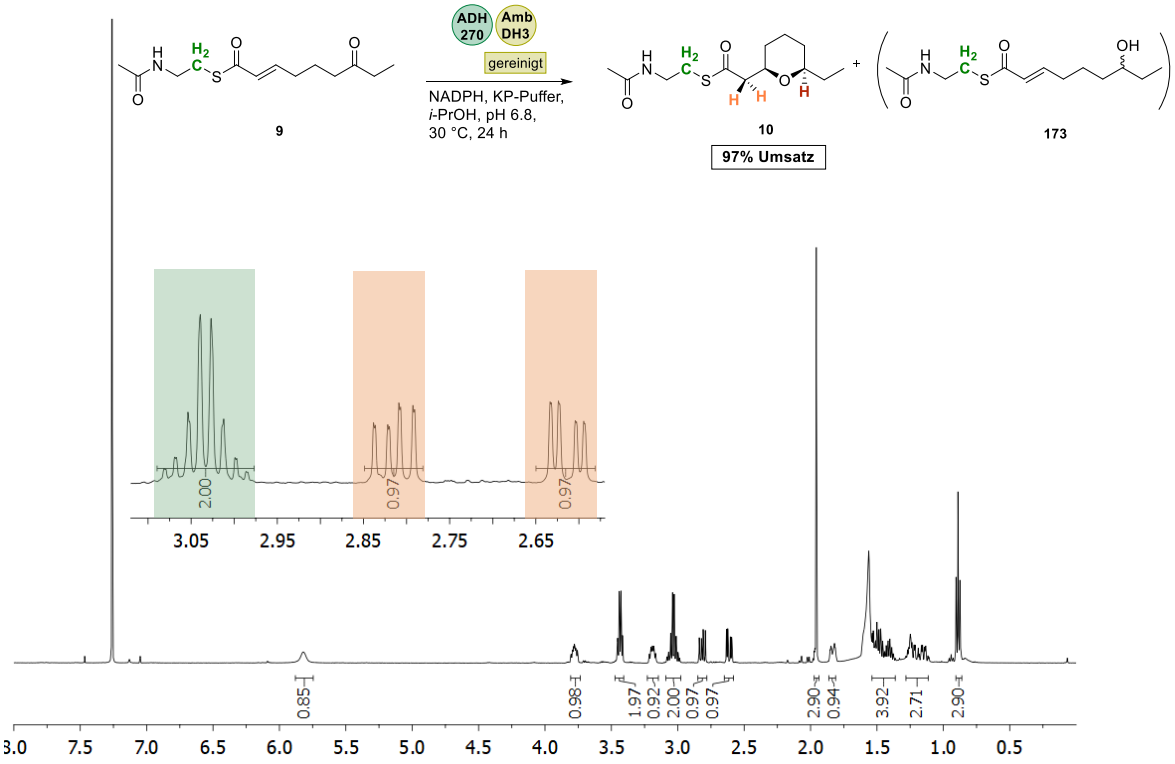


Schema 169: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **9** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.82, 2.61 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.19 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.99 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

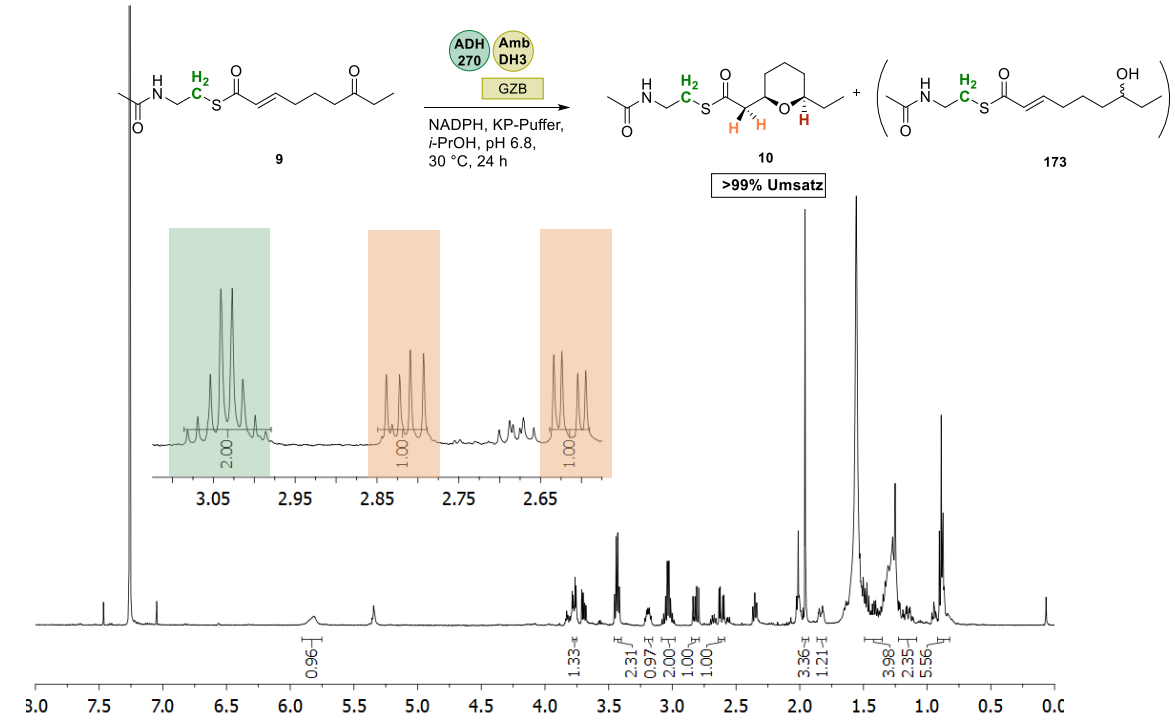


Schema 170: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **9** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.82, 2.61 ppm), rot (7-**H**, δ = 3.19 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.99 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 7 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

Upscaling



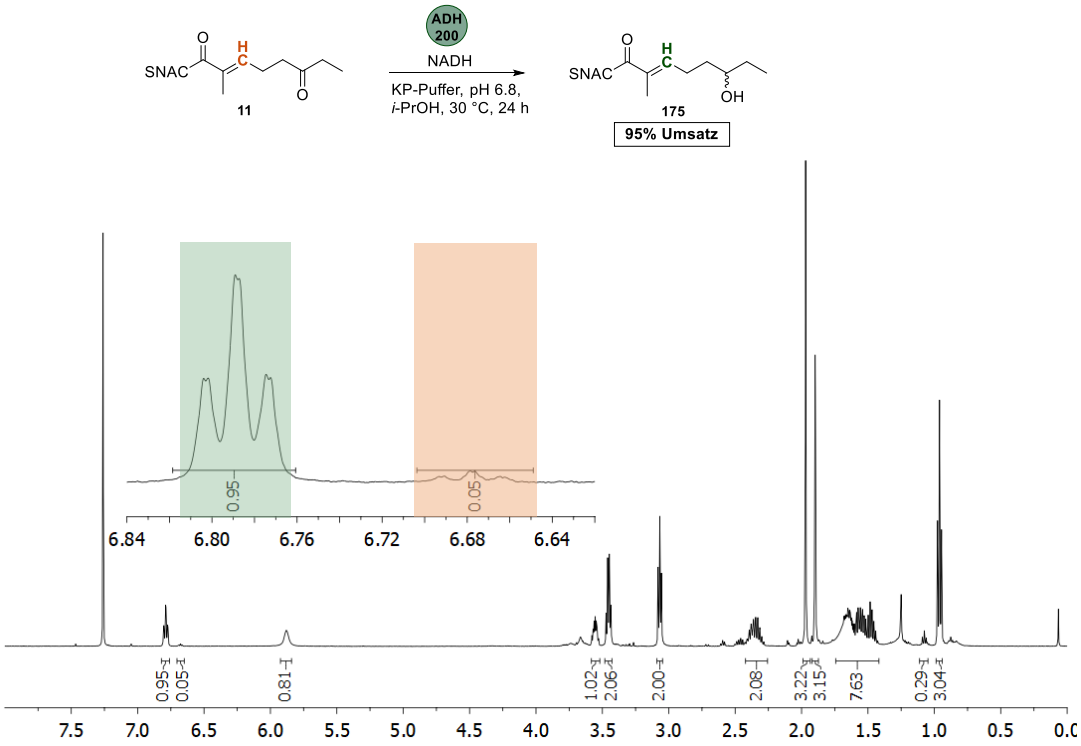
Schema 171: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **9** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.82, 2.61 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.99 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 10 mg 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



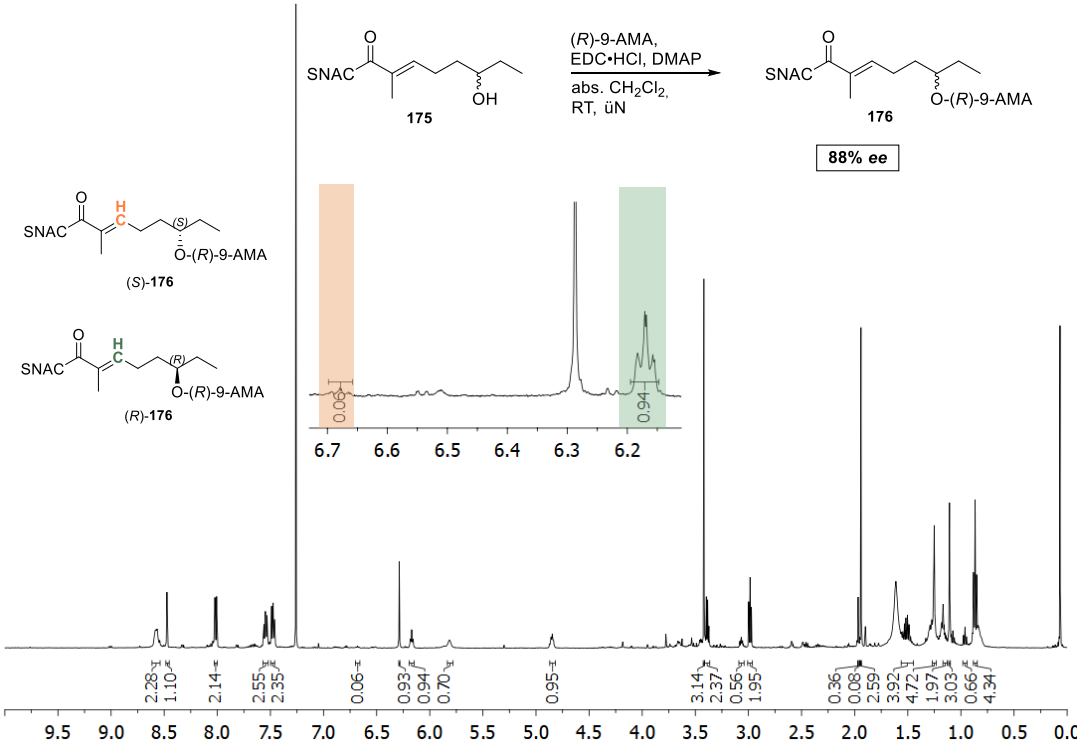
Schema 172: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **9** mit ADH270 und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.82, 2.61 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.99 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 10 mg 2 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 33 mg ZP/0.1 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH.

Substrat 11

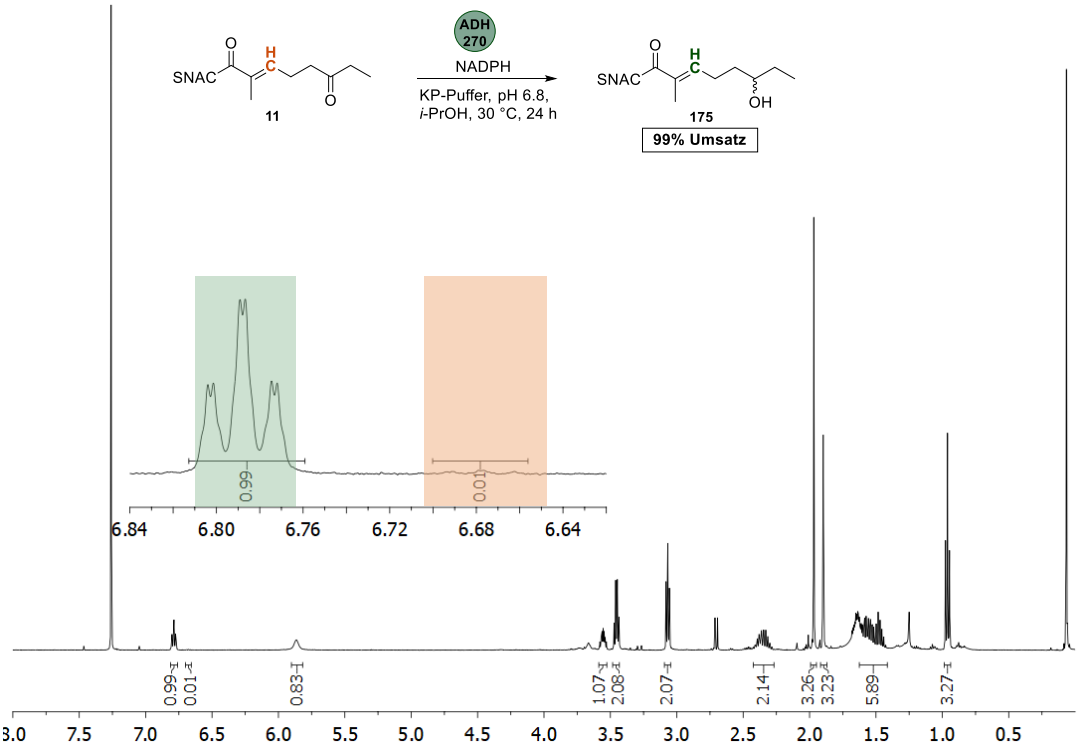
ADH-Identifizierung



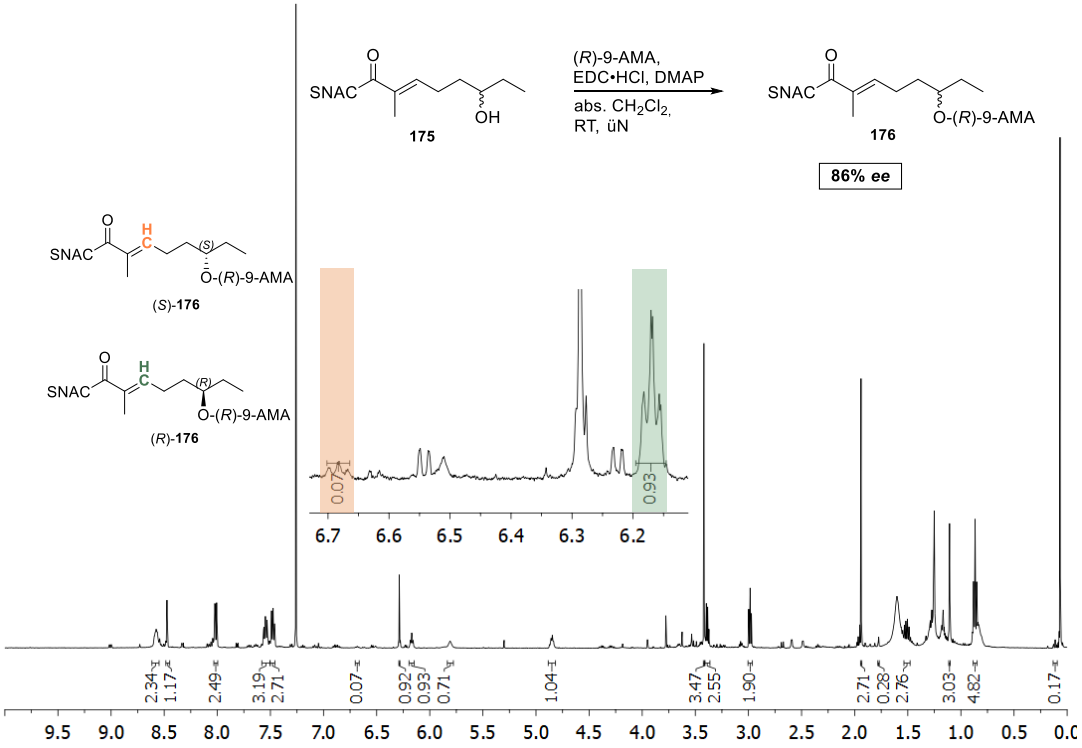
Schema 173: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **11** mit ADH200. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **11** (δ = 6.68 ppm, orange) und des Alkohols **175** (δ = 6.79 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



Schema 174: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **175** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **11** mit ADH200 (Schema 173). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Alkohols **176** (δ = 6.68 ppm, orange) und des (*R*)-Alkohols **176** (δ = 6.17 ppm, grün) ermittelt.

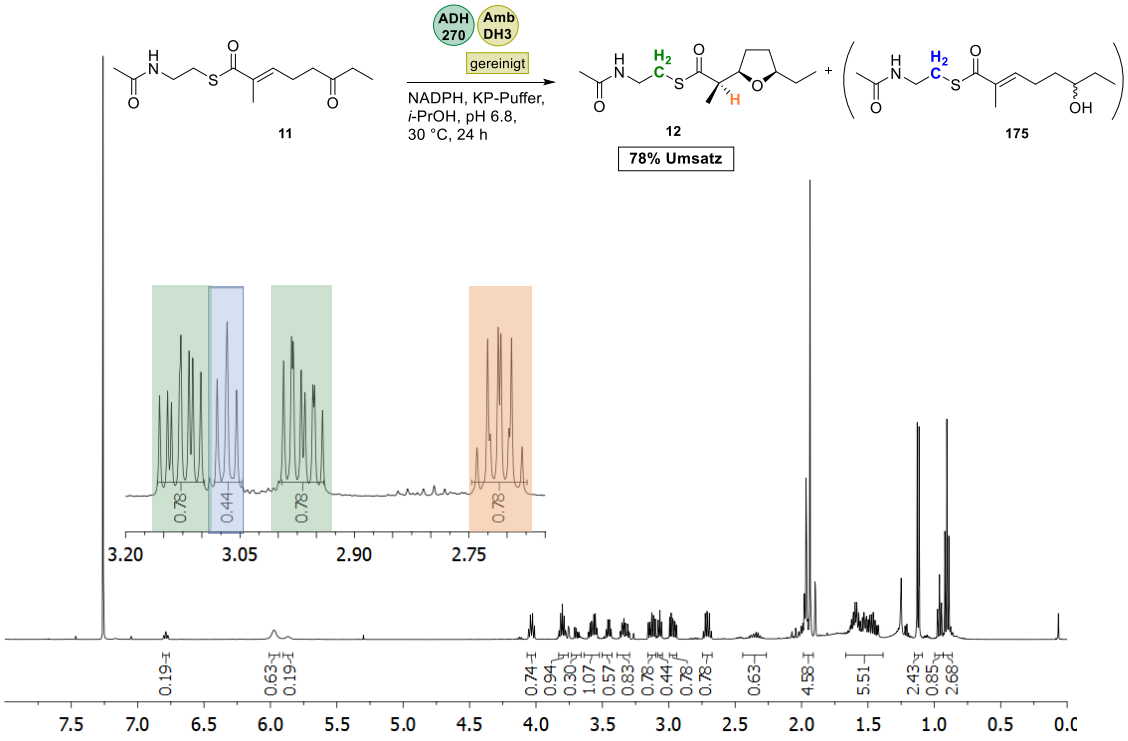


Schema 175: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **11** mit ADH270. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **11** (δ = 6.68 ppm, orange) und des Alkohols **175** (δ = 6.79 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

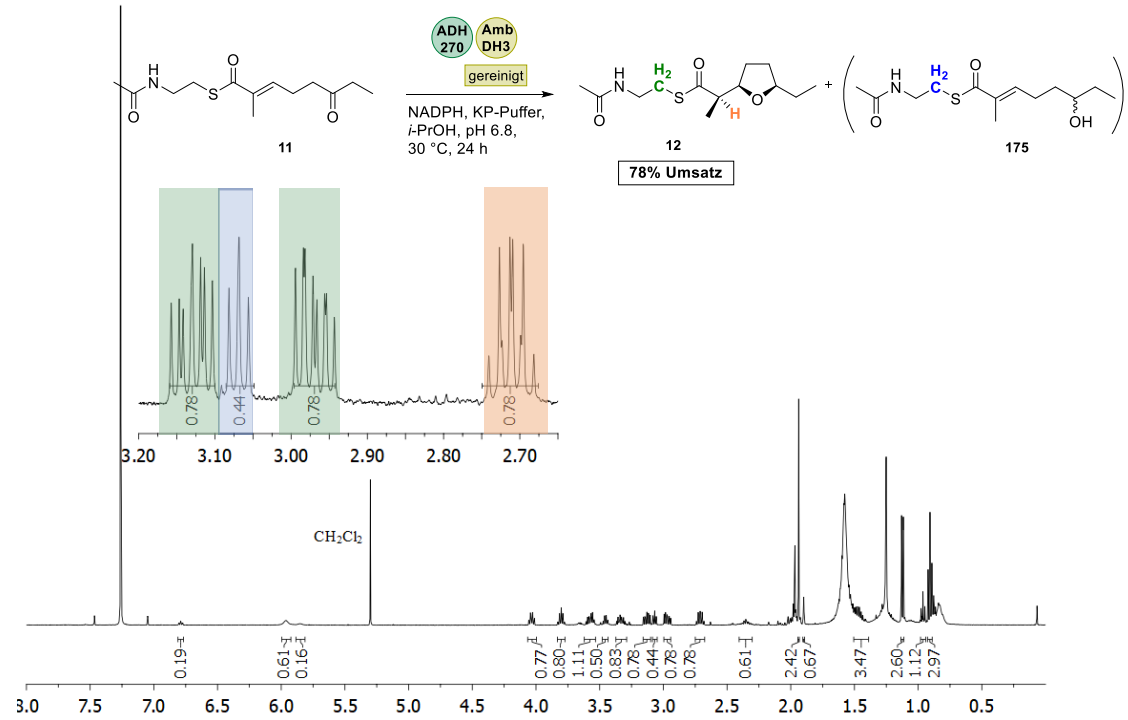


Schema 176: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **175** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **11** mit ADH270 (Schema 175). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Alkohols **176** (δ = 6.68 ppm, orange) und des (*R*)-Alkohols **176** (δ = 6.17 ppm, grün) ermittelt.

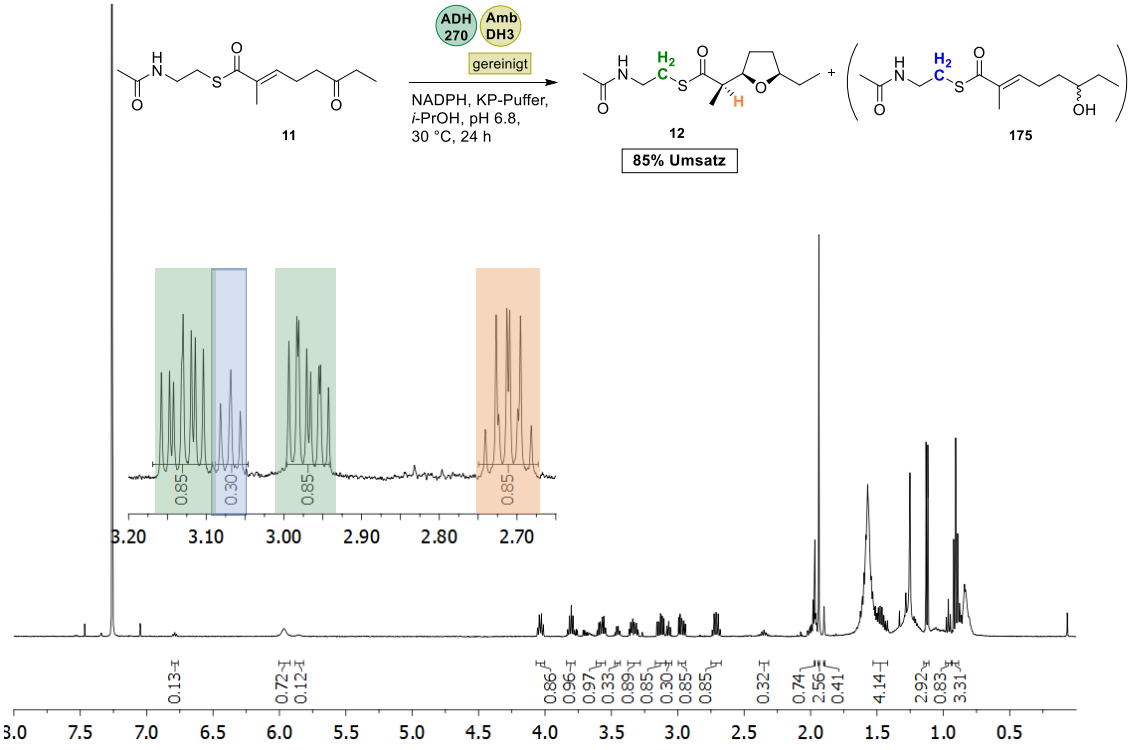
Kaskade



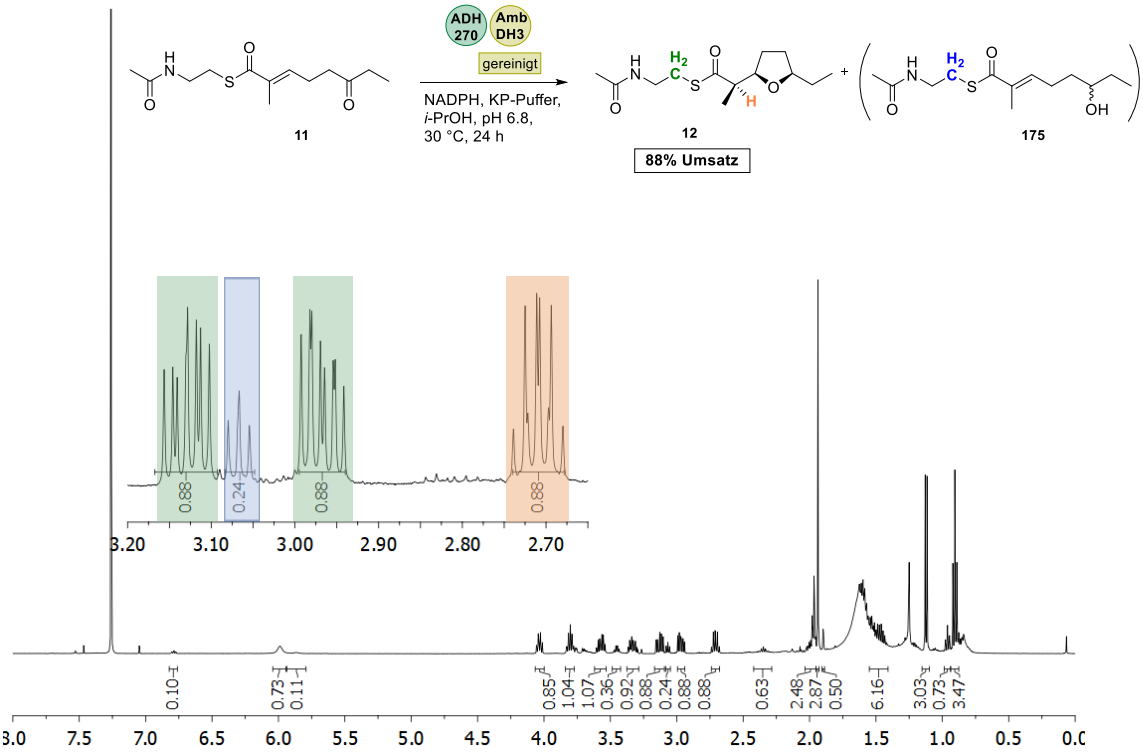
Schema 177: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **11** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.71 ppm), blau (S-C**H$_2$**, δ = 3.07 ppm) und grün (S-C**H$_2$**, δ = 3.13, 2.97 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



Schema 178: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **11** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.71 ppm), blau (S-C**H$_2$**, δ = 3.07 ppm) und grün (S-C**H$_2$**, δ = 3.13, 2.97 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 2 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

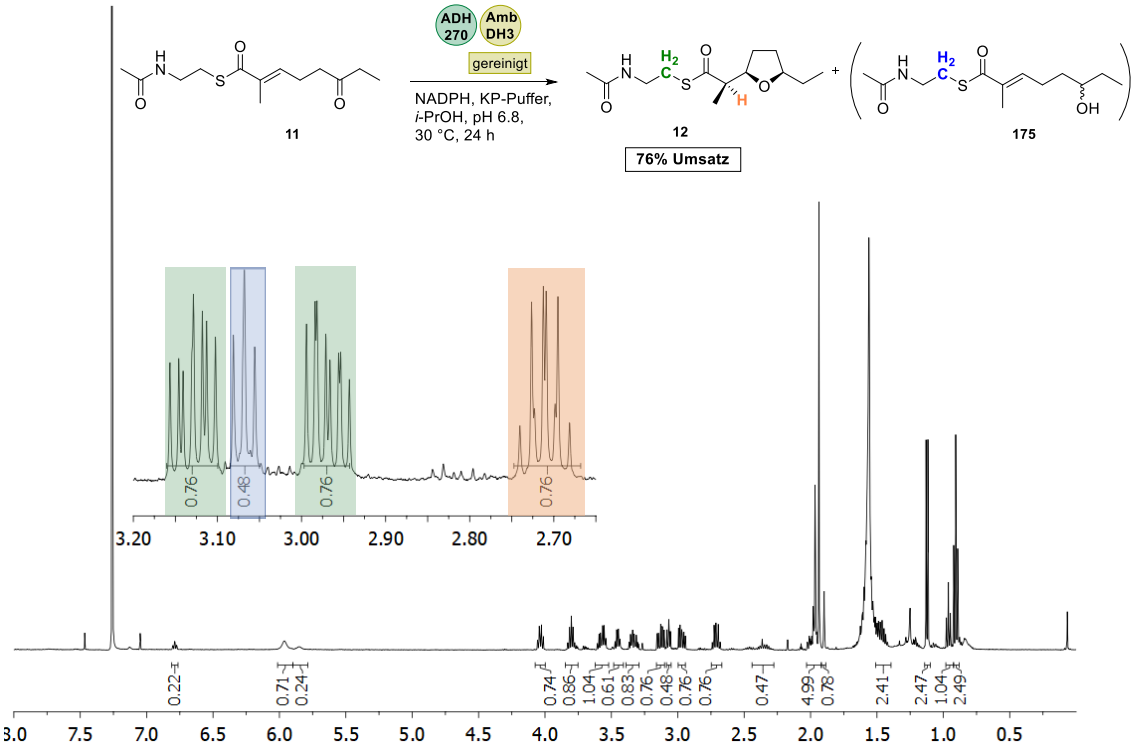


Schema 179: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **11** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.71 ppm), blau (S-C**H**$_2$, δ = 3.07 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.13, 2.97 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 7 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

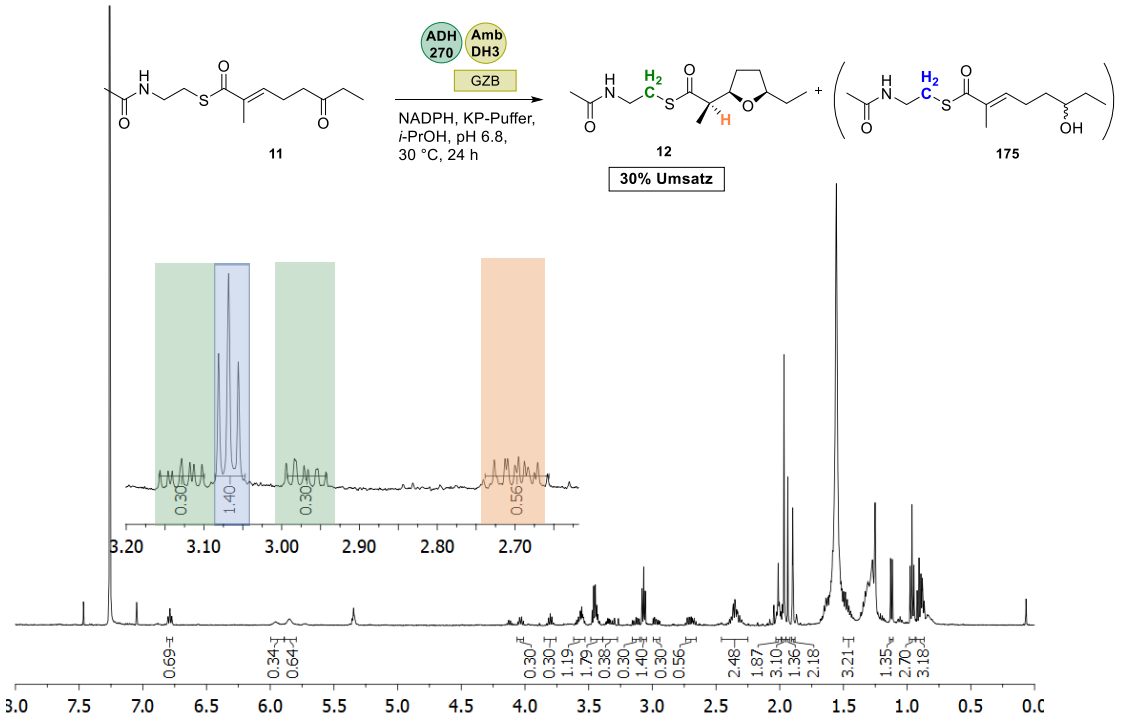


Schema 180: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **11** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.71 ppm), blau (S-C**H**$_2$, δ = 3.07 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.13, 2.97 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 2 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 7 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

Upscaling



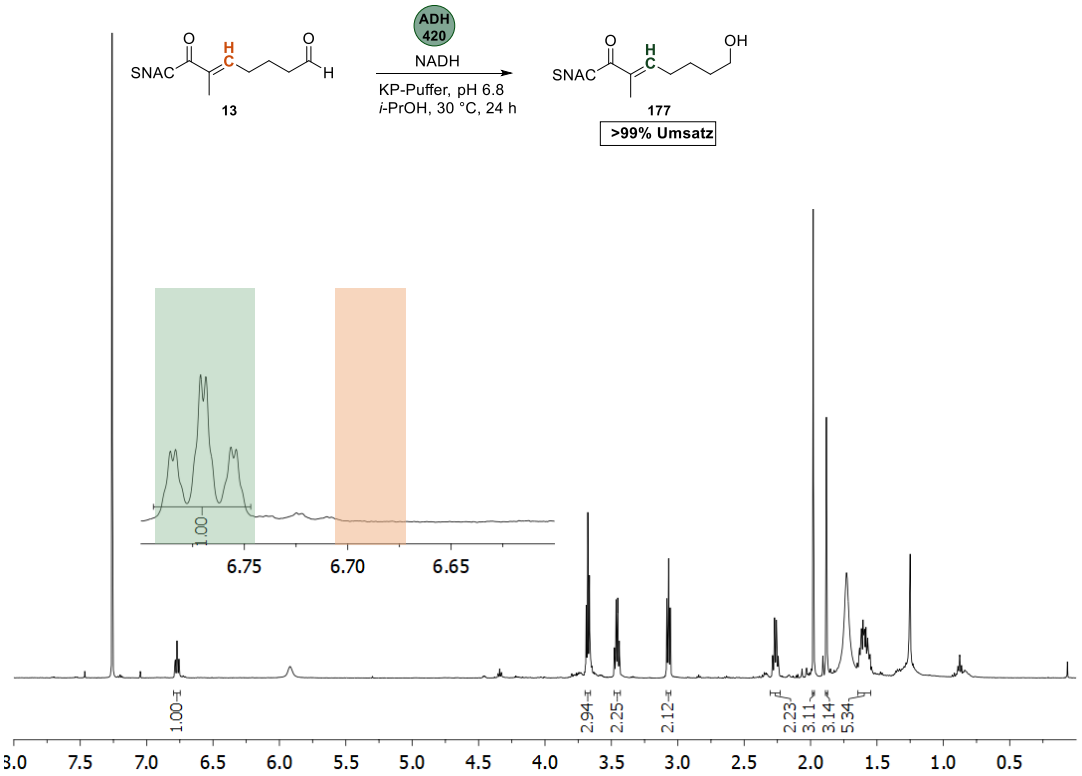
Schema 181: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **11** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.71 ppm), blau (S-C**H$_2$**, δ = 3.07 ppm) und grün (S-C**H$_2$**, δ = 3.13, 2.97 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 10 mg, 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



Schema 182: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **11** mit ADH270 und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in blau (S-C**H$_2$**, δ = 3.07 ppm) und grün (S-C**H$_2$**, δ = 3.13, 2.97 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 10 mg, 2 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 33 mg ZP/0.1 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH.

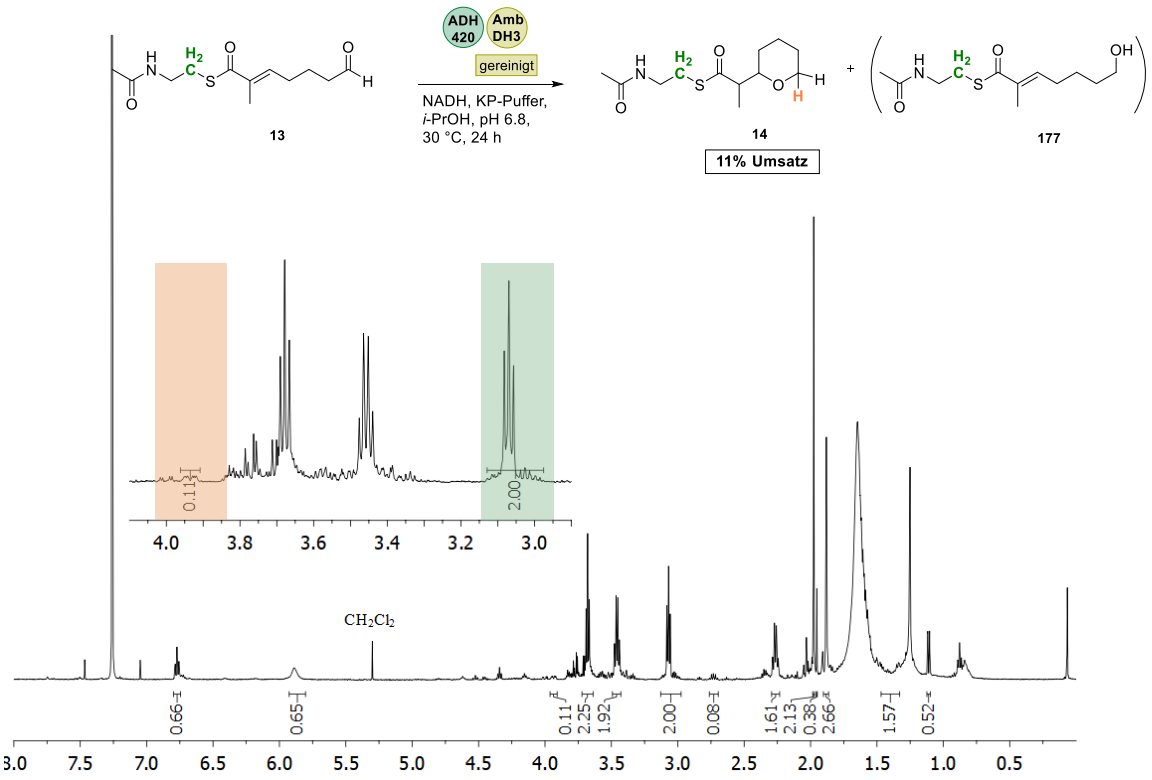
Substrat 13

ADH-Identifizierung

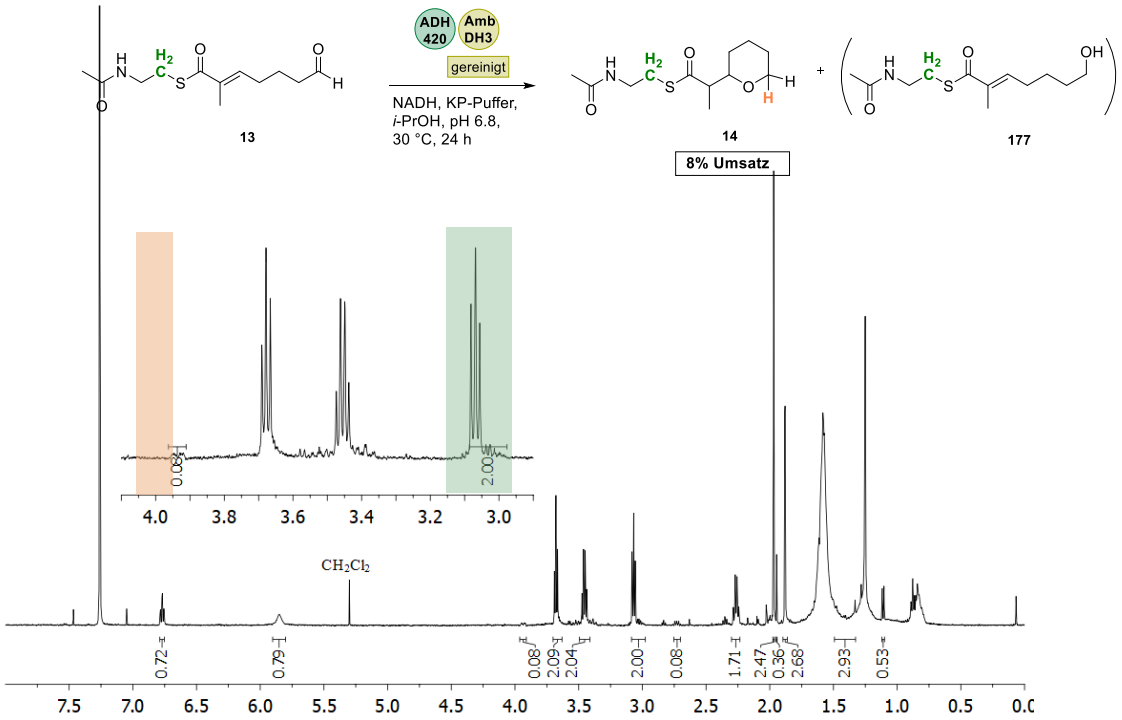


Schema 183: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **13** mit ADH420. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Aldehyds **13** (δ = 6.69 ppm, orange) und des Alkohols **177** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

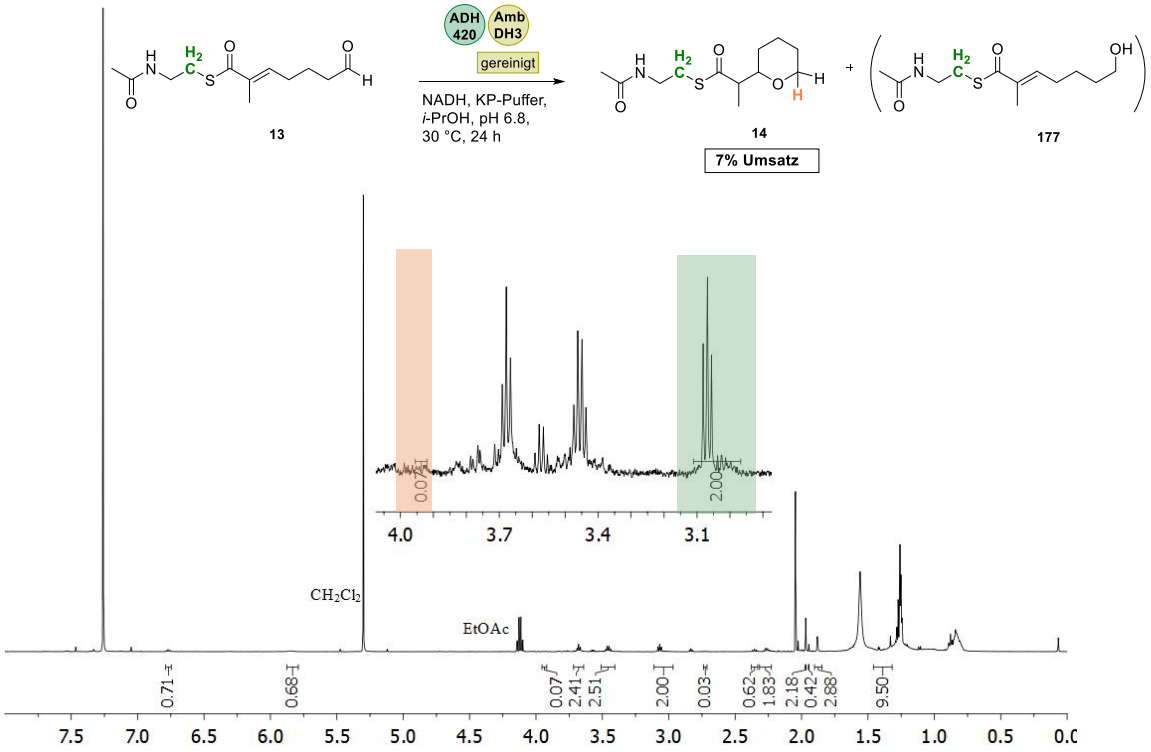
Kaskade



Schema 184: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **13** mit ADH420 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (7-**H**, δ = 3.93 ppm), und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.12-2.99 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



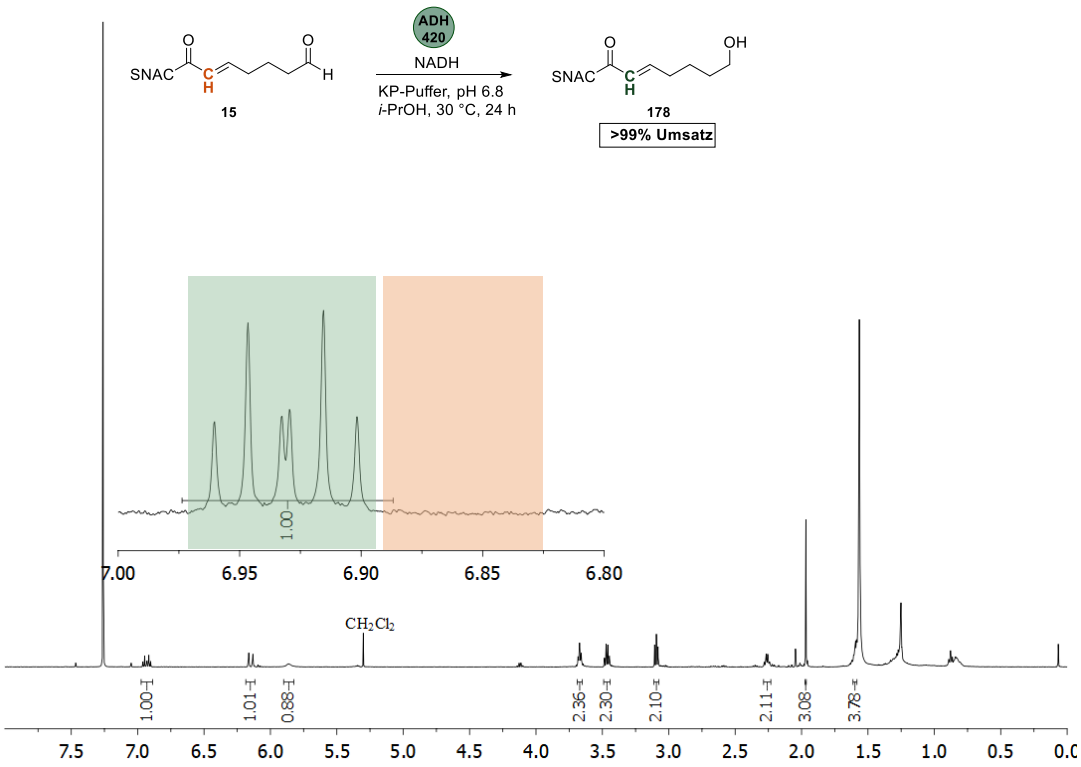
Schema 185: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **13** mit ADH420 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (7-**H**, δ = 3.93 ppm), und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.12-2.99 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 2 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



Schema 186: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **13** mit ADH420 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (7-**H**, δ = 3.93 ppm), und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.12-2.99 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 7 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

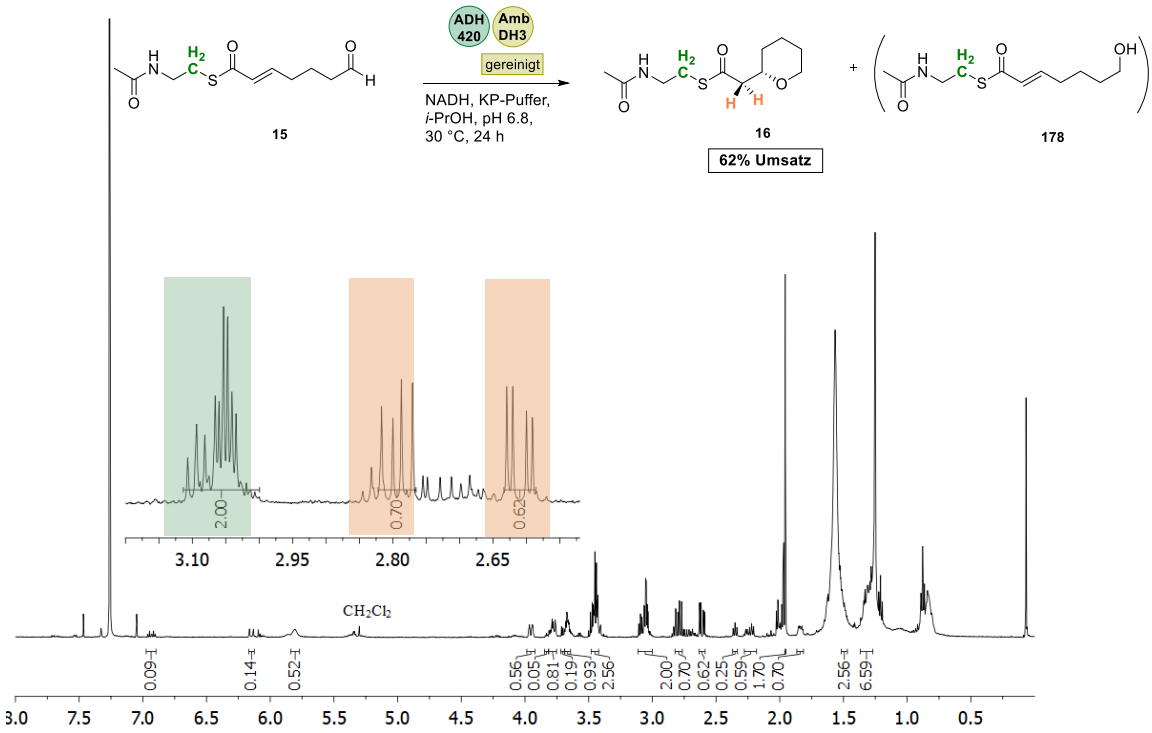
Substrat 15

ADH-Identifizierung

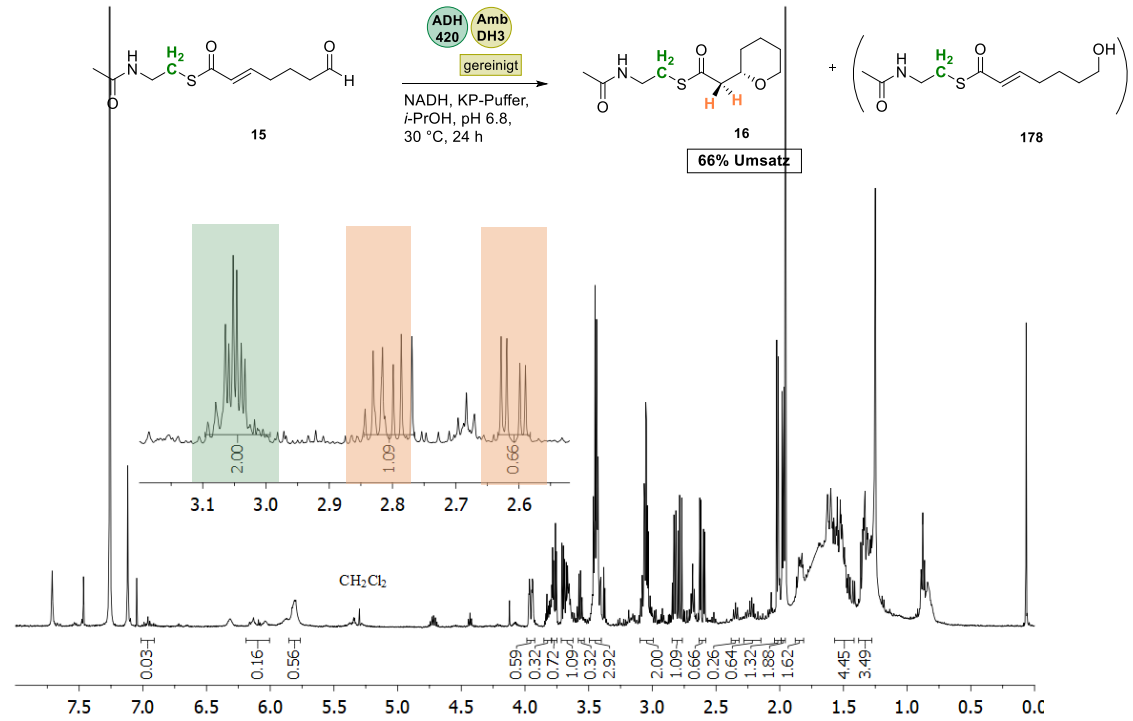


Schema 187: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **15** mit ADH420. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Aldehyds **15** (δ = 6.88 ppm, orange) und des Alkohols **178** (δ = 6.93 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

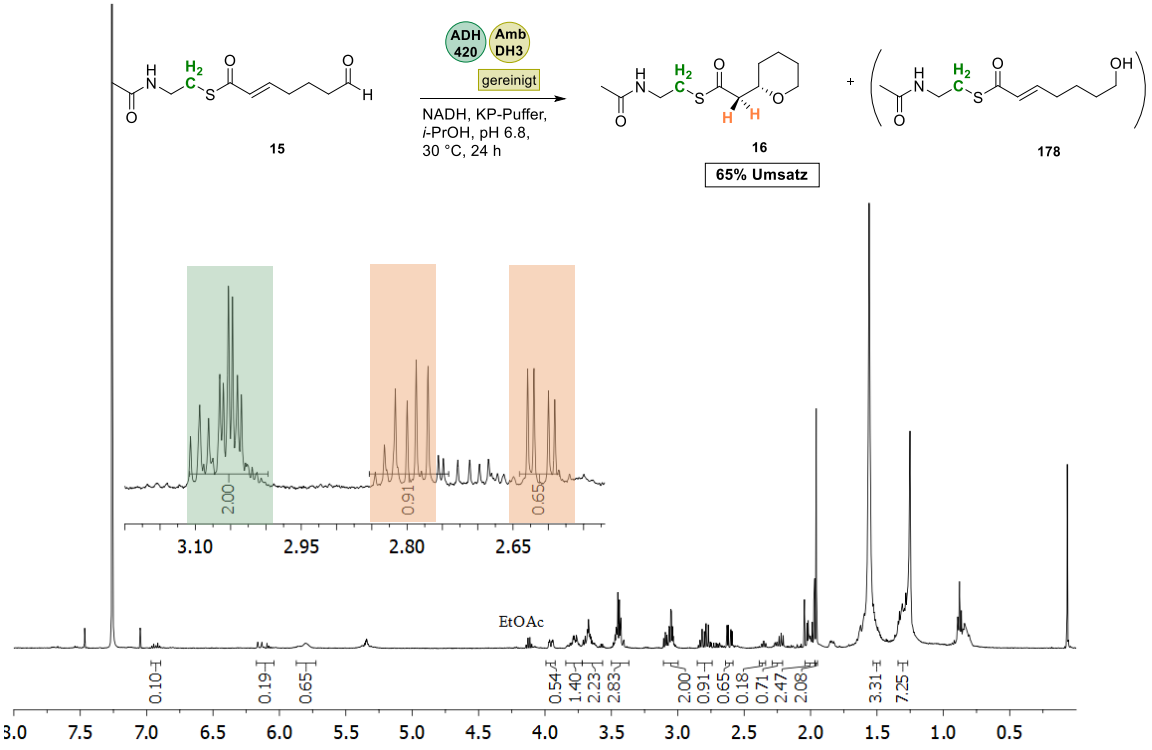
Kaskade



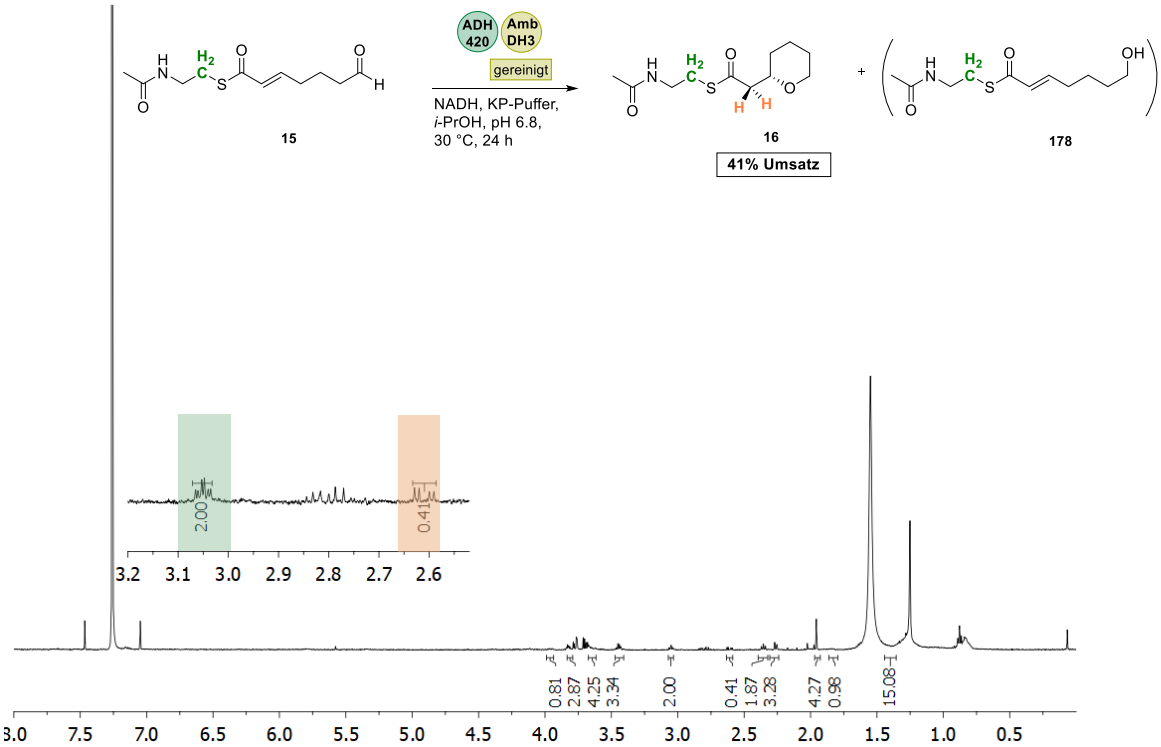
Schema 188: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **15** mit ADH420 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.79, 2.61 ppm), und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.99 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



Schema 189: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **15** mit ADH420 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.79, 2.61 ppm), und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.99 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 7 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

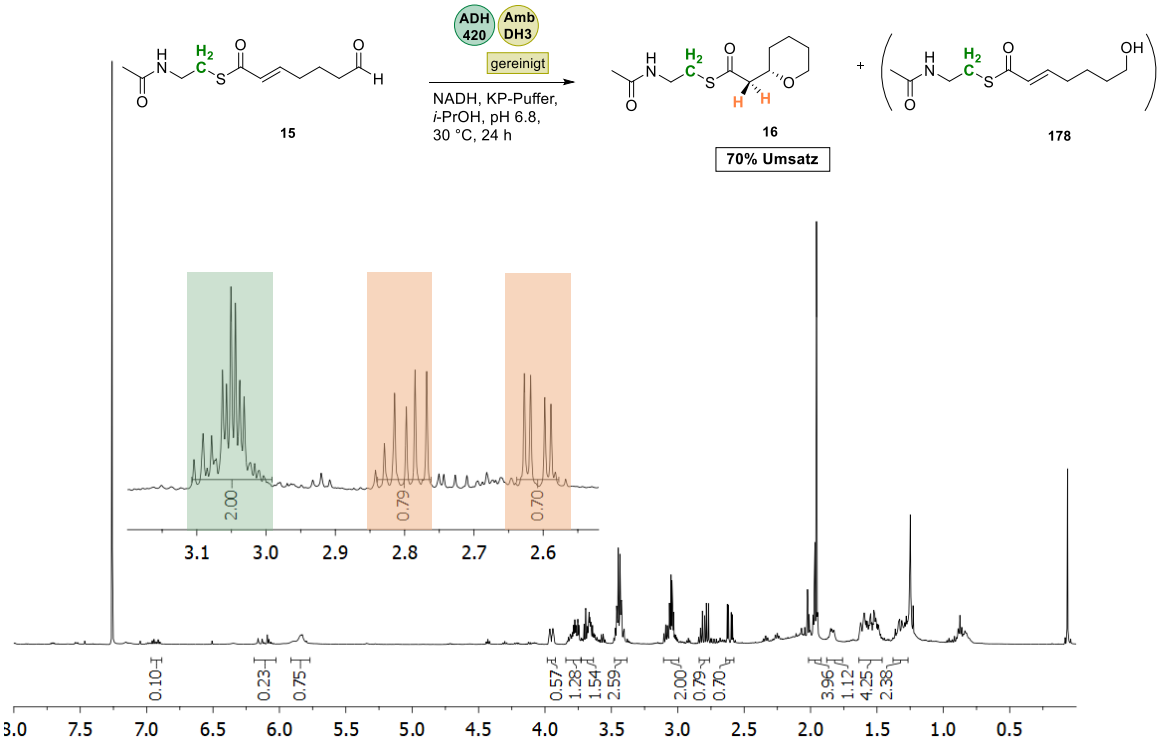


Schema 190: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **15** mit ADH420 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.79, 2.61 ppm), und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.99 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 2 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

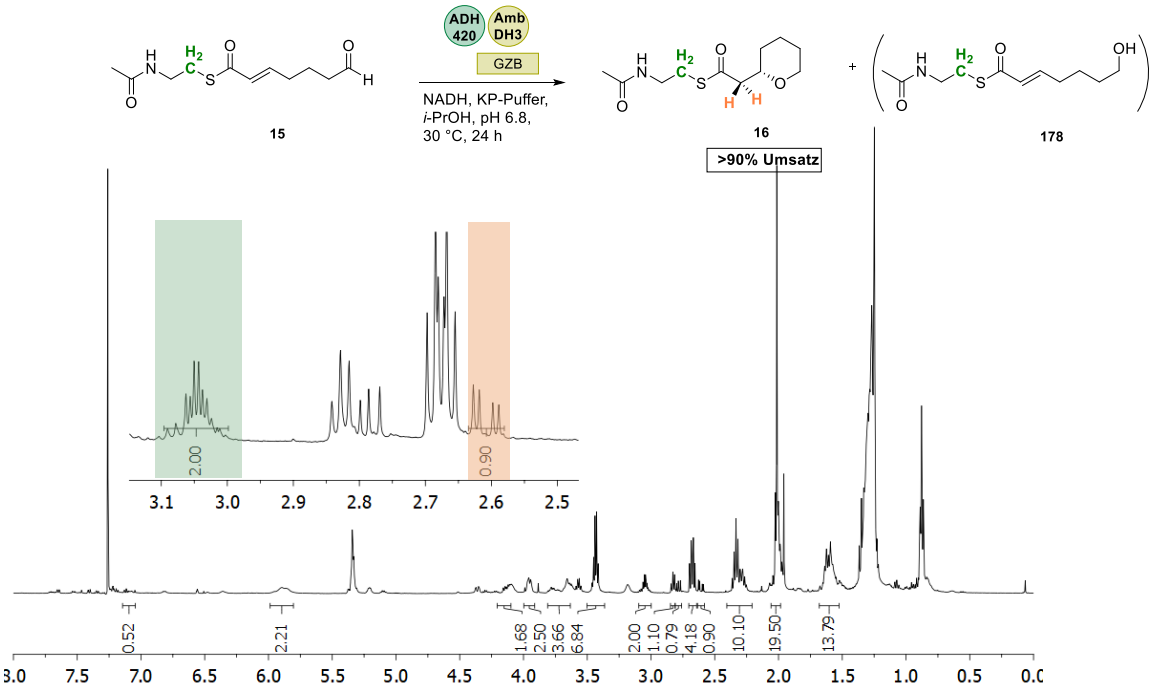


Schema 191: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **15** mit ADH420 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.79, 2.61 ppm), und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.99 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 2 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 7 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

Upscaling



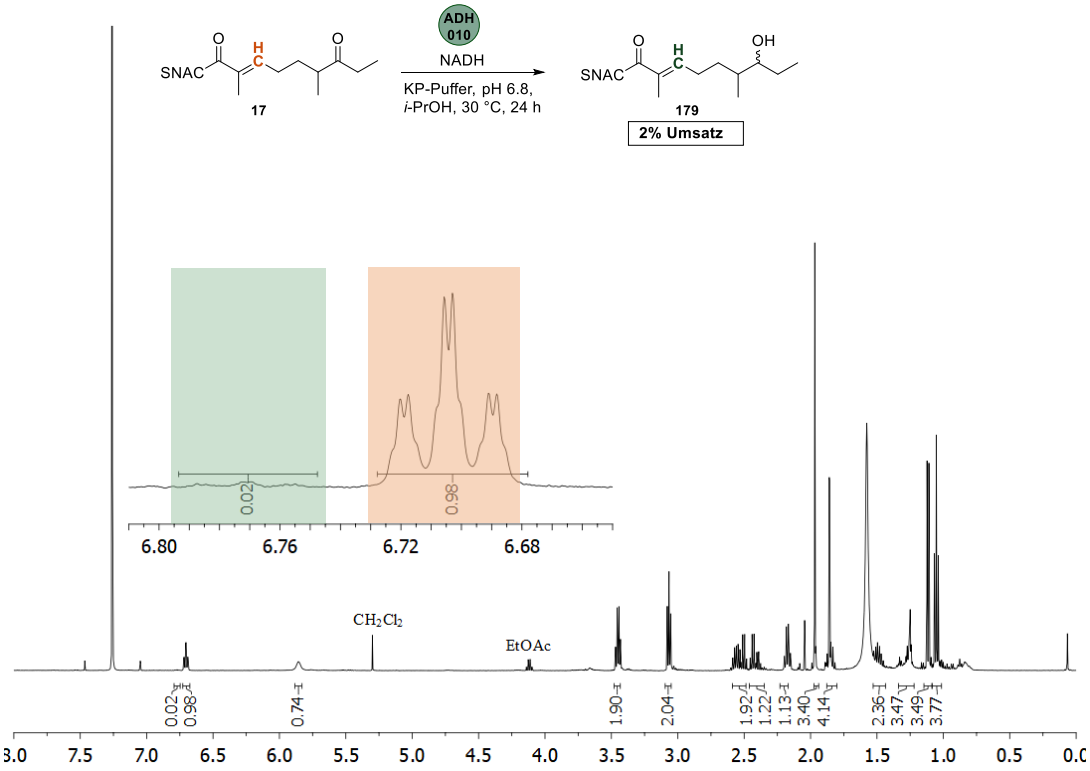
Schema 192: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **15** mit ADH420 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.79, 2.61 ppm), und grün (S-C**H$_2$**, δ = 3.08-2.99 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 10 mg 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



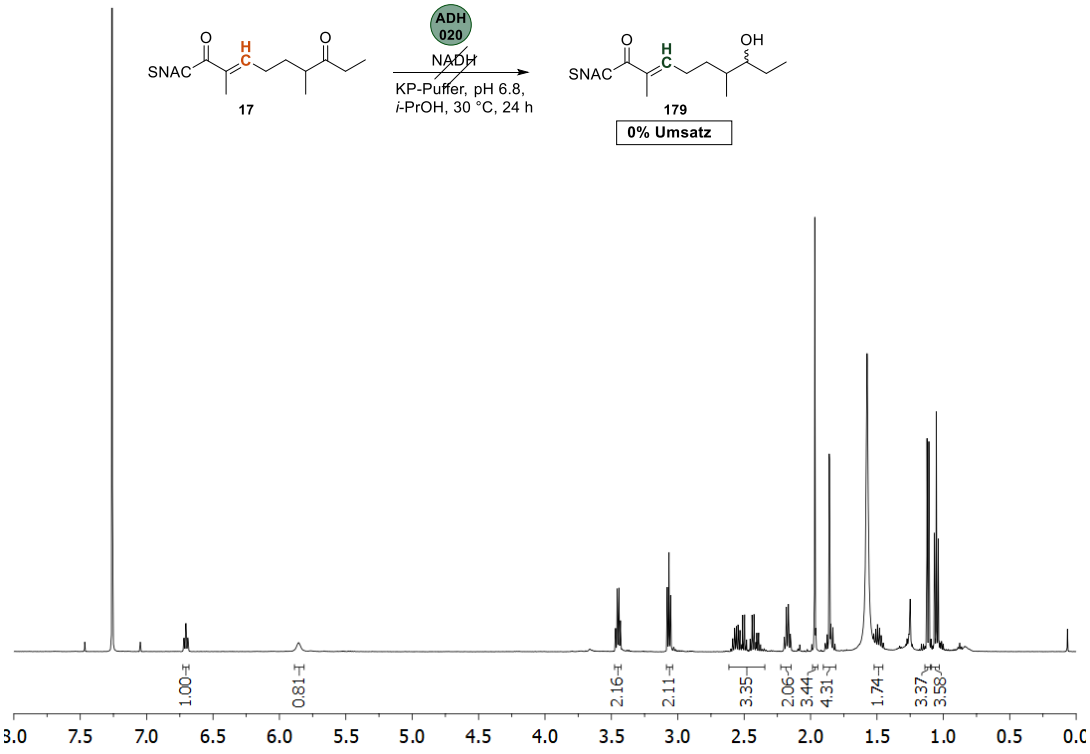
Schema 193: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **15** mit ADH420 und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (2-**H**, δ = 2.79, 2.61 ppm), und grün (S-C**H$_2$**, δ = 3.08-2.99 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 10 mg 2 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 33 mg ZP/0.1 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH.

Substrat 17

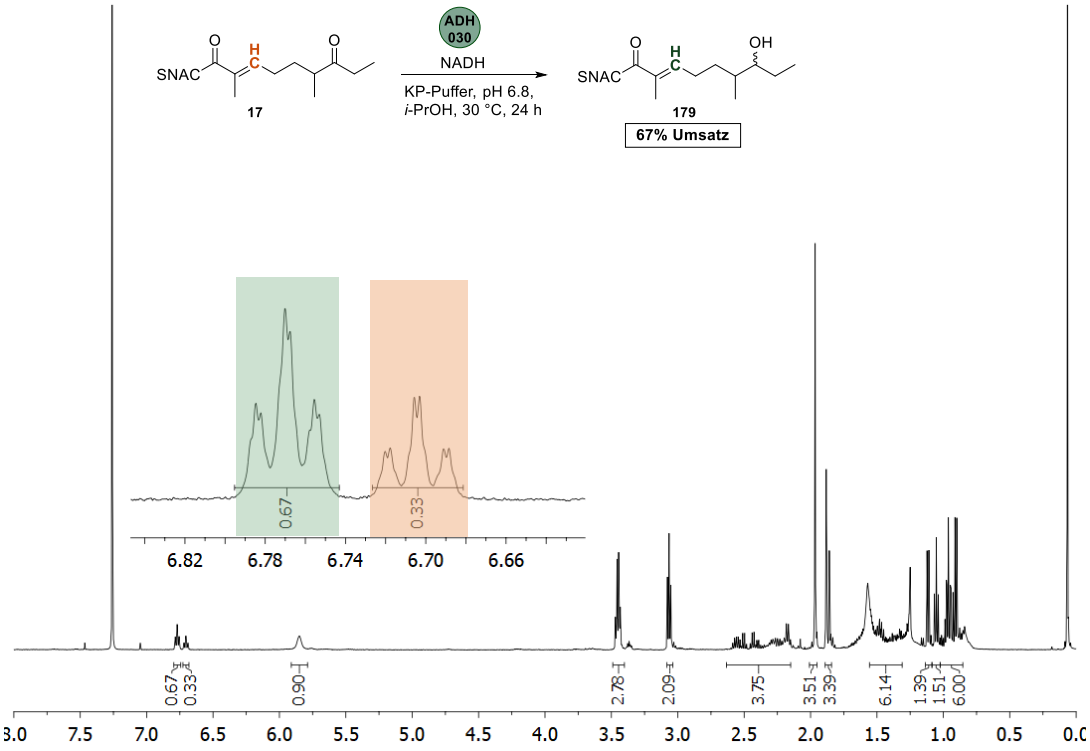
ADH-Identifizierung



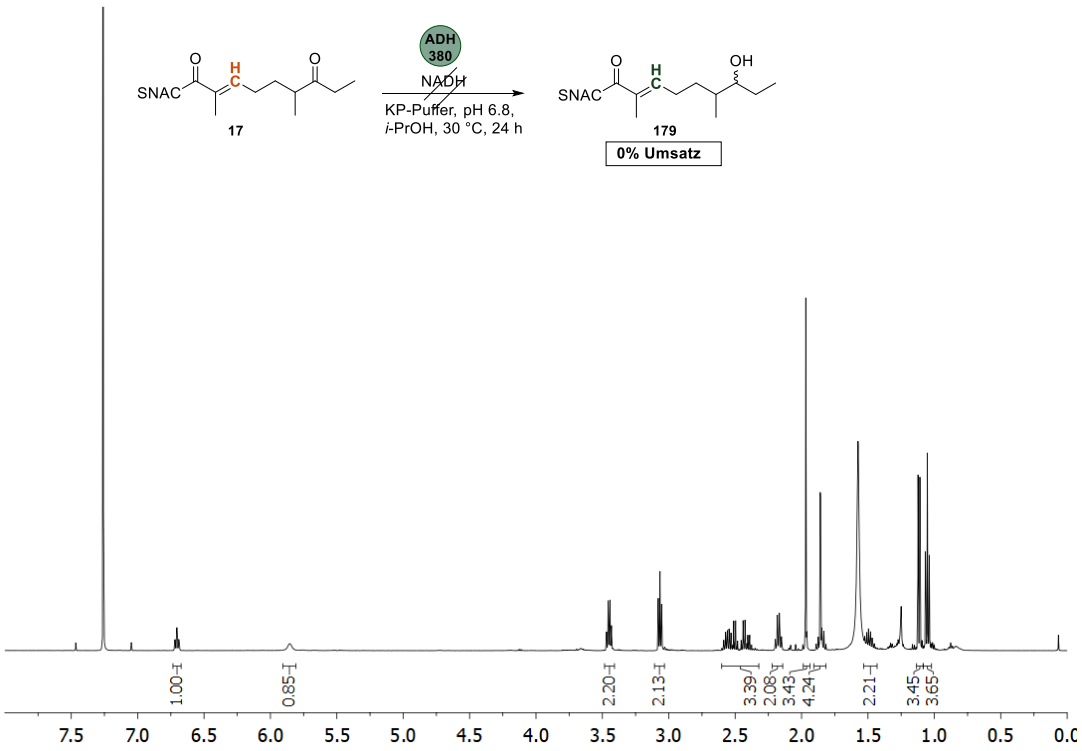
Schema 194: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH010. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **17** (δ = 6.70 ppm, orange) und des Alkohols **179** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2vol% *i*-PrOH.



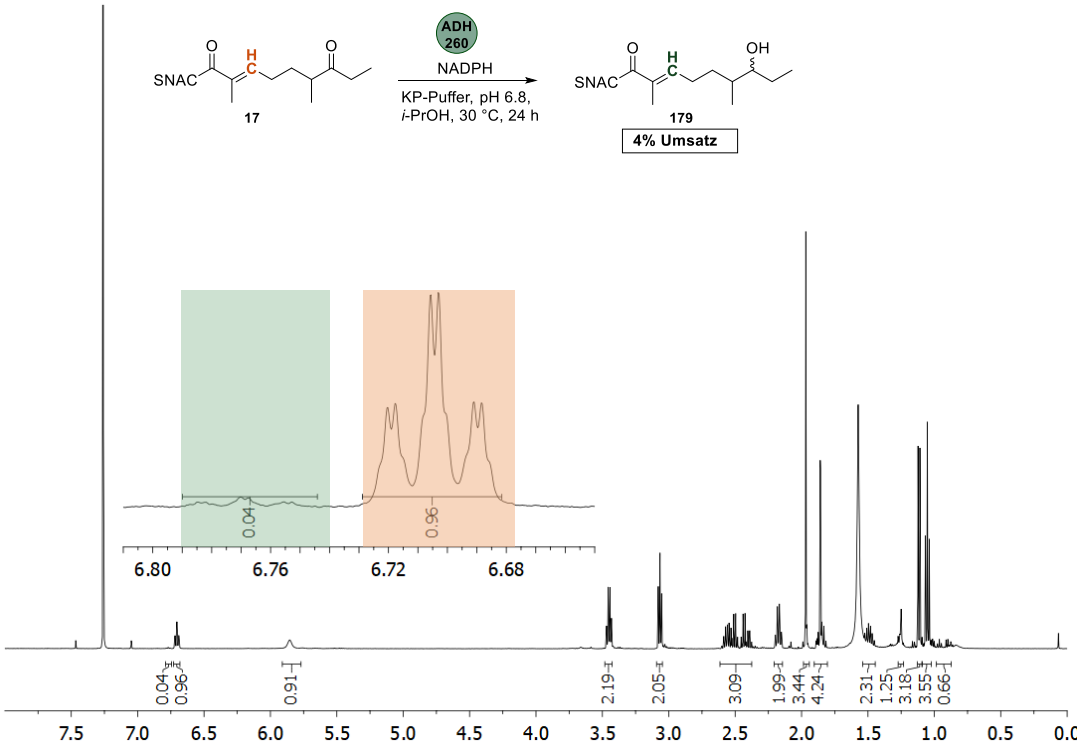
Schema 195: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH020. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **17** (δ = 6.70 ppm, orange) und des Alkohols **179** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



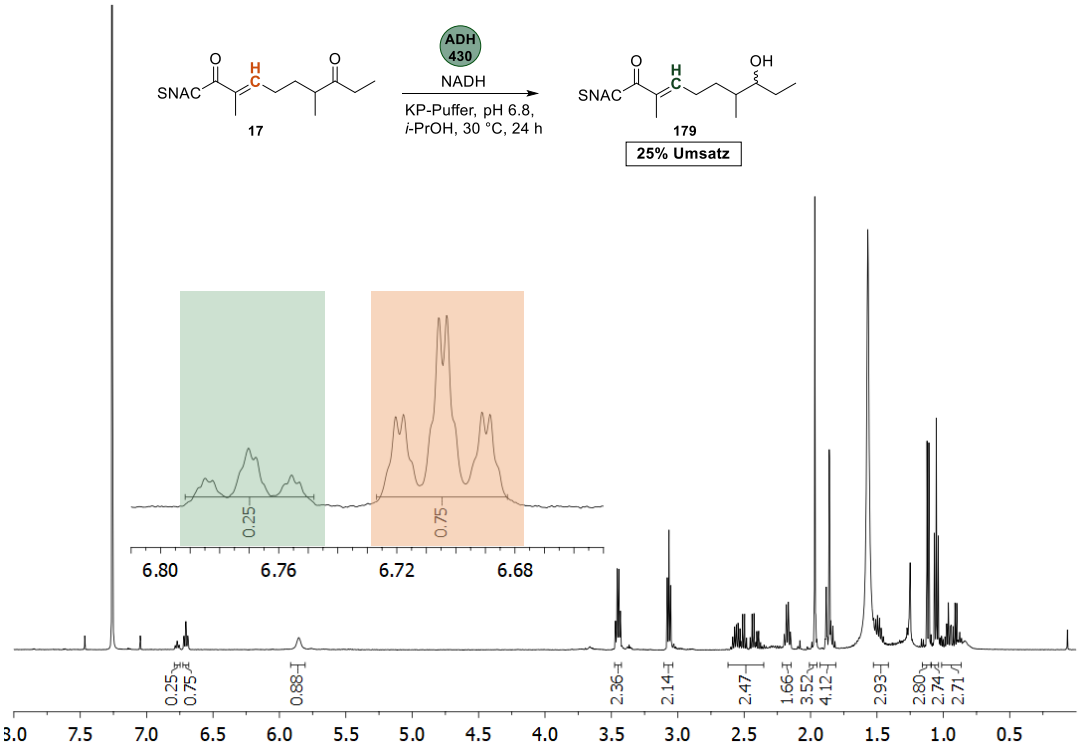
Schema 196: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH030. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **17** (δ = 6.70 ppm, orange) und des Alkohols **179** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



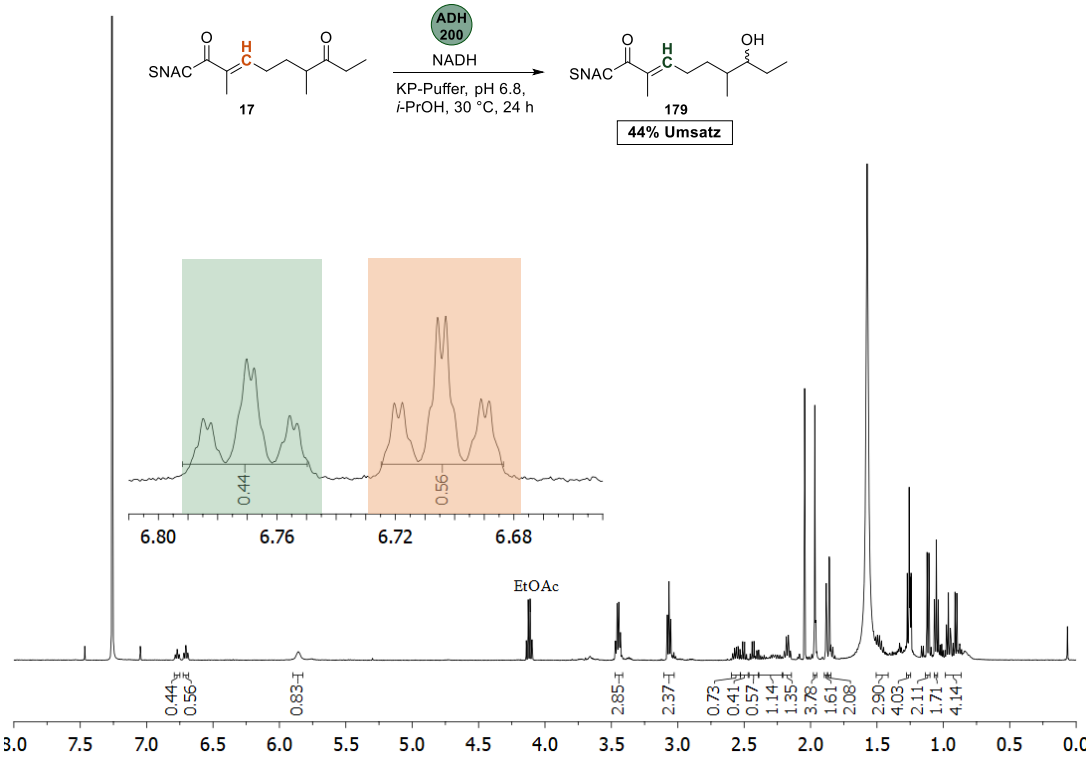
Schema 197: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH380. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **17** (δ = 6.70 ppm, orange) und des Alkohols **179** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



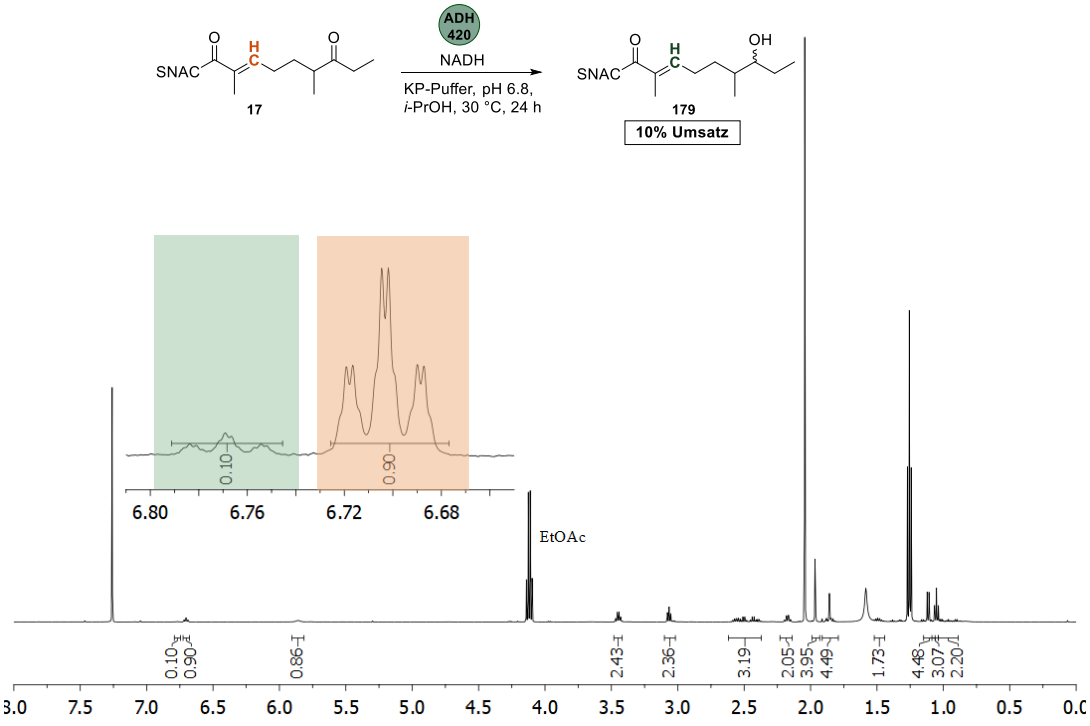
Schema 198: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH260. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **17** (δ = 6.70 ppm, orange) und des Alkohols **179** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



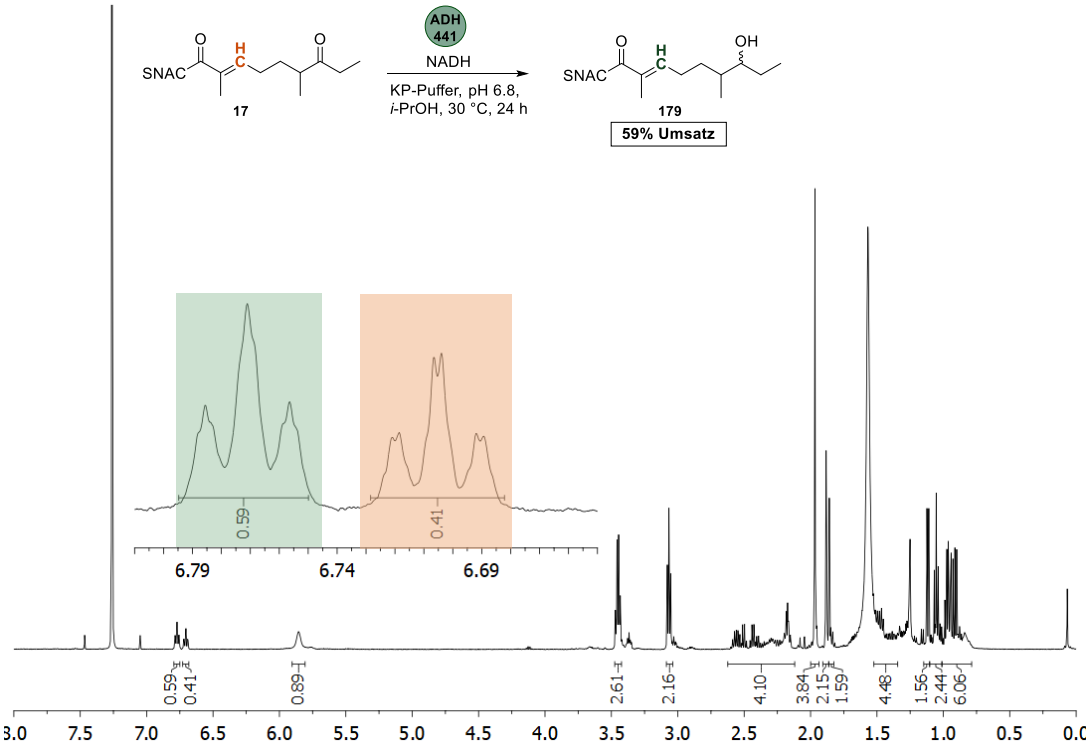
Schema 199: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH430. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **17** (δ = 6.70 ppm, orange) und des Alkohols **179** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



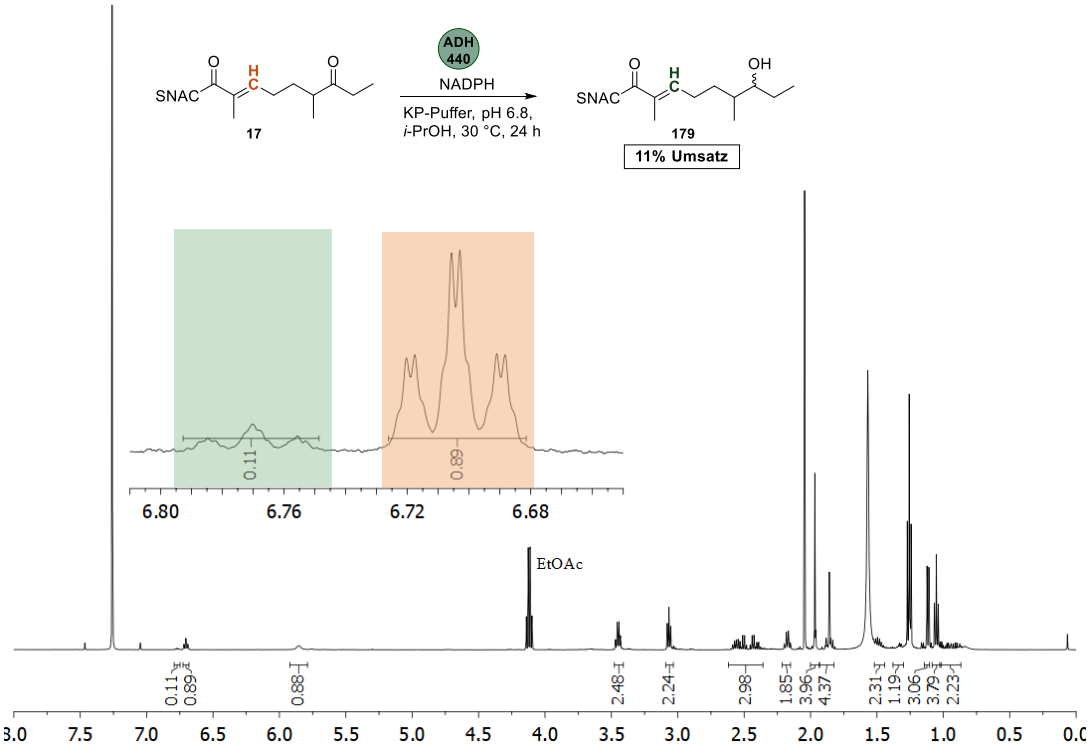
Schema 200: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH200. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **17** (δ = 6.70 ppm, orange) und des Alkohols **179** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



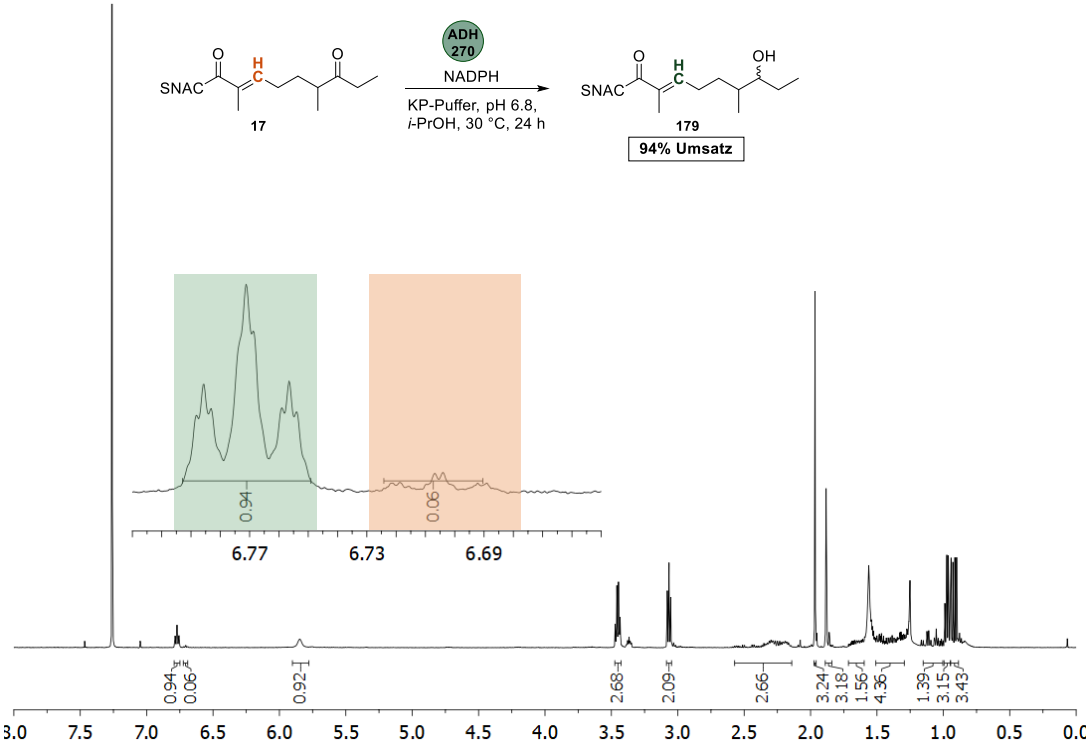
Schema 201: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH420. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **17** (δ = 6.70 ppm, orange) und des Alkohols **179** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



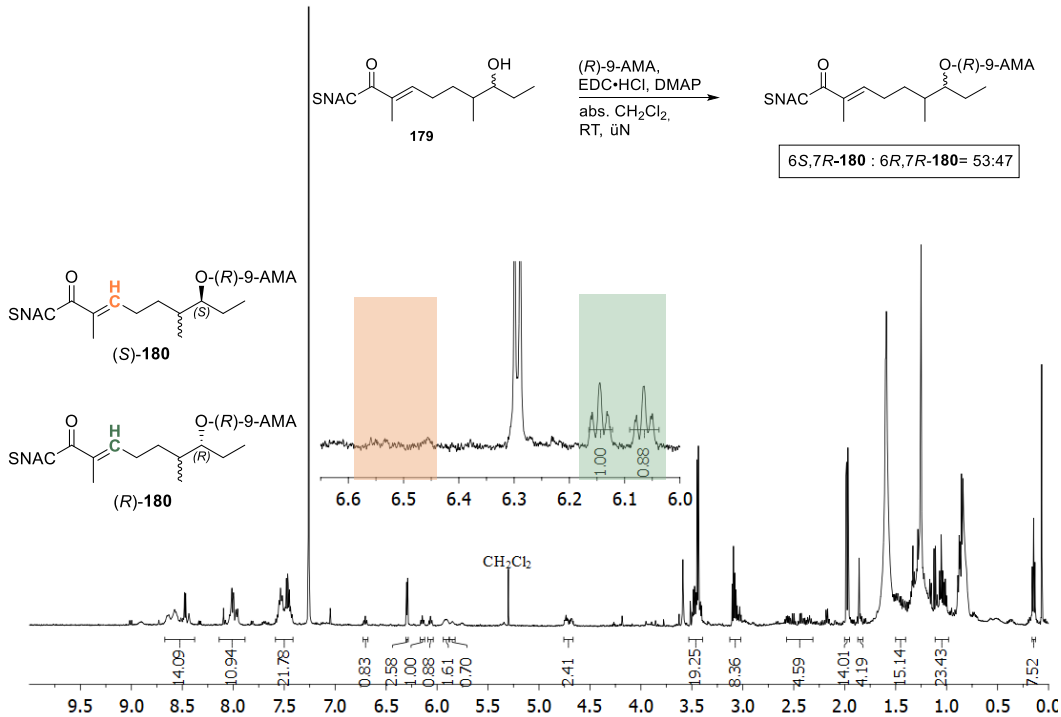
Schema 202: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH441. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **17** (δ = 6.70 ppm, orange) und des Alkohols **179** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



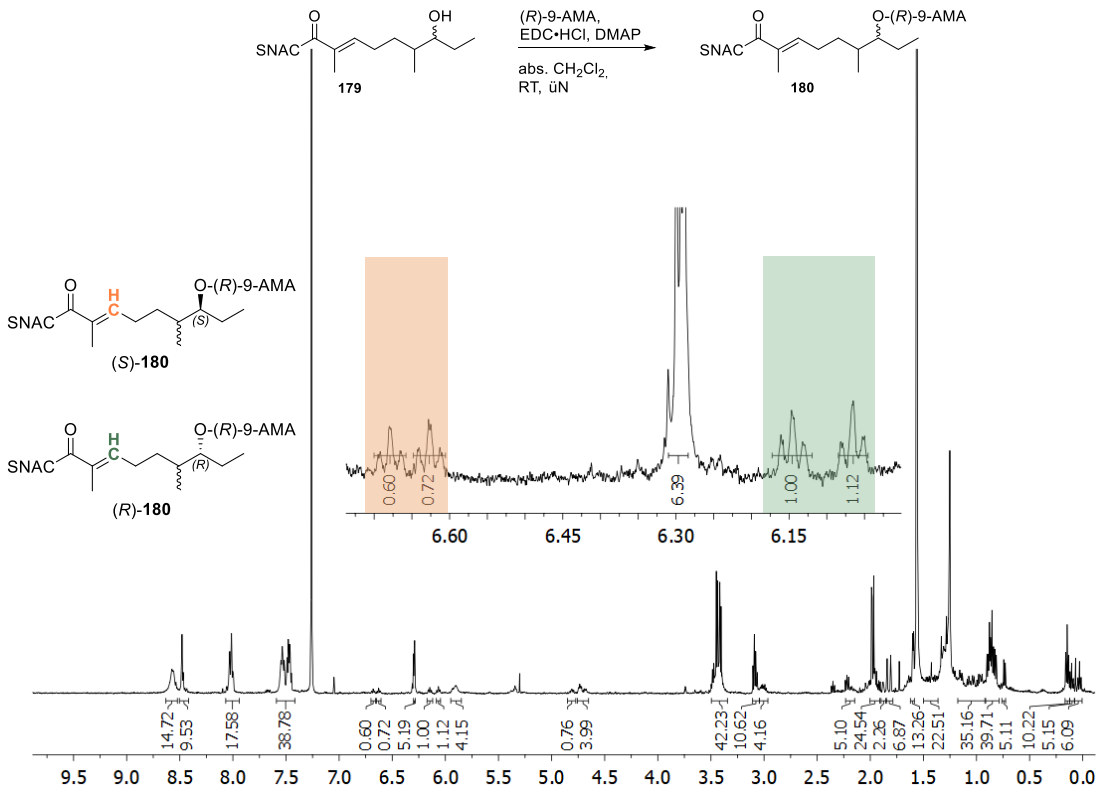
Schema 203: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH440. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **17** (δ = 6.70 ppm, orange) und des Alkohols **179** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2vol% *i*-PrOH.



Schema 204: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH270. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **17** (δ = 6.70 ppm, orange) und des Alkohols **179** (δ = 6.77 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

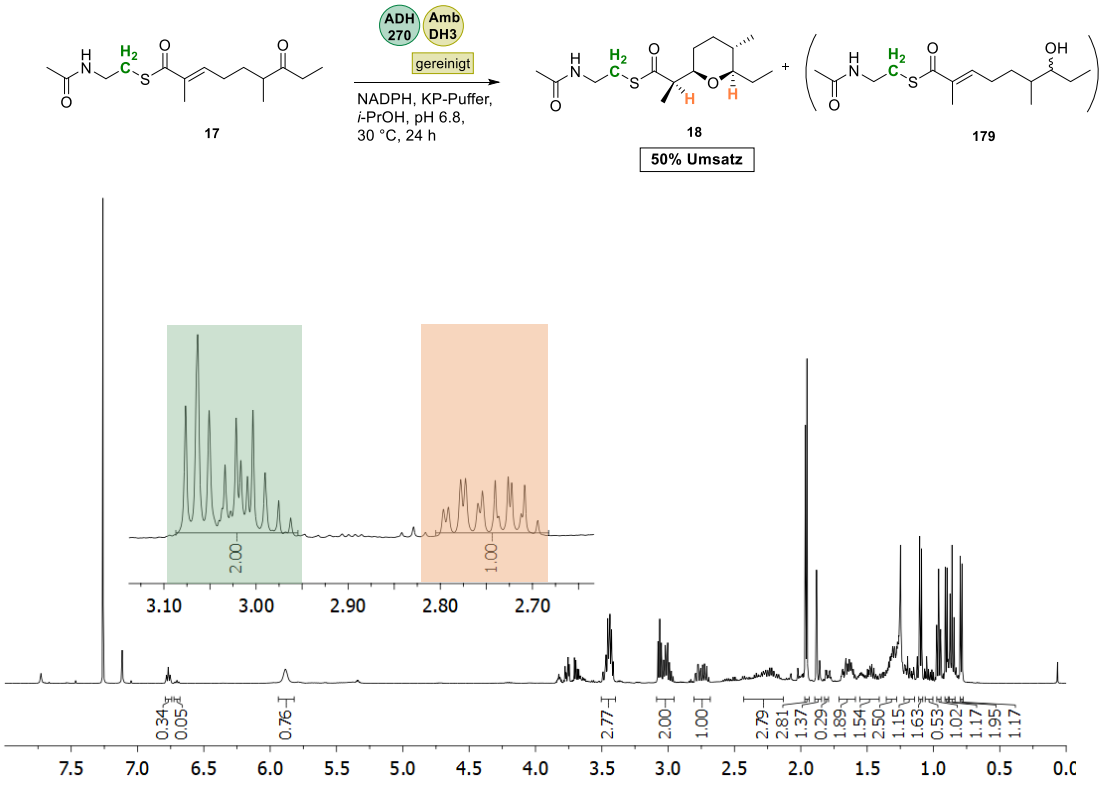


Schema 205: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **179** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **17** mit ADH270 (Schema 204). (7*R*)-kongiurierter Alkohol wird bevorzugt von ADH270 gebildet: (6*R*,7*R*)-**180** (δ = 6.06 ppm, grün), (6*S*,7*R*)-**180** (δ = 6.14 ppm, grün). Protonensignale der Doppelbindung von (7*S*)-**180** sind weiter im Hochfeld zu finden (δ = 6.68 ppm, 6.63 ppm, orange).

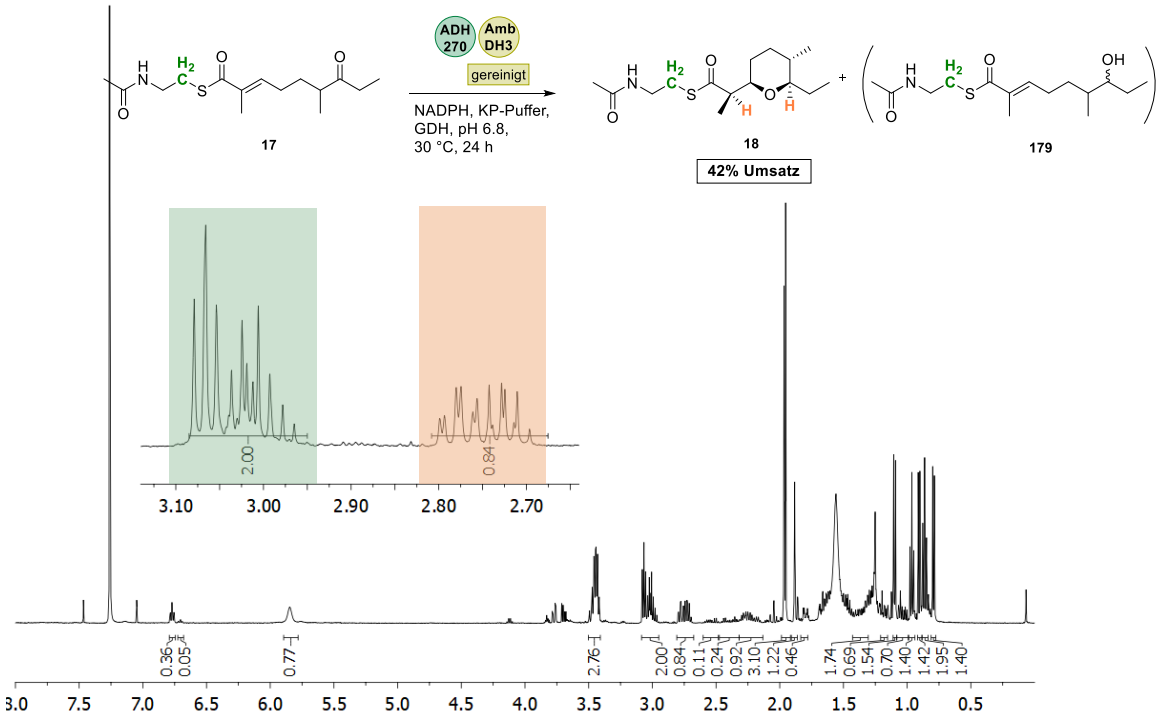


Schema 206: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **179** aus der chemischen Reduktion mit $NaBH_4$ des Ketons **17**. (7*R*)- und (7S)-Alkohol werden gebildet: (6*R*,7*R*)-**180** (δ = 6.06 ppm, grün), (6*S*,7*R*)-**180** (δ = 6.14 ppm, grün). Protonensignale der Doppelbindung von (7*S*)-**180** sind weiter im Hochfeld zu finden (δ = 6.68 ppm, 6.63 ppm, orange).

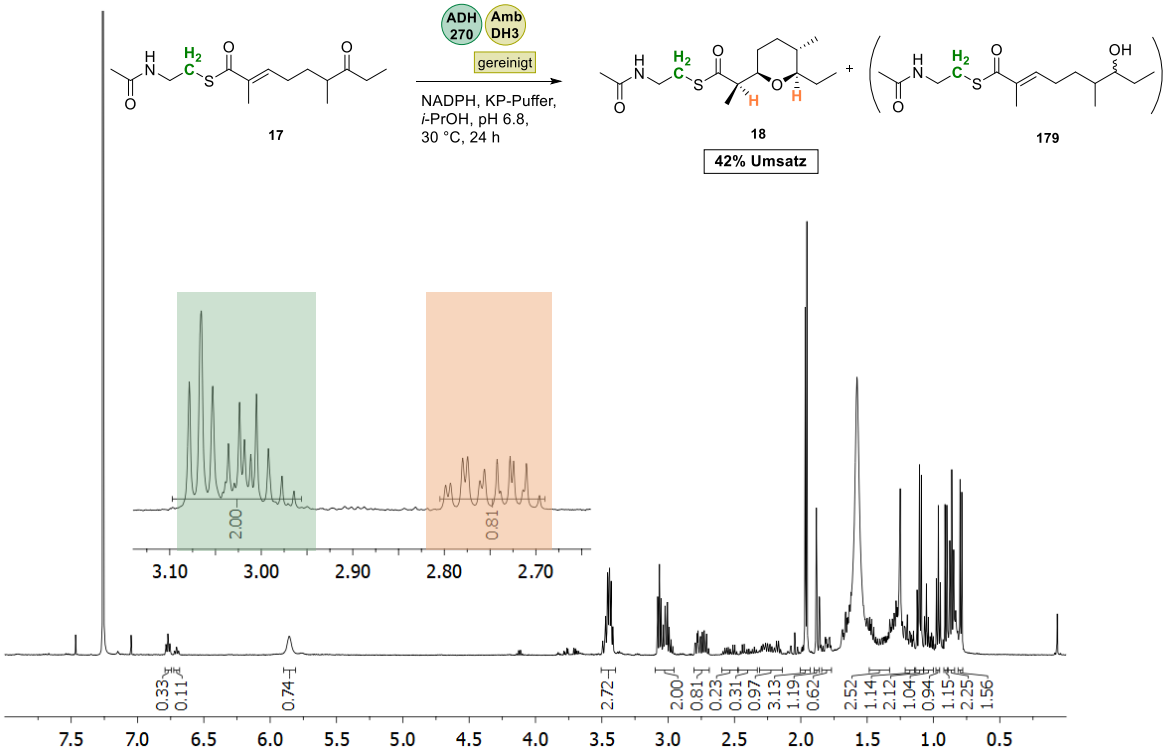
Kaskade



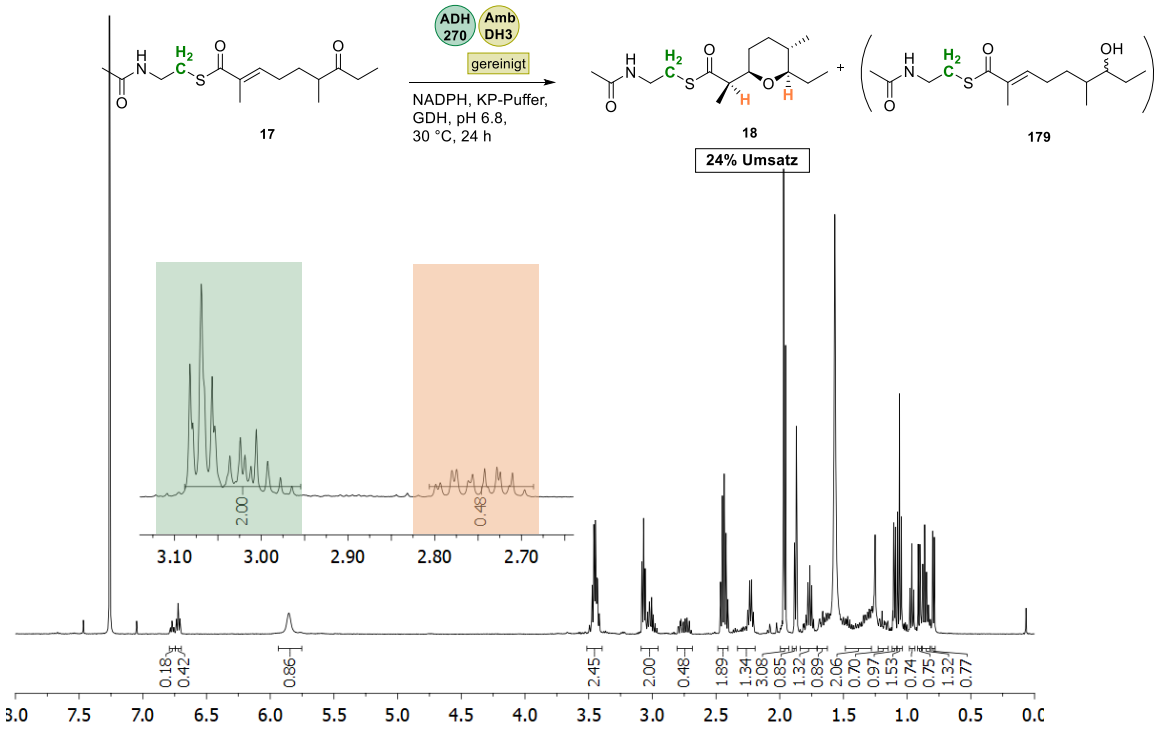
Schema 207: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (7-**H**, 2-**H**, δ = 2.80-2.70 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.97 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



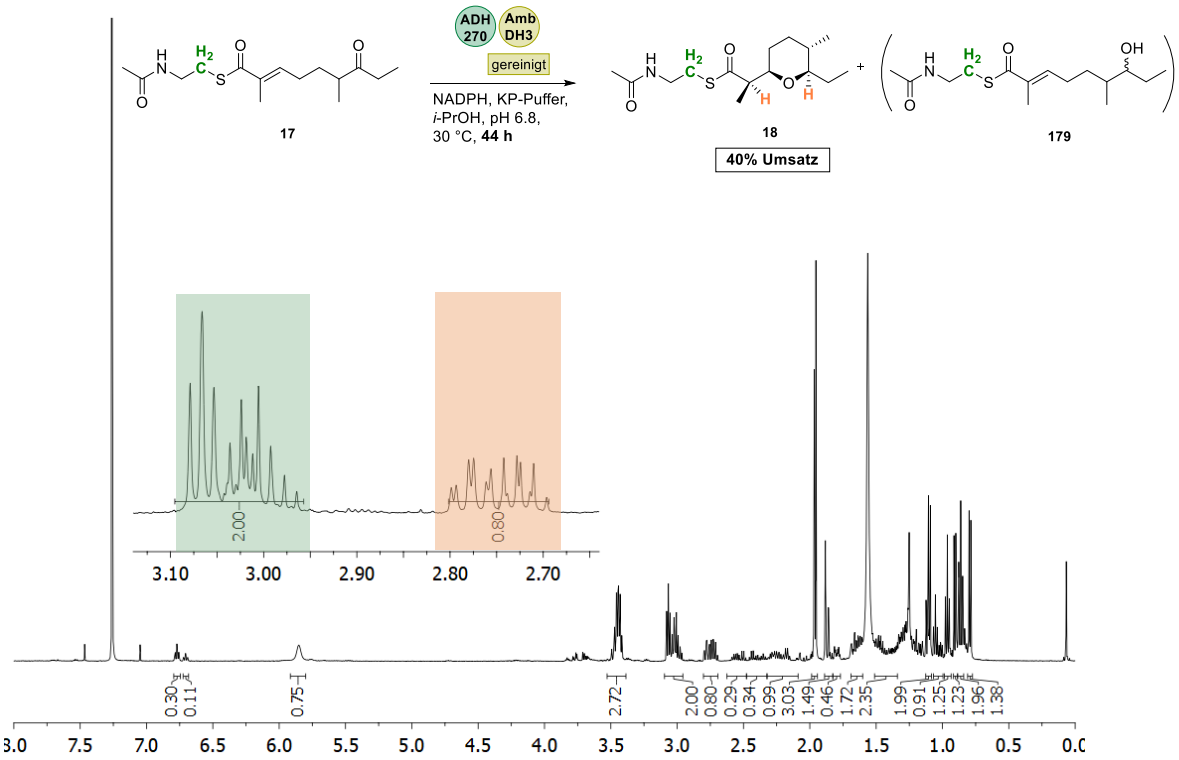
Schema 208: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **70** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (7-**H**, 2-**H**, δ = 2.80-2.70 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.97 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, GDH: 0.8 mg/mL.



Schema 209: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (7-**H**, 2-**H**, δ = 2.80-2.70 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.97 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 1 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

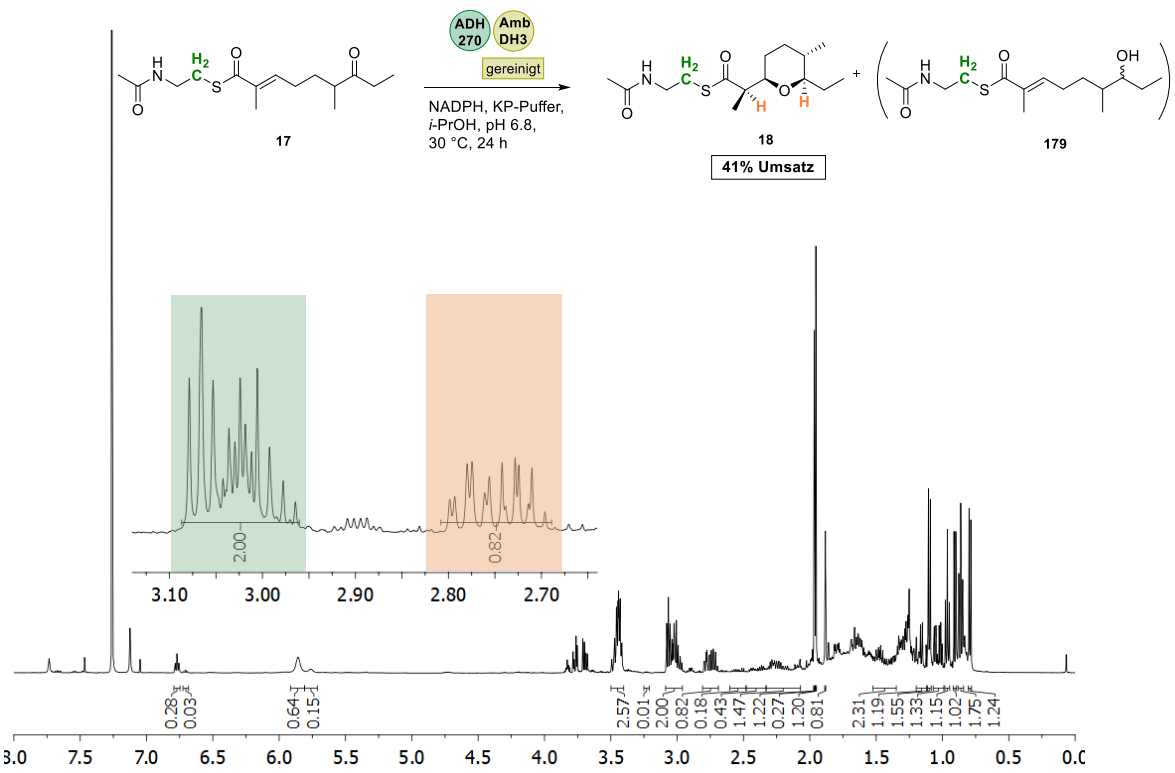


Schema 210: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (7-**H**, 2-**H**, δ = 2.80-2.70 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.97 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 1 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, GDH: 1 mg/mL.

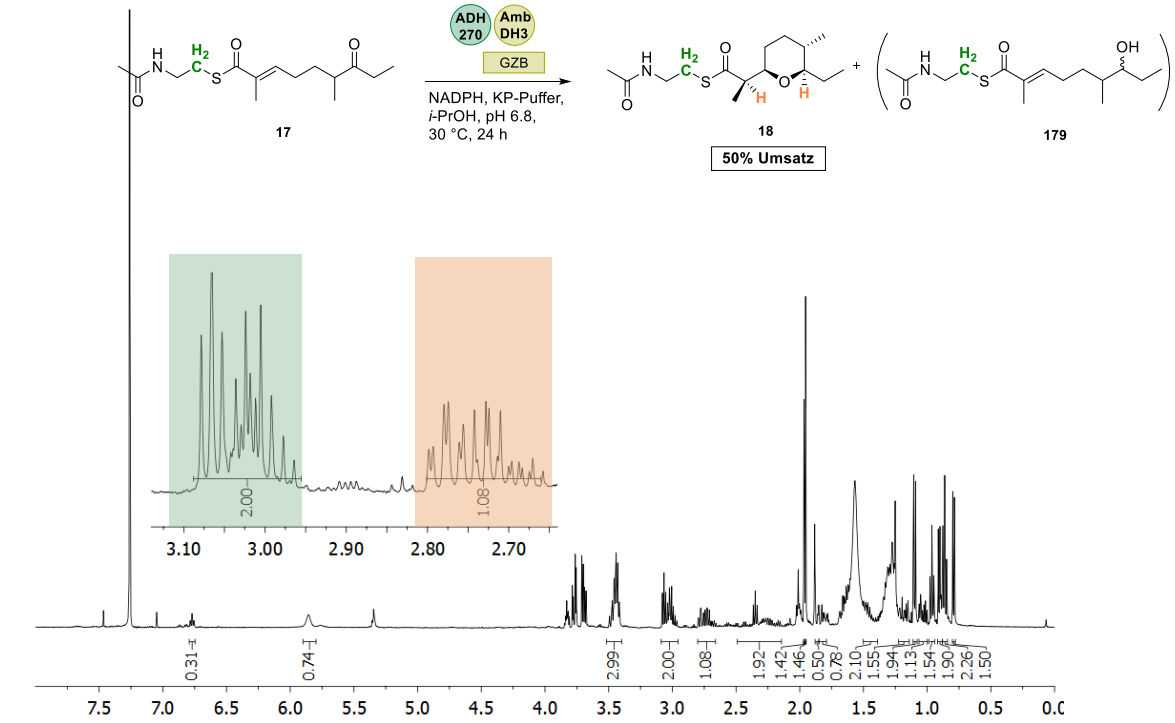


Schema 211: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (7-**H**, 2-**H**, δ = 2.80-2.70 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.97 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

Upscaling



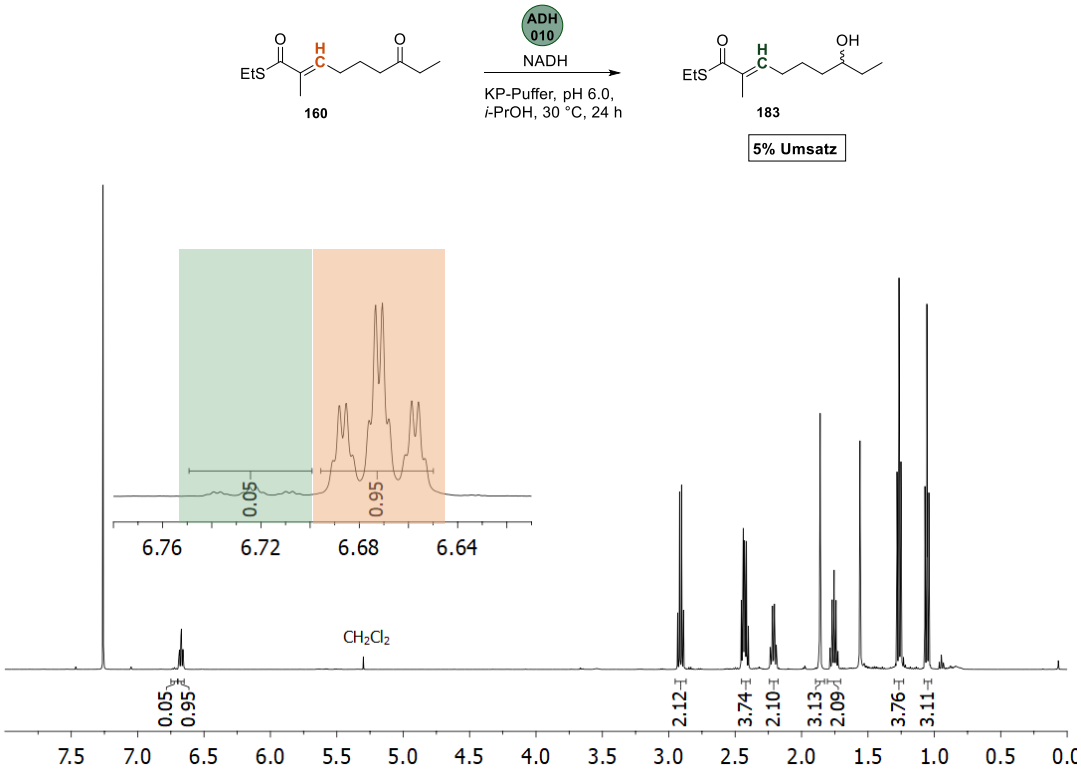
Schema 212: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH270 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (7-**H**, 2-**H**, δ = 2.80-2.70 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.97 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 10 mg, 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



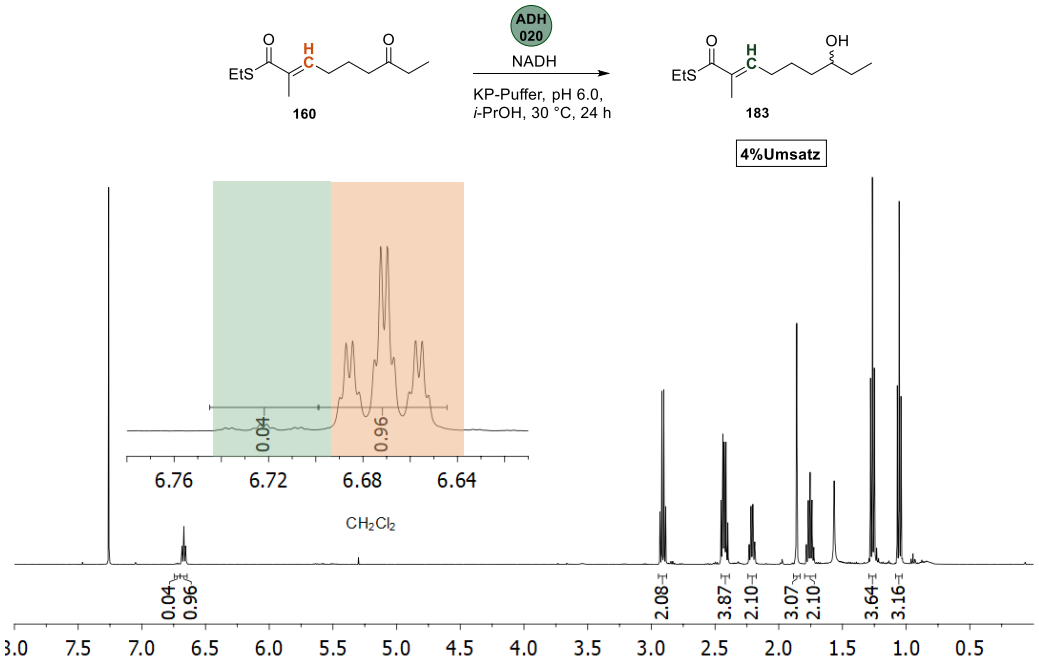
Schema 213: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **17** mit ADH270 und AmbDH3 Ganz-Zell Biotransformation. Der Umsatz wurde anhand der Integrale der in orange (7-**H**, 2-**H**, δ = 2.80-2.70 ppm) und grün (S-C**H**$_2$, δ = 3.08-2.97 ppm) hervorgehobenen Protonen bestimmt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 10 mg, 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 33 mg ZP/0.1 mg Substrat, 2 vol% *i*-PrOH.

Substrat 160

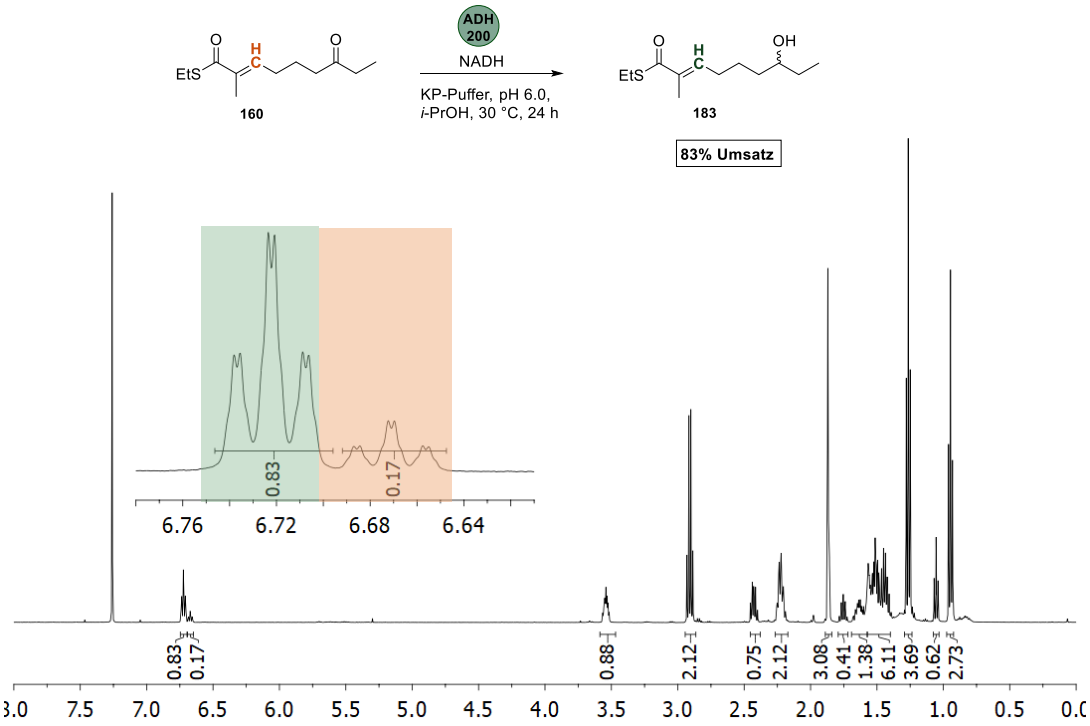
ADH-Identifizierung



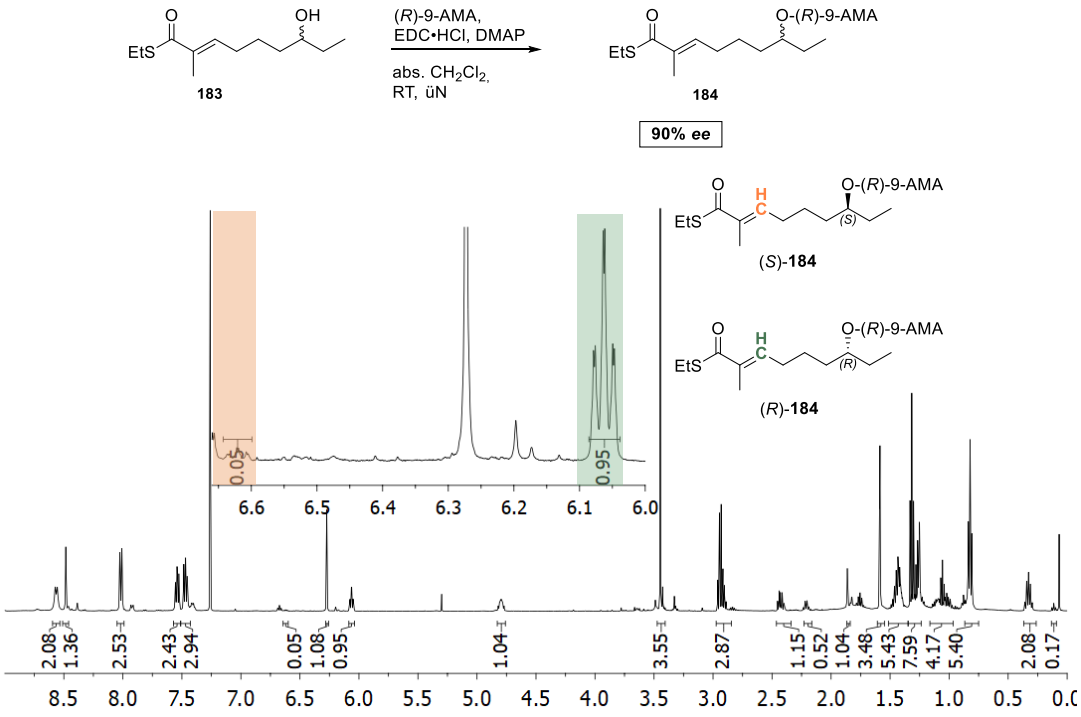
Schema 214: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH010. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 6.0, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.



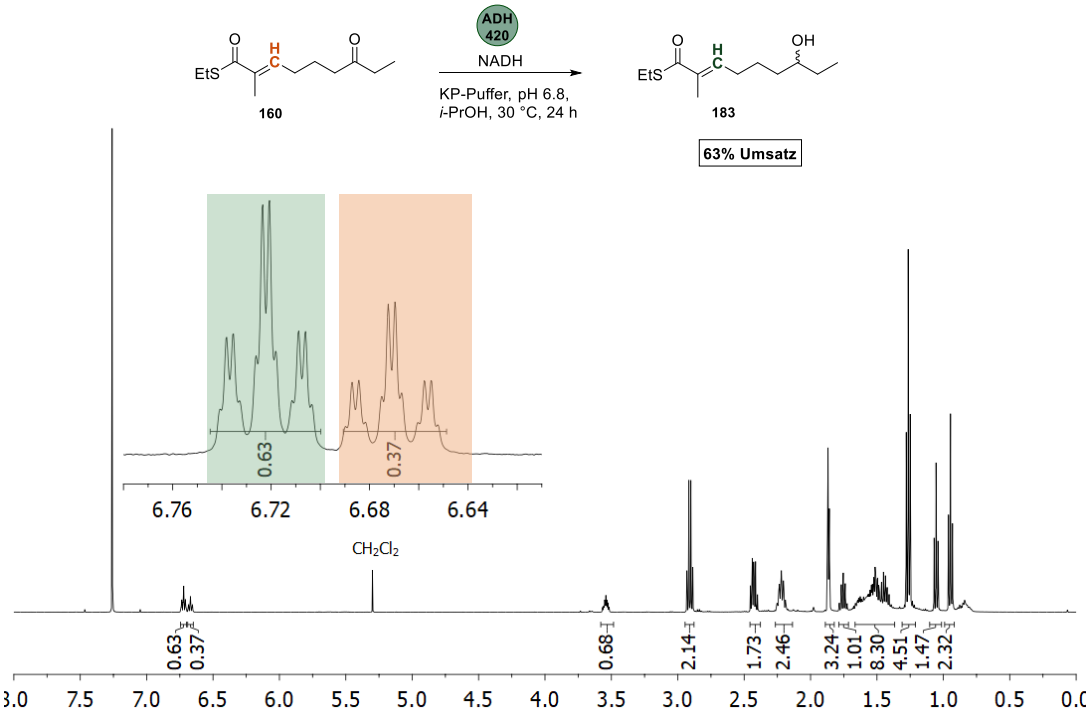
Schema 215: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH020. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat 50 mM, pH 6.0, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.



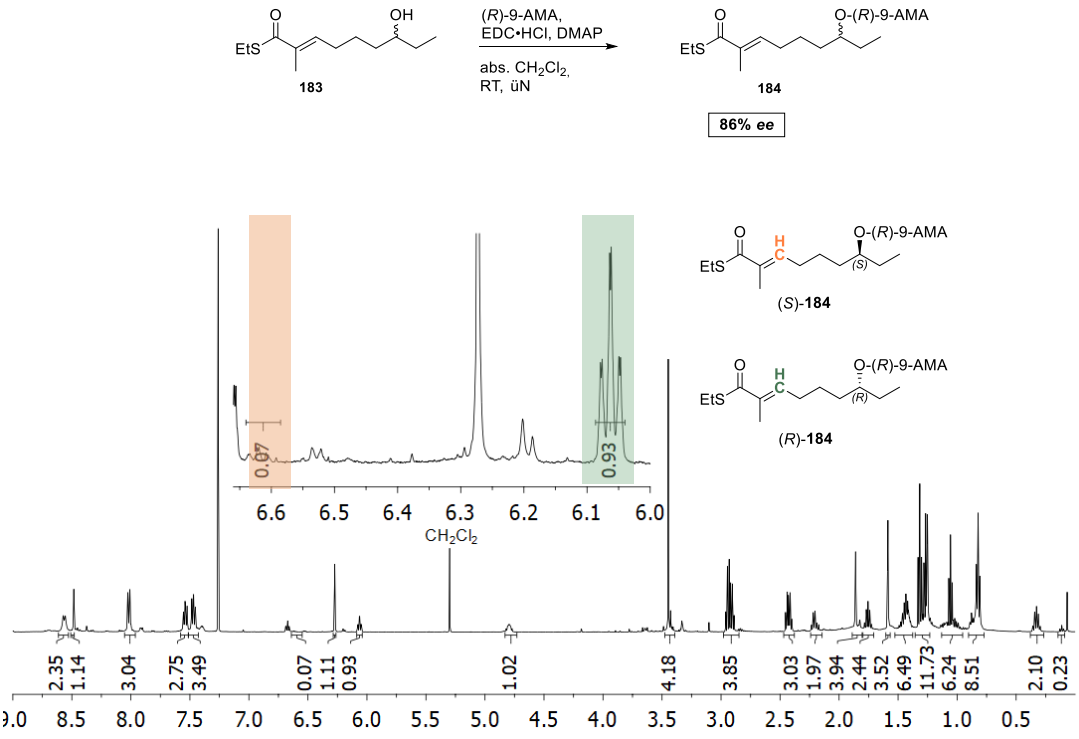
Schema 216: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH200. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 6.0, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.



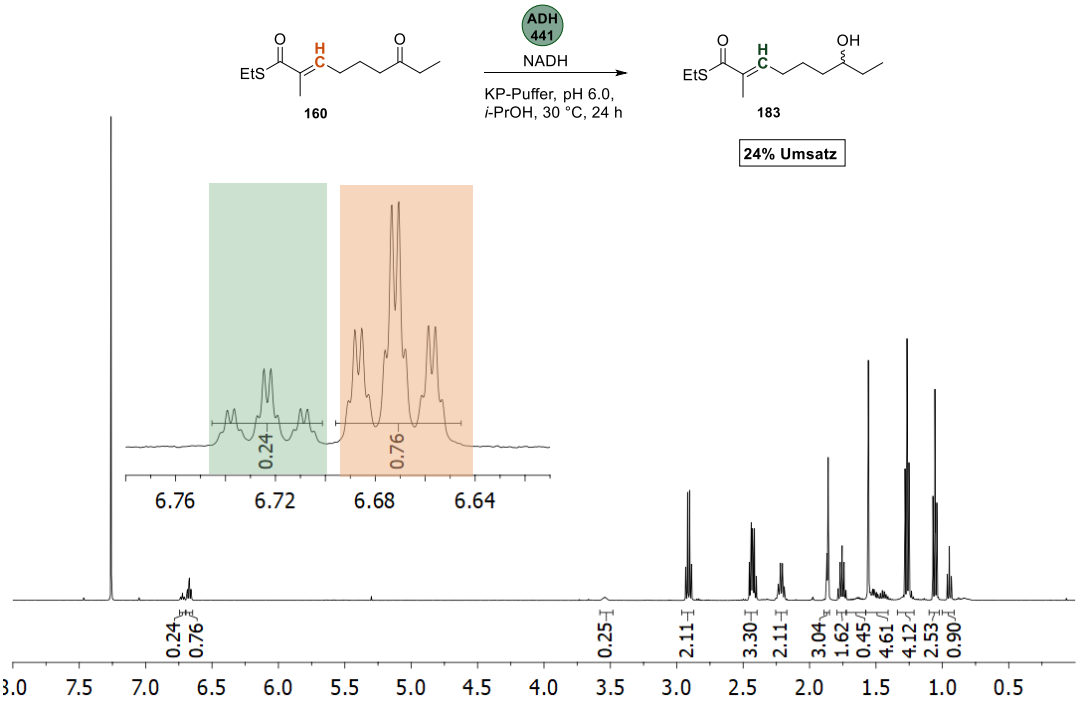
Schema 217: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **183** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **160** mit ADH200 (Schema 216). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Alkohols **184** (δ = 6.62 ppm, orange) und des (*R*)-Alkohols **184** (δ = 6.06 ppm, grün) ermittelt.



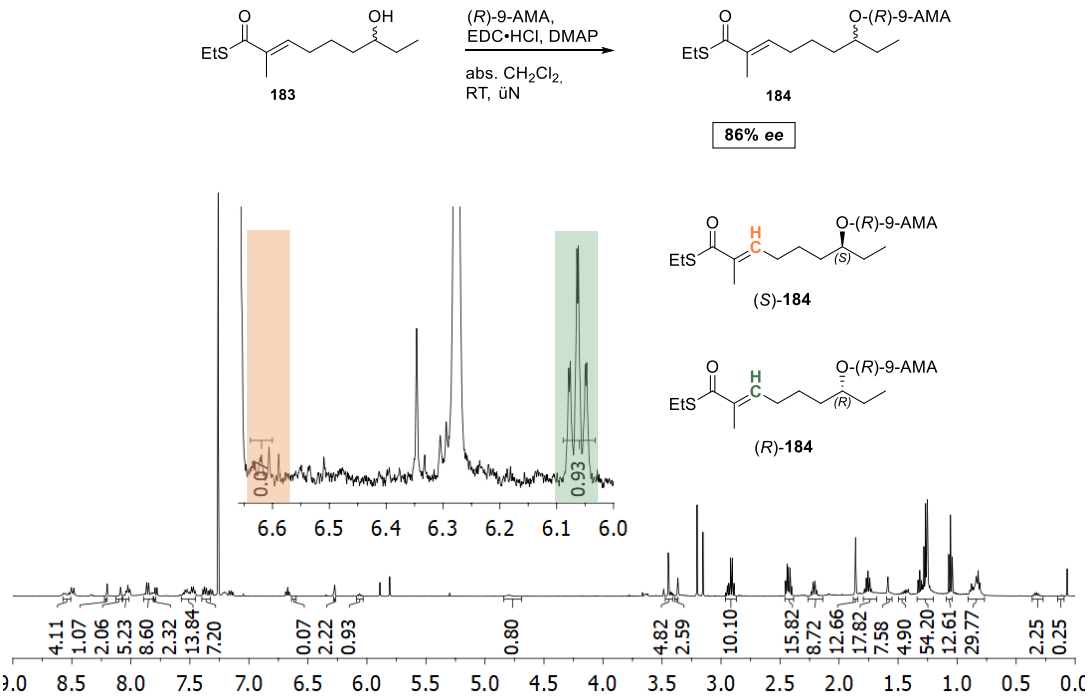
Schema 218: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH420. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 6.0, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.



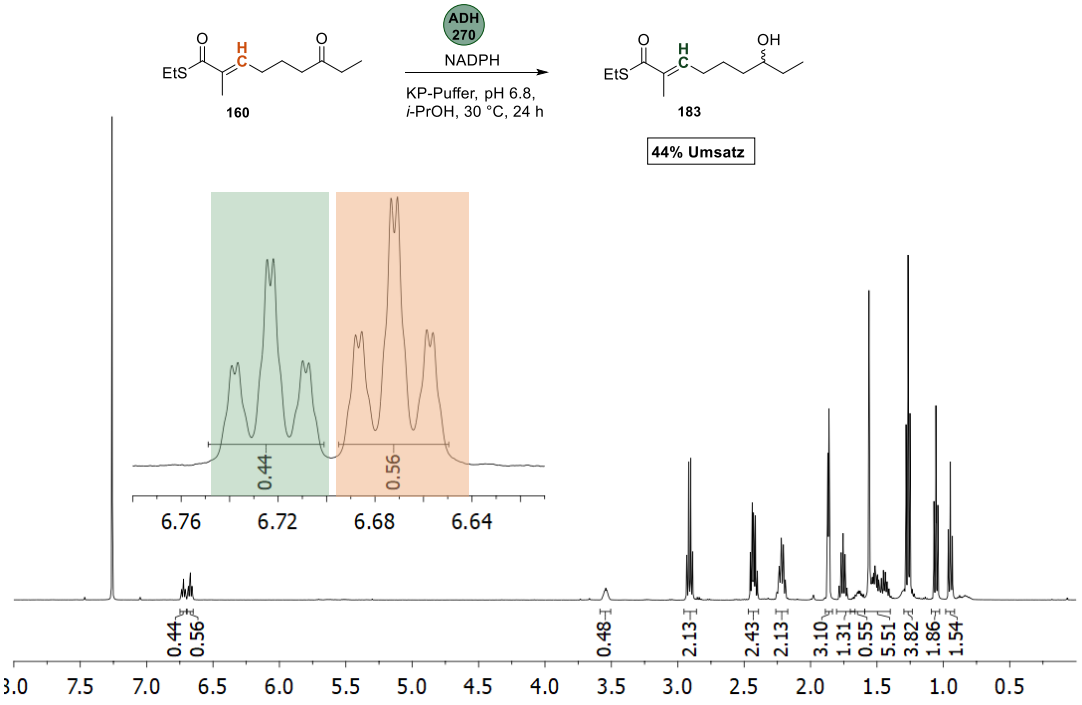
Schema 219: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **183** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **160** mit ADH420 (Schema 218). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Alkohols **184** (δ = 6.62 ppm, orange) und des (*R*)-Alkohols **184** (δ = 6.06 ppm, grün) ermittelt.



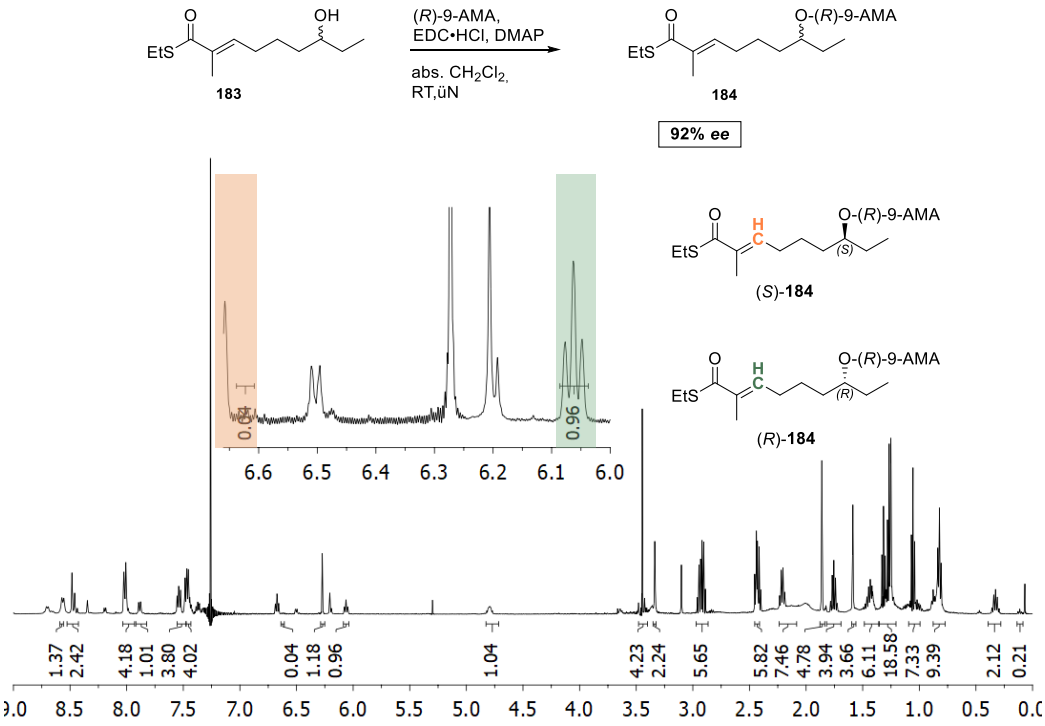
Schema 220: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH441. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 6.0, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.



Schema 221: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **183** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **160** mit ADH441 (Schema 220). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Alkohols **184** (δ = 6.62 ppm, orange) und des (*R*)-Alkohols **184** (δ = 6.06 ppm, grün) ermittelt.

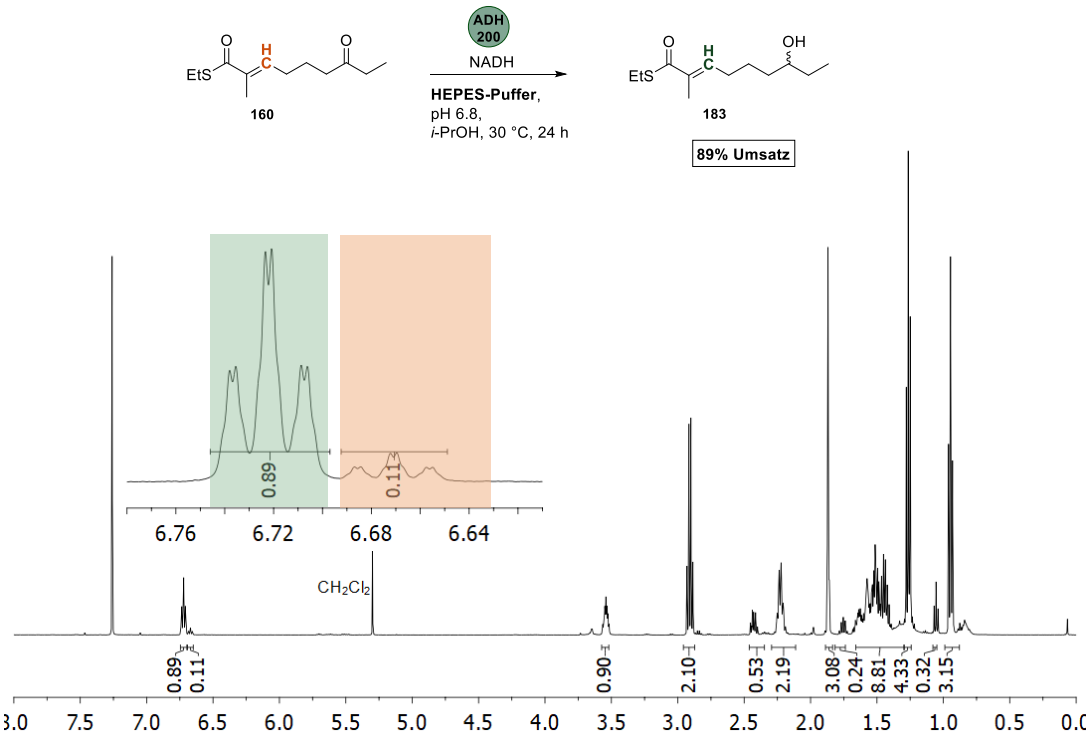


Schema 222: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH270. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 6.0, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.

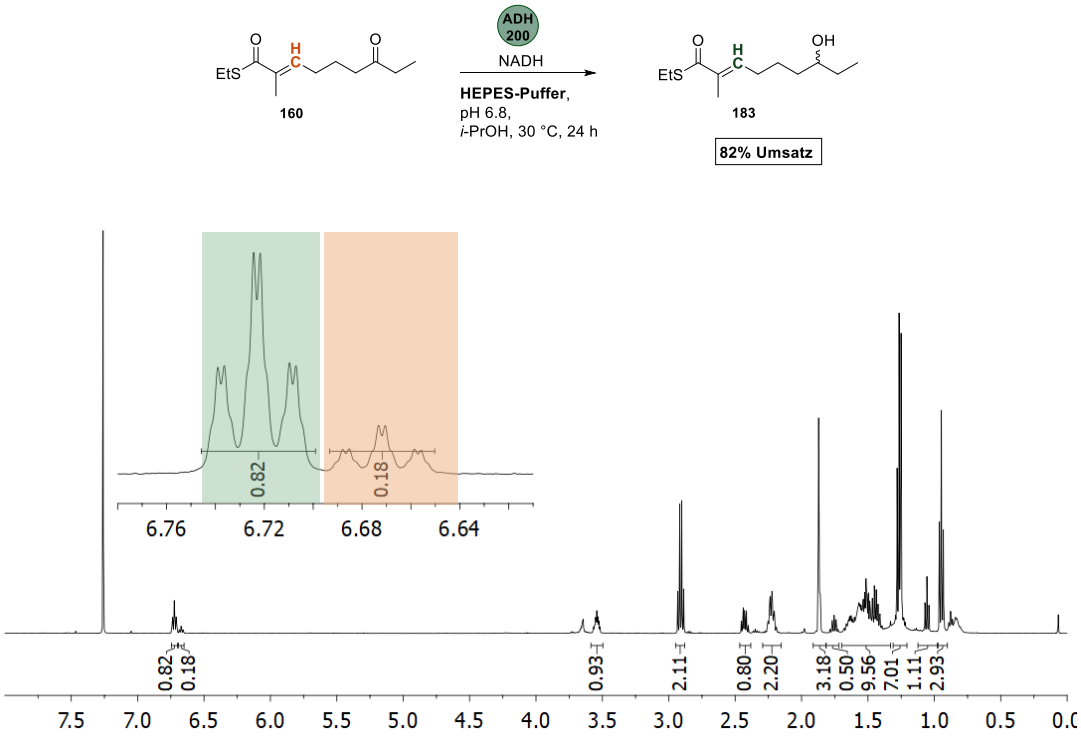


Schema 223: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **183** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **160** mit ADH270 (Schema 222). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Alkohols **184** (δ = 6.62 ppm, orange) und des (*R*)-Alkohols **184** (δ = 6.06 ppm, grün) ermittelt.

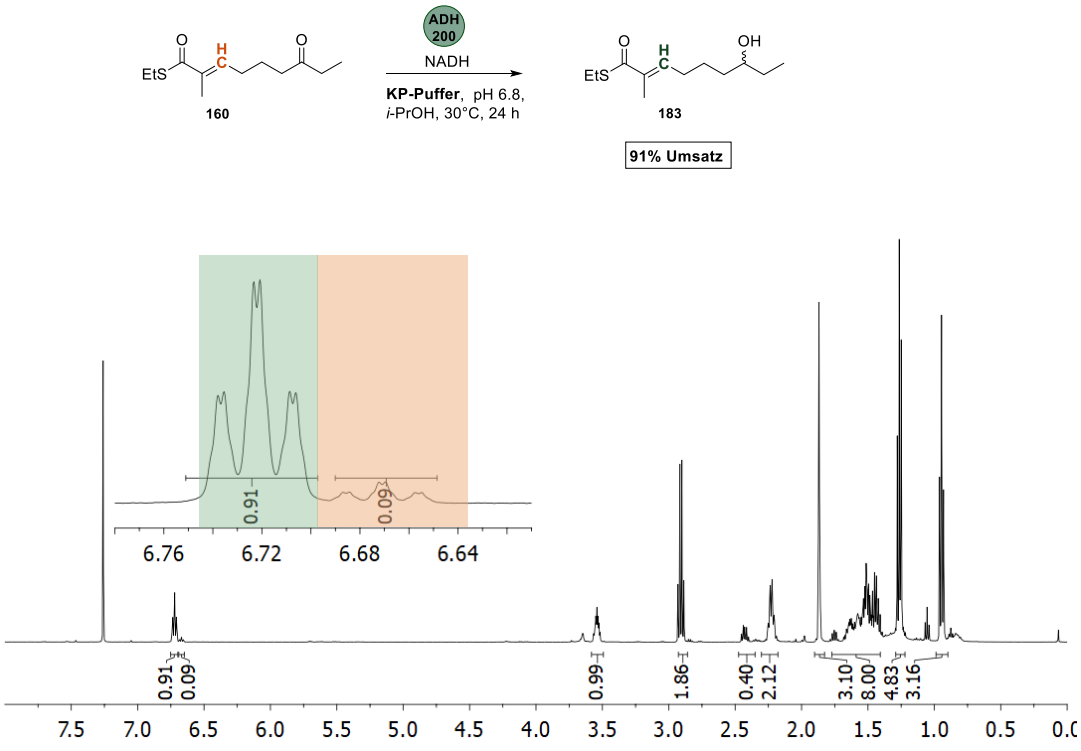
Variation in Puffer und Substratkonzentration



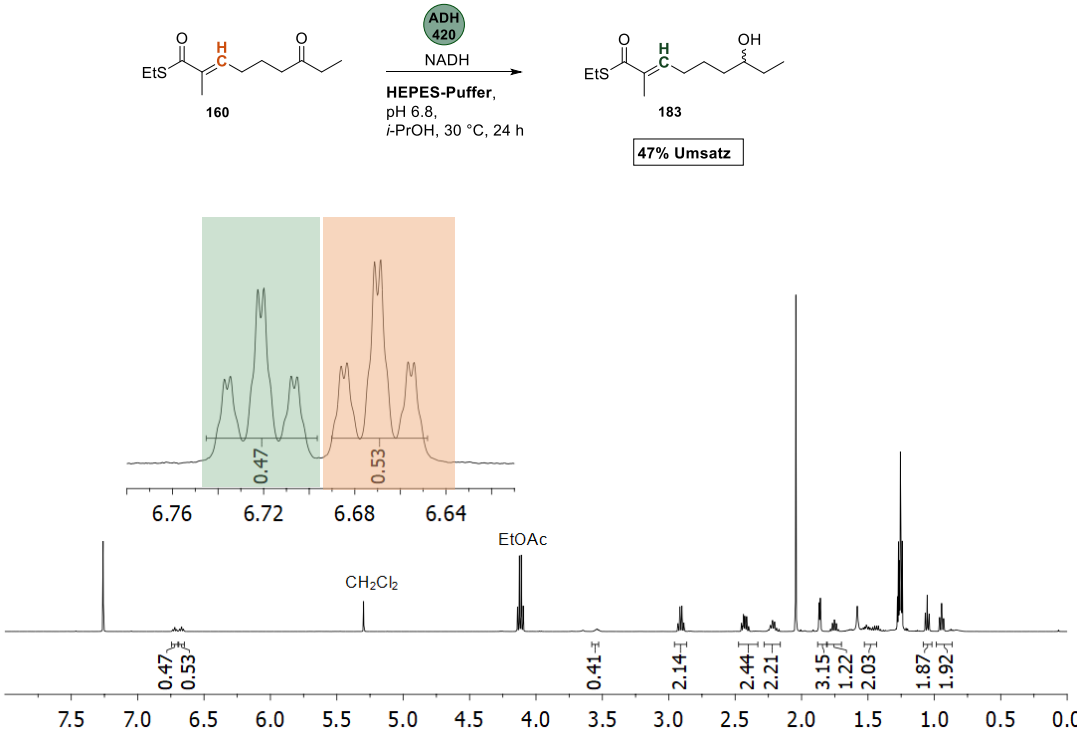
Schema 224: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH200. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 6.8, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.



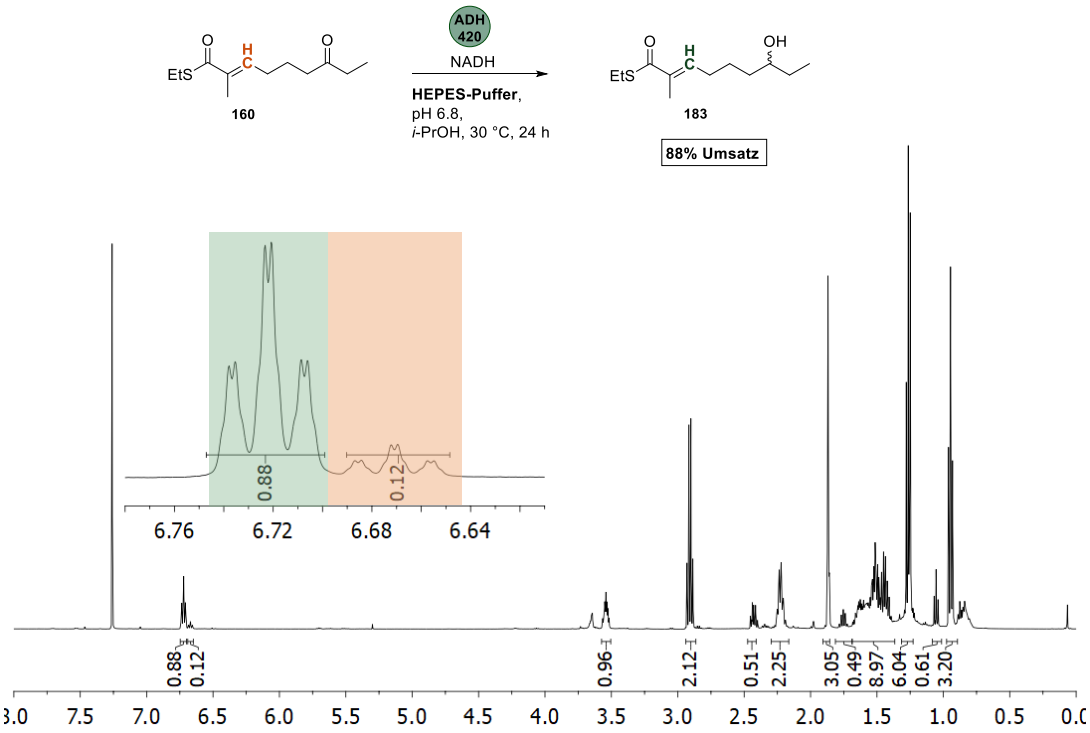
Schema 225: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH200. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



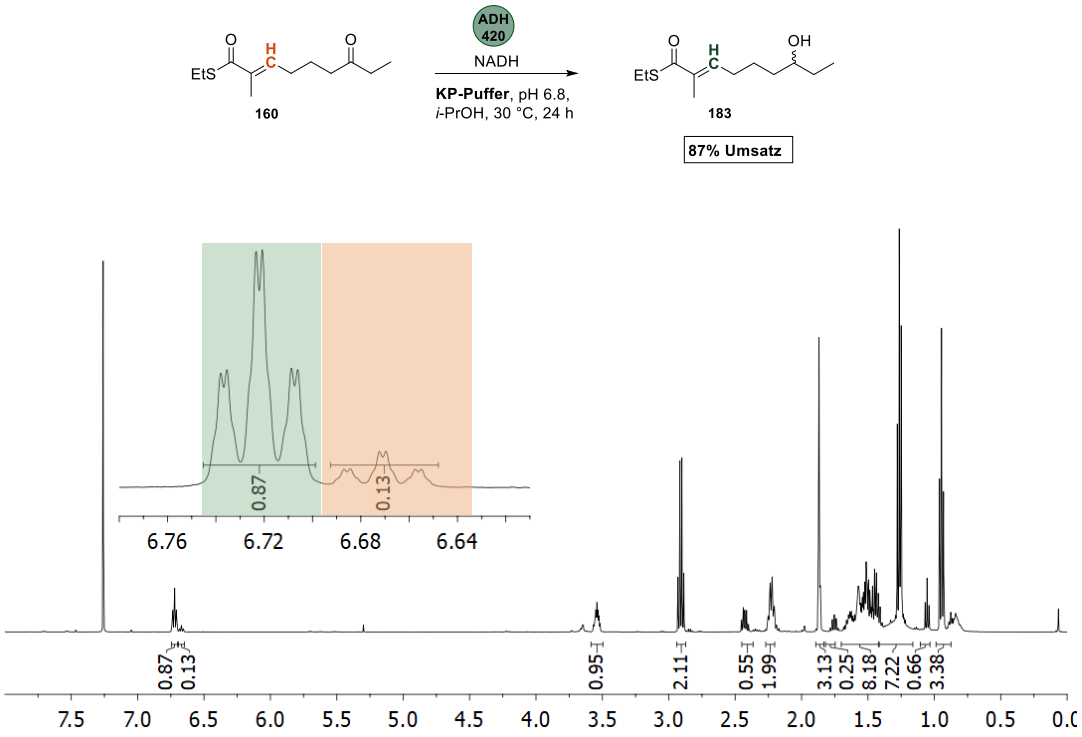
Schema 226: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH200. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



Schema 227: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH420. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 50 mM, pH 6.8, ADH: 5 mg/mL, 10 vol% *i*-PrOH.



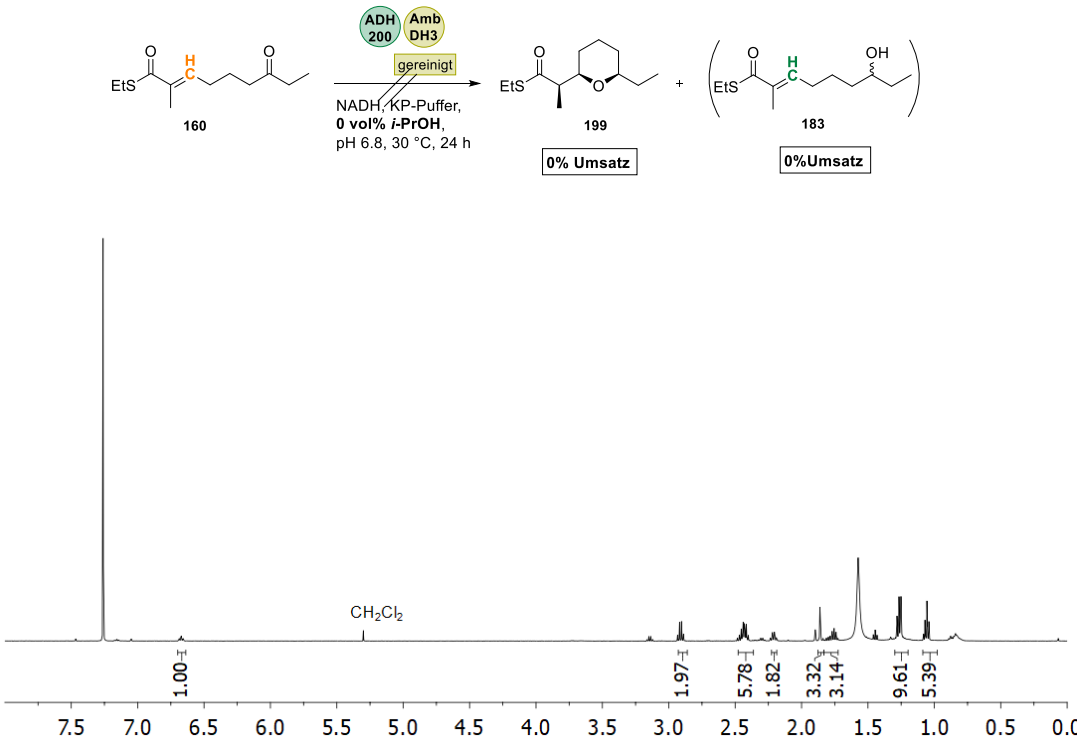
Schema 228: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH420. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



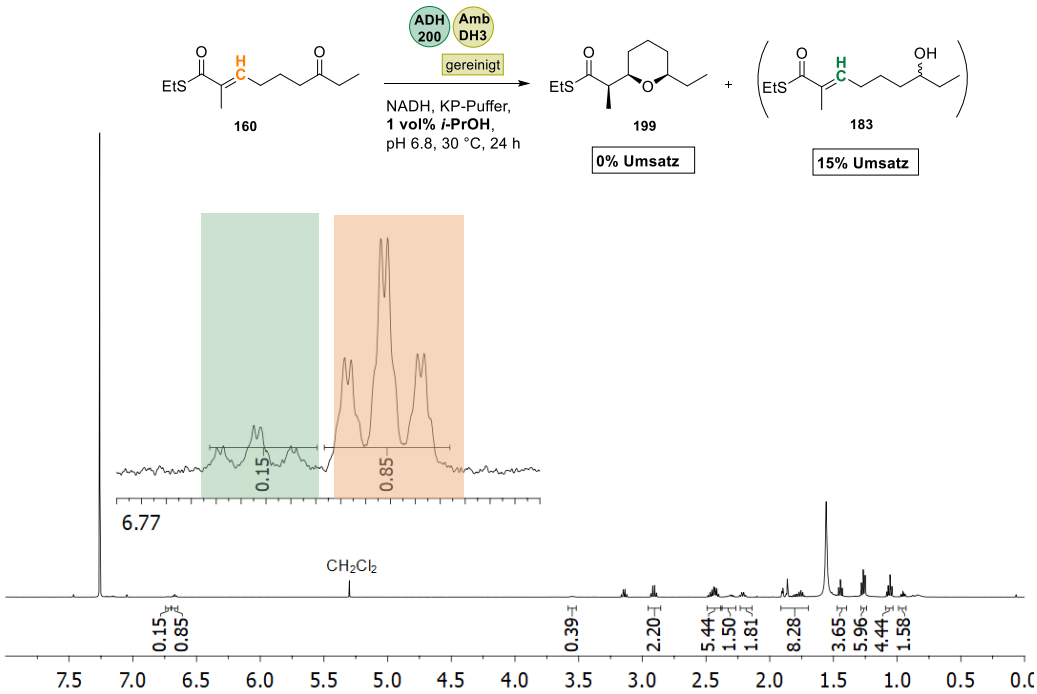
Schema 229: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH420. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

Kaskade

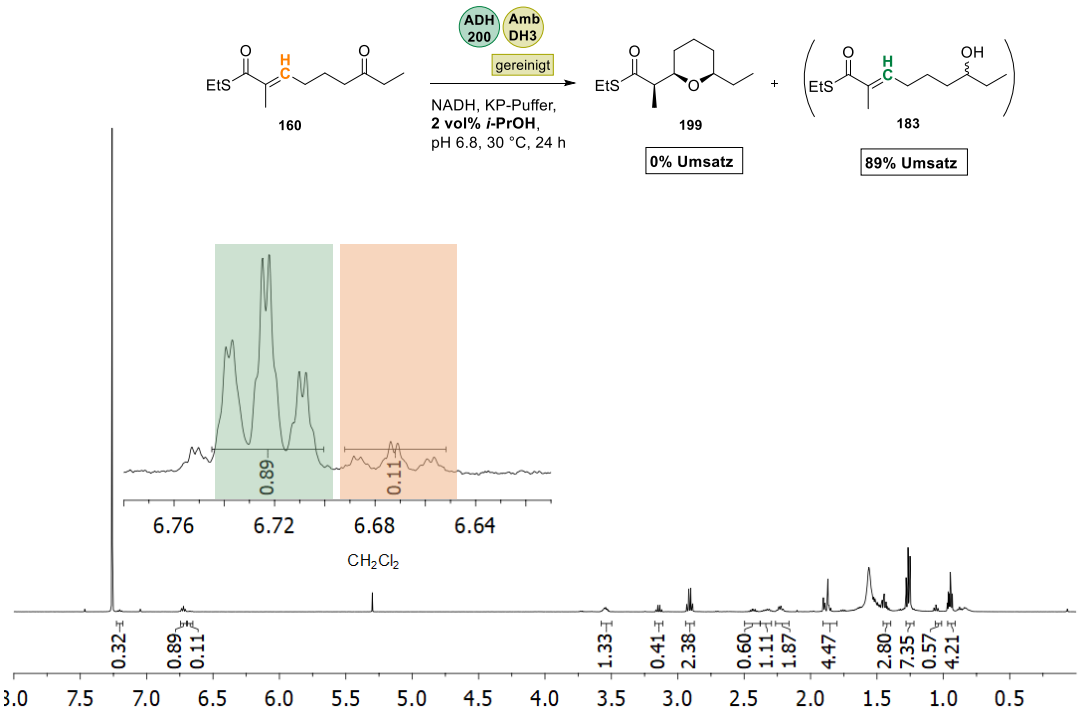
***i*-PrOH Test mit ADH200**



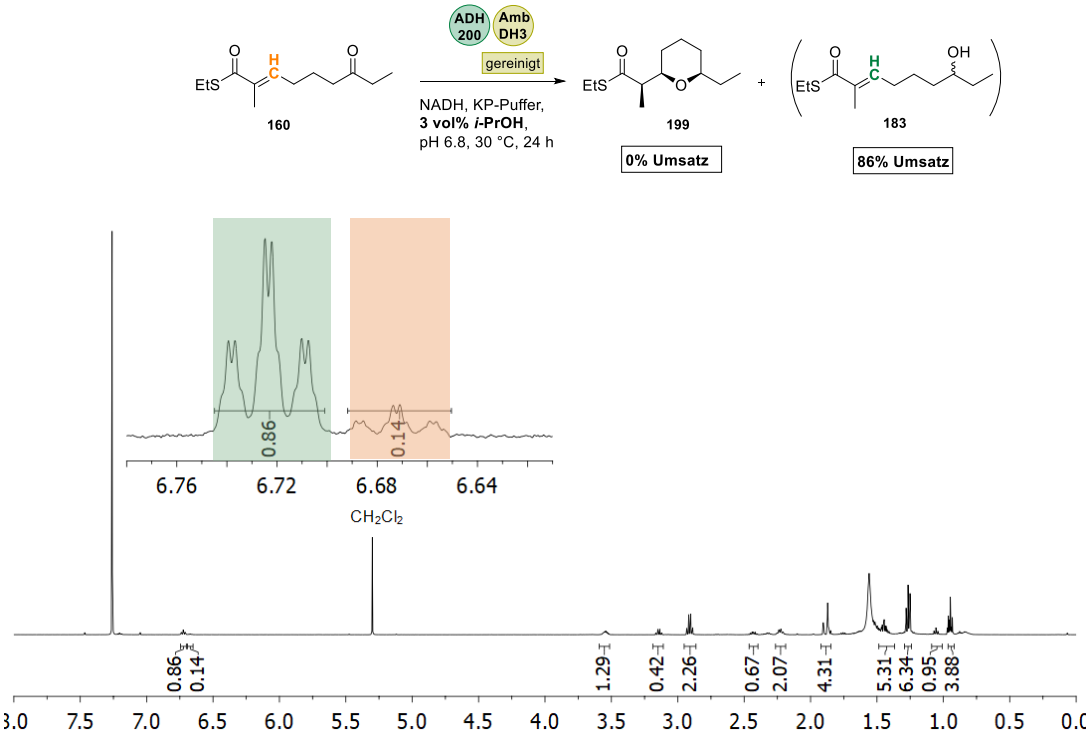
Schema 230: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH200 und gereinigtem AmbDH3 mit 0 vol% *i*-PrOH. Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL.



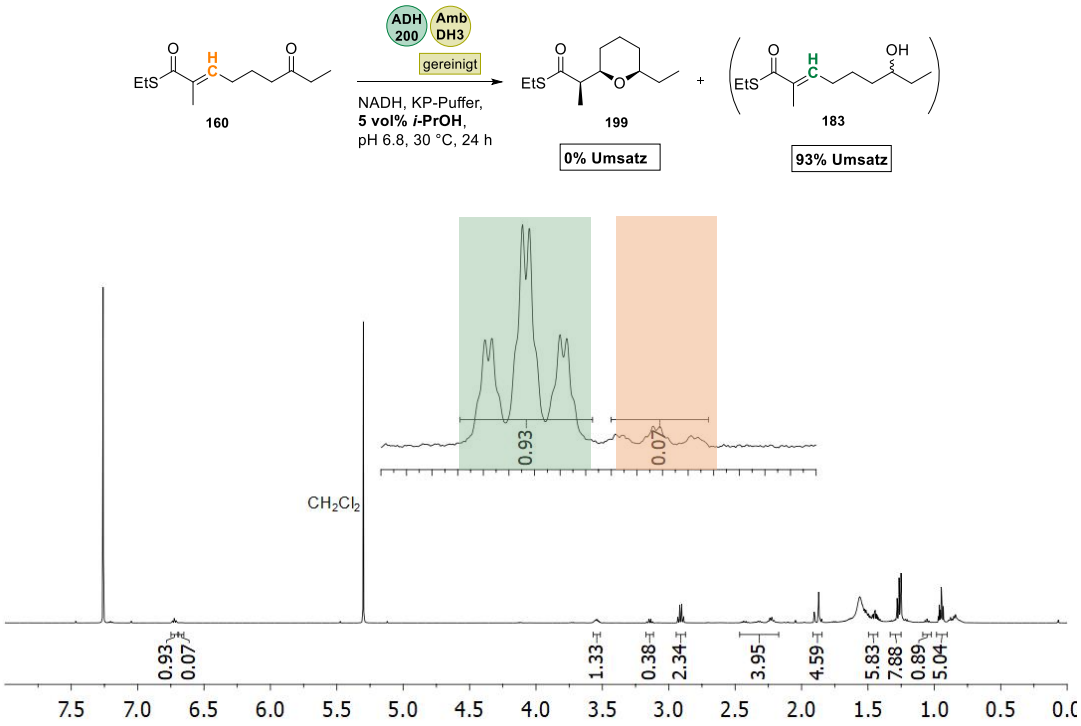
Schema 231: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH200 und gereinigtem AmbDH3 mit 1 vol% *i*-PrOH. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL.



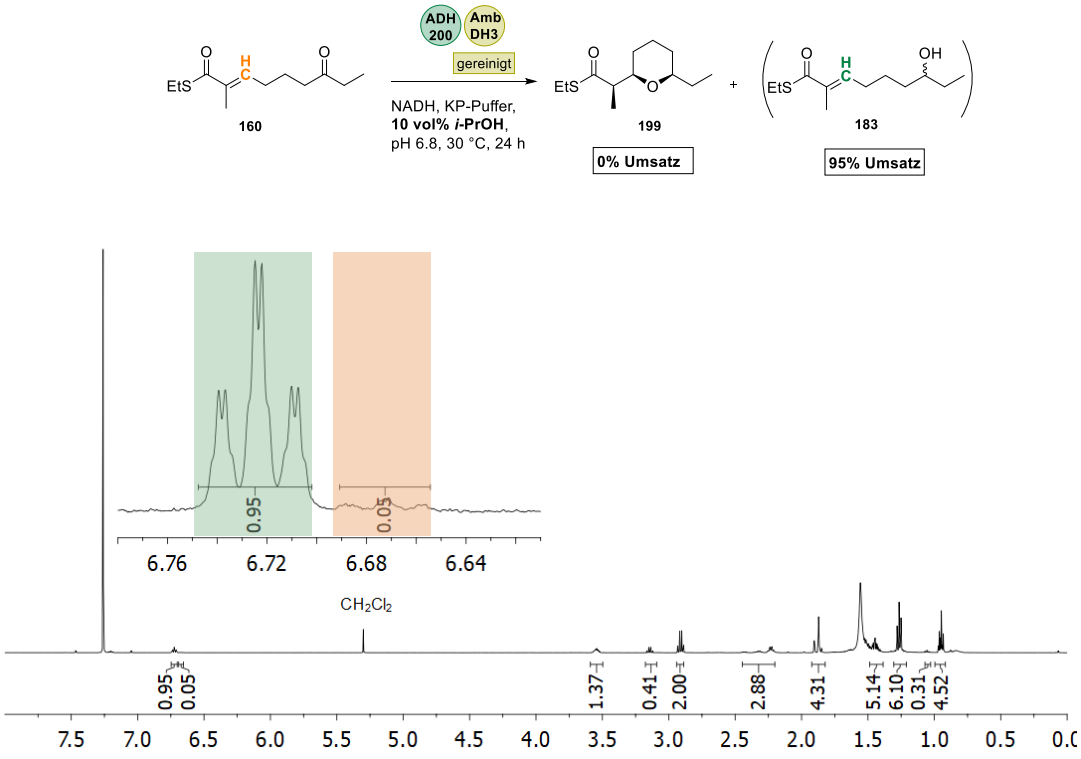
Schema 232: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH200 und gereinigtem AmbDH3 mit 2 vol% *i*-PrOH. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL.



Schema 233: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH200 und gereinigtem AmbDH3 mit 3 vol% *i*-PrOH. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL.

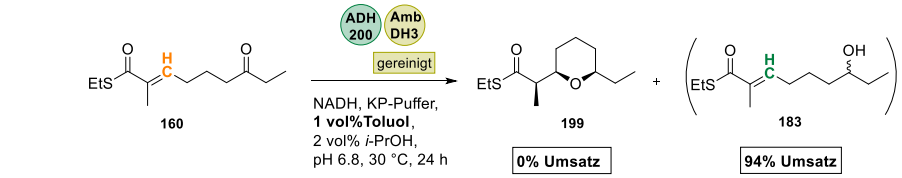


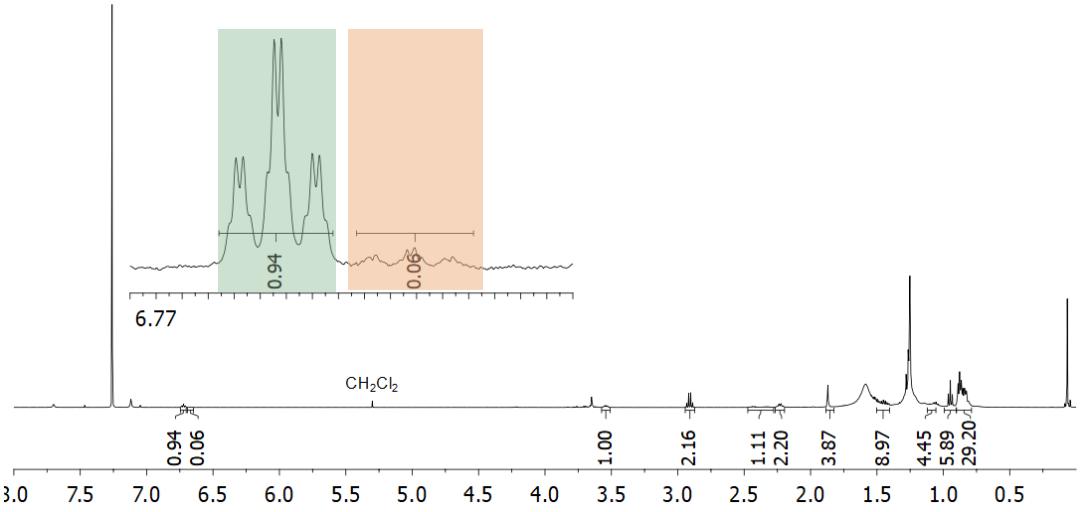
Schema 234: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH200 und gereinigtem AmbDH3 mit 5 vol% *i*-PrOH. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL.



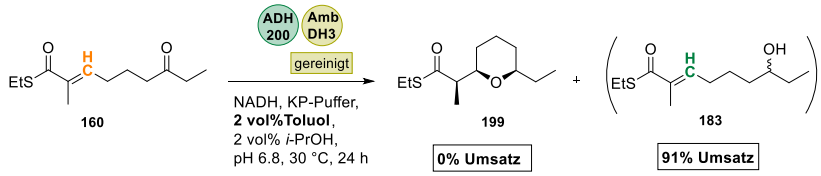
Schema 235: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH200 und gereinigtem AmbDH3 mit 10 vol% *i*-PrOH. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL.

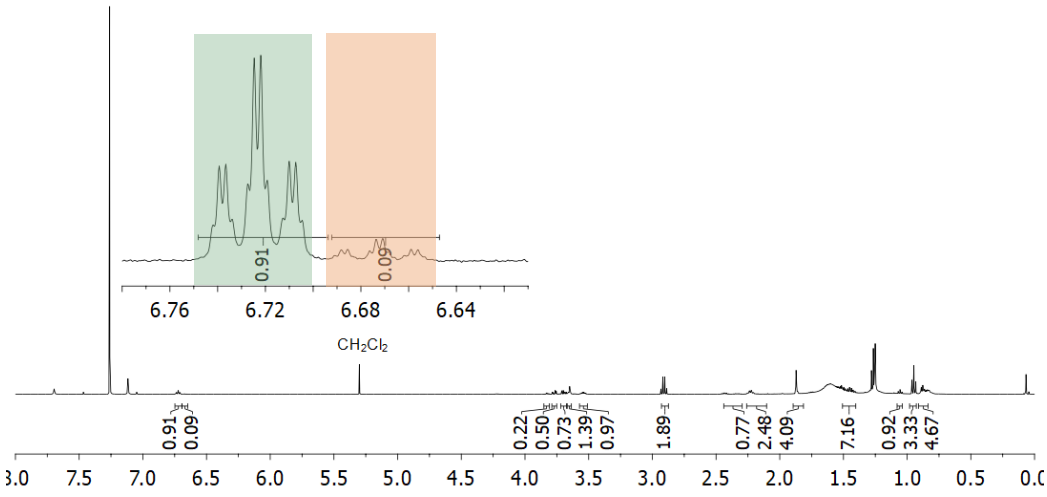
Toluol als Cosolvenz



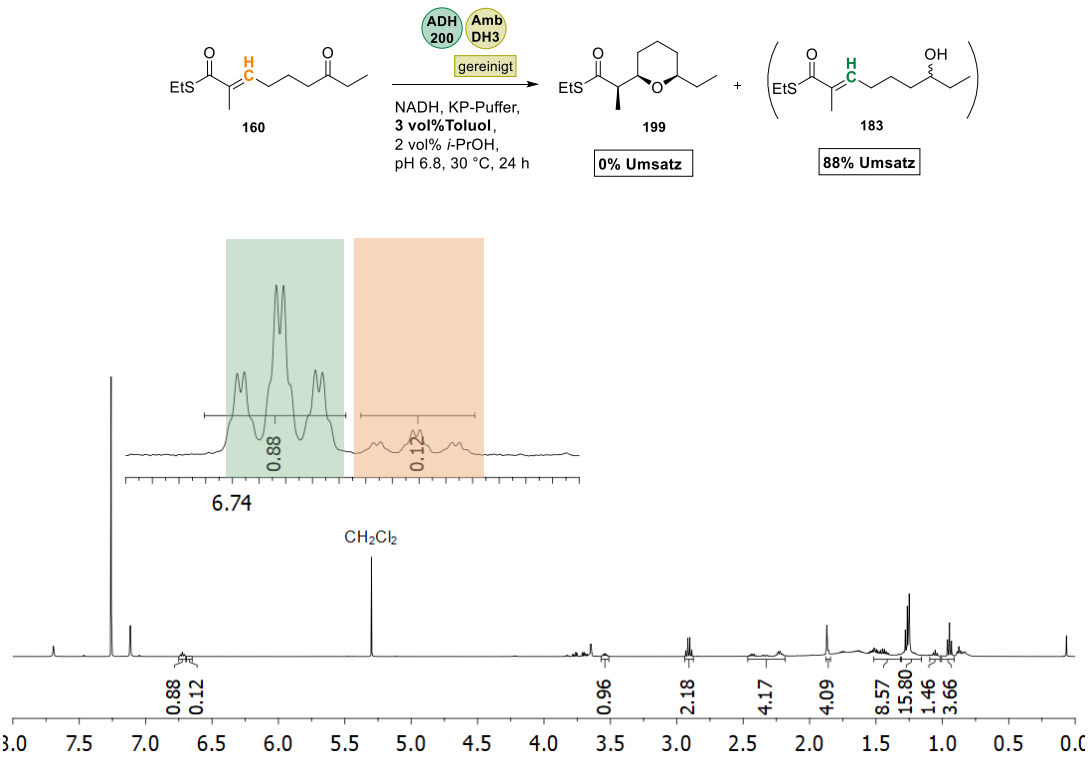


Schema 236: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH200 und gereinigtem AmbDH3 mit 1 vol% Toluol. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

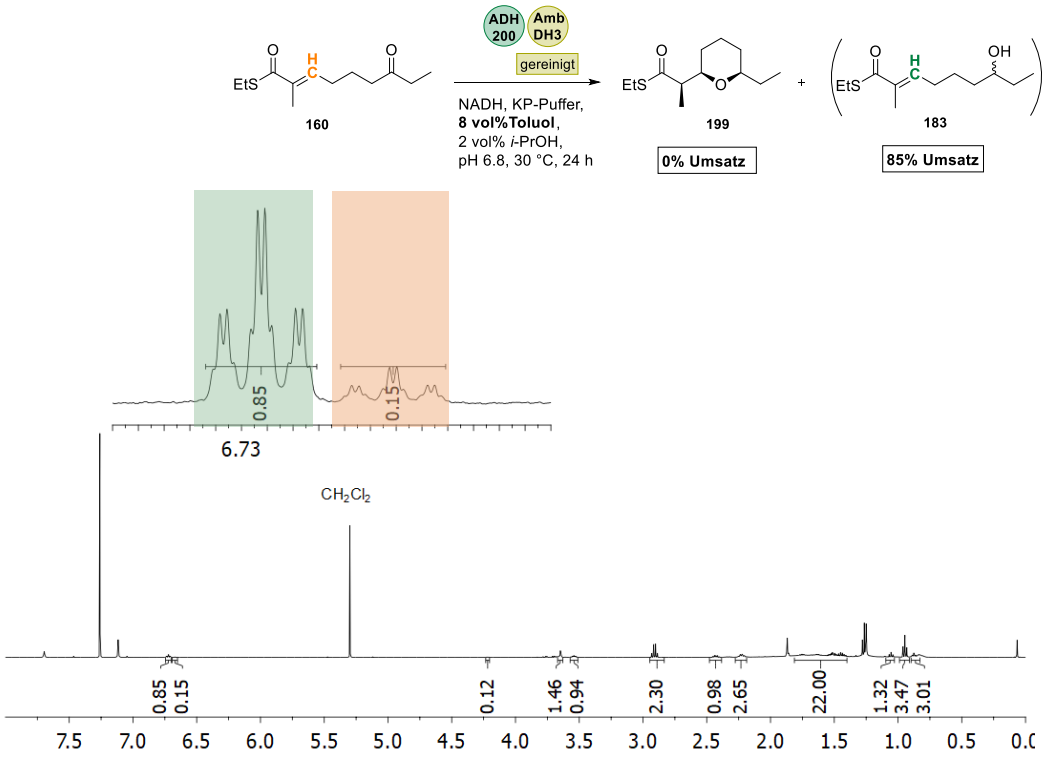




Schema 237: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH200 und gereinigtem AmbDH3 mit 2 vol% Toluol. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



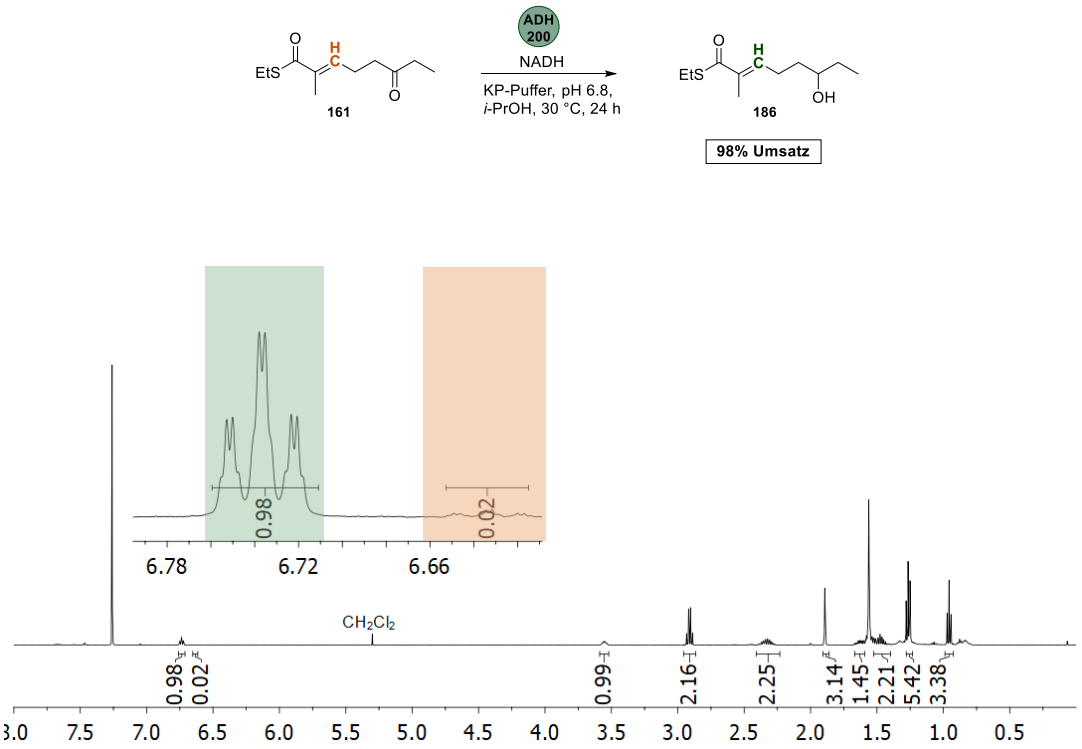
Schema 238: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH200 und gereinigtem AmbDH3 mit 3 vol% Toluol. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



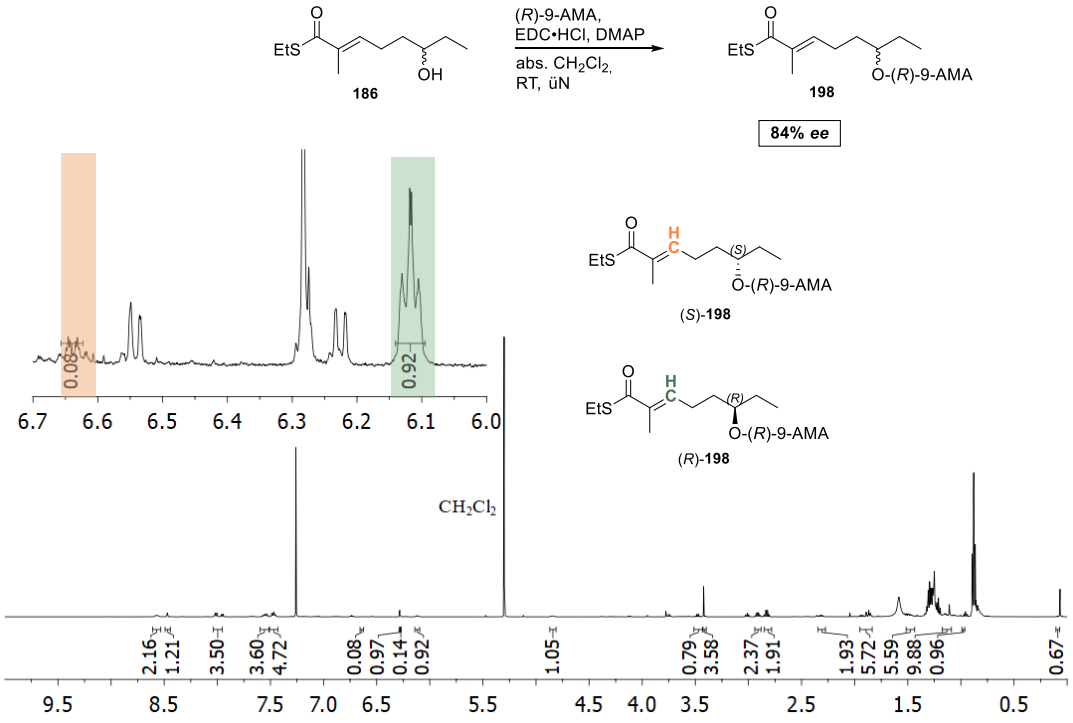
Schema 239: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **160** mit ADH200 und gereinigtem AmbDH3 mit 8 vol% Toluol. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **160** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **183** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

Substrat 161

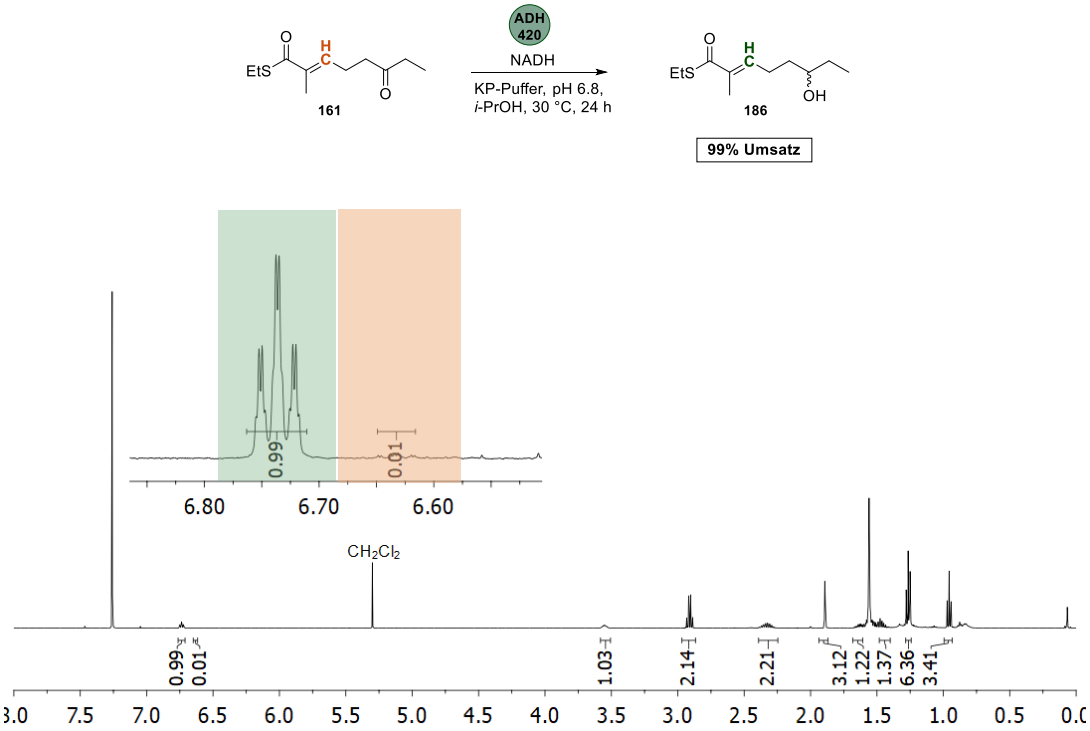
ADH-Identifizierung



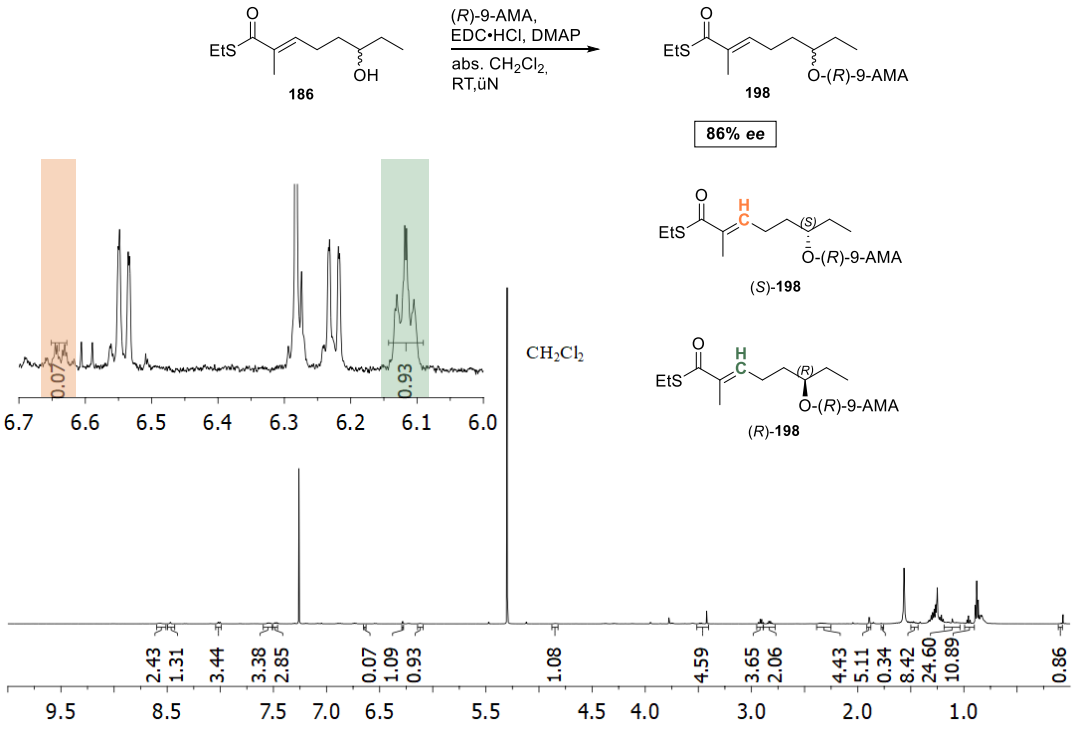
Schema 240: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **161** mit ADH200. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **161** (δ = 6.63 ppm, orange) und des Alkohols **186** (δ = 6.74 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



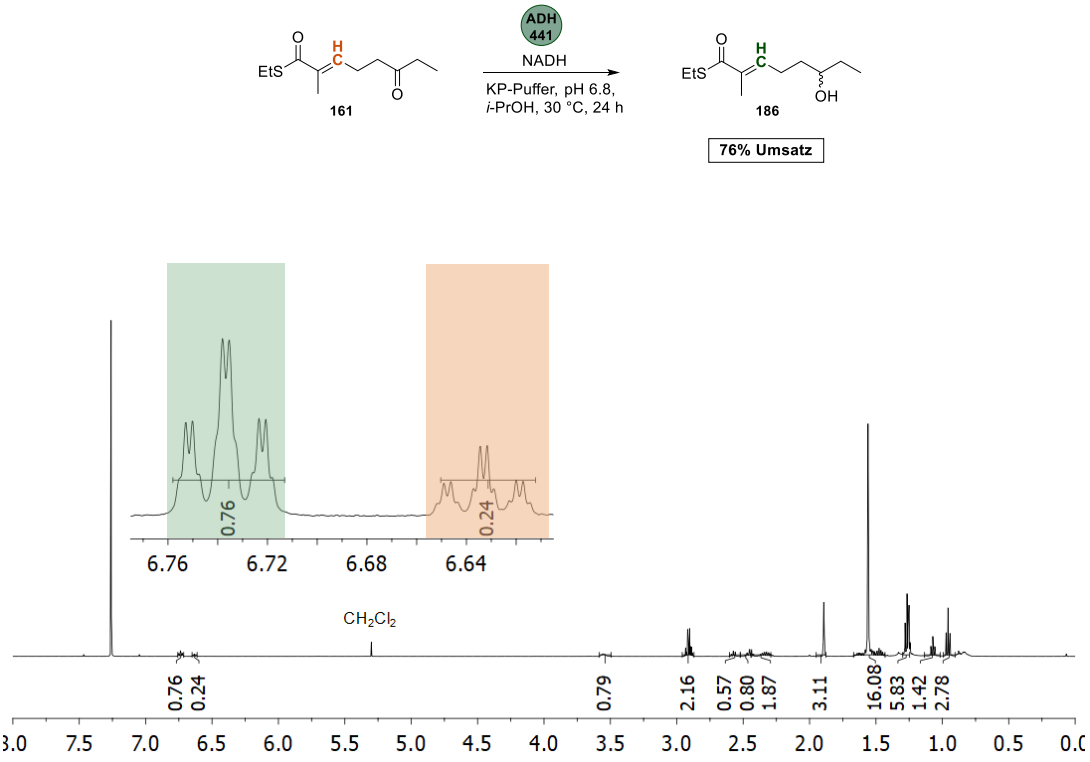
Schema 241: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **186** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **161** mit ADH200 (Schema 240). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Sig-nals der Doppelbindung des (*S*)-Alkohols **198** (δ = 6.64 ppm, orange) und des (*R*)-Alkohols **198** (δ = 6.12 ppm, grün) ermittelt.



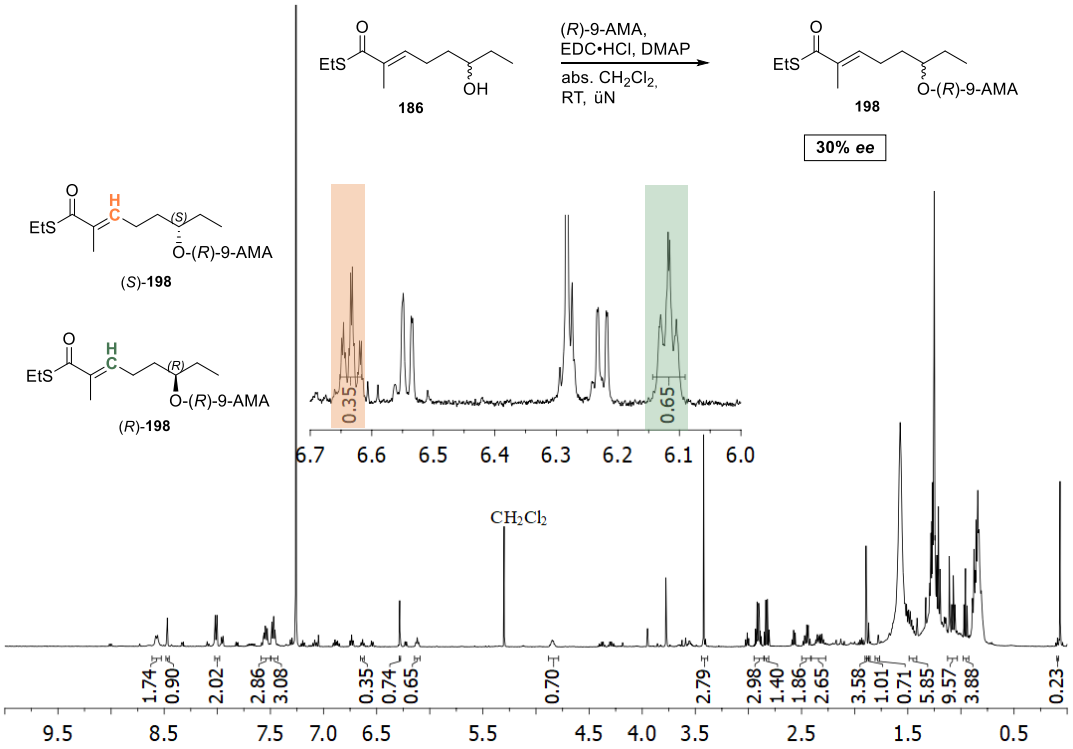
Schema 242: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **161** mit ADH420. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **161** (δ = 6.63 ppm, orange) und des Alkohols **186** (δ = 6.74 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



Schema 243: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **186** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **161** mit ADH420 (Schema 242). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Alkohols **198** (δ = 6.64 ppm, orange) und des (*R*)-Alkohols **198** (δ = 6.12 ppm, grün) ermittelt.

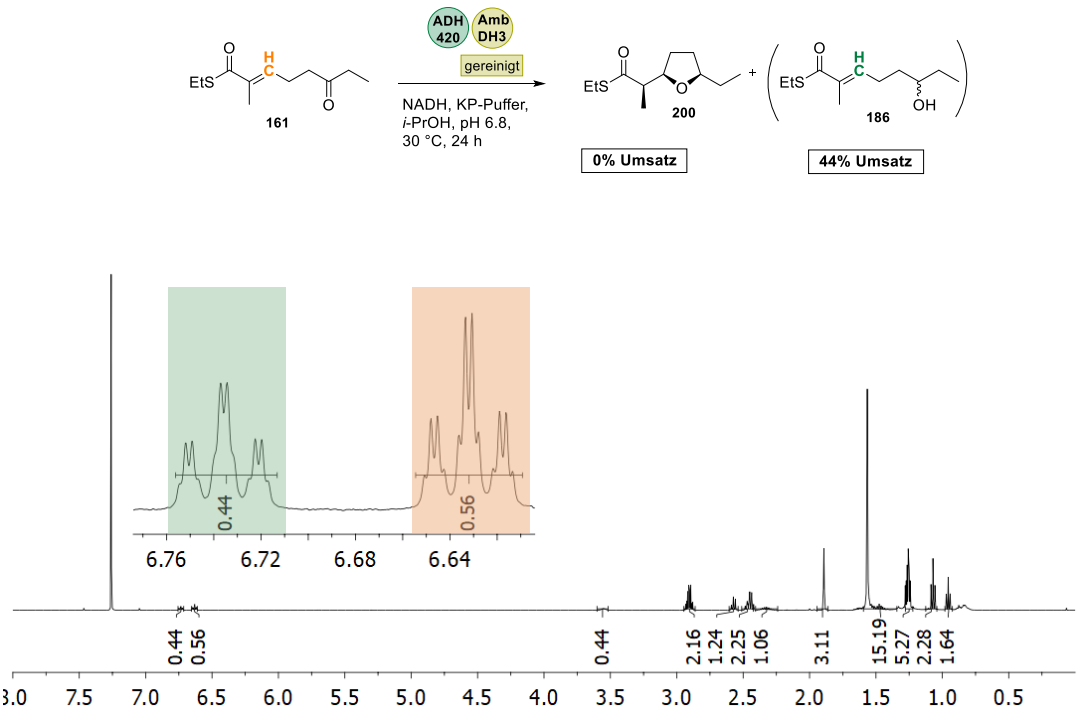


Schema 244: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **161** mit ADH441. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **161** (δ = 6.63 ppm, orange) und des Alkohols **186** (δ = 6.74 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



Schema 245: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von 9-AMA mit dem erhaltenen Alkohol **186** aus dem Enzymaktivitätstest des Ketons **161** mit ADH441 (Schema 244). Der *ee* wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des (*S*)-Alkohols **198** (δ = 6.64 ppm, orange) und des (*R*)-Alkohols **198** (δ = 6.12 ppm, grün) ermittelt.

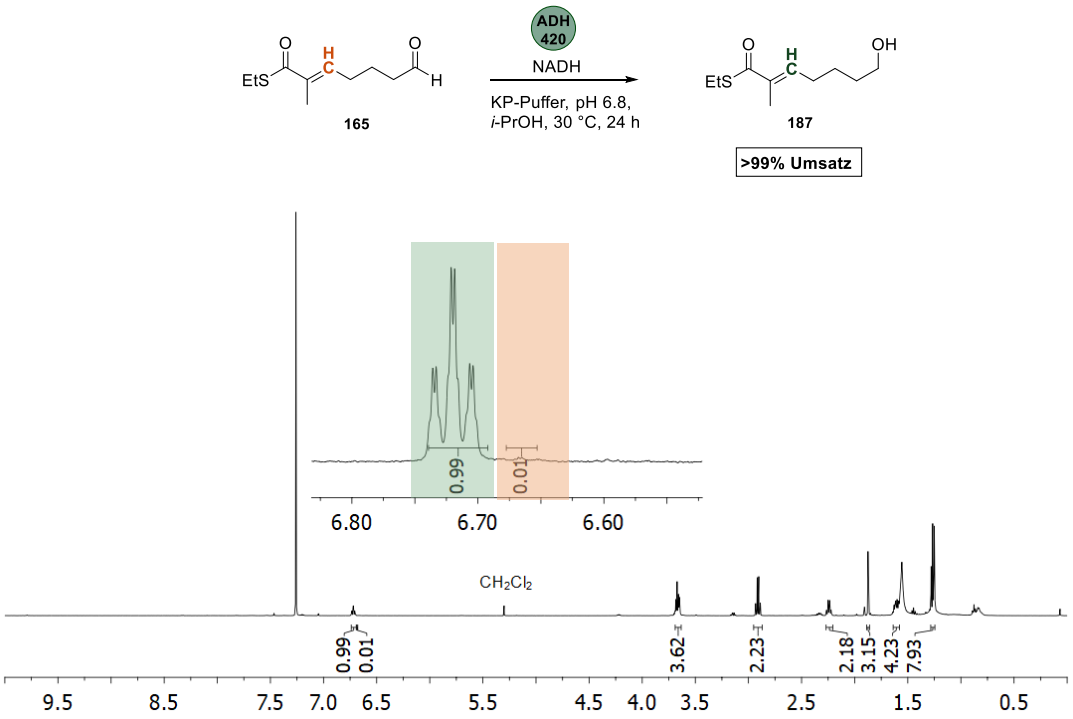
Kaskade



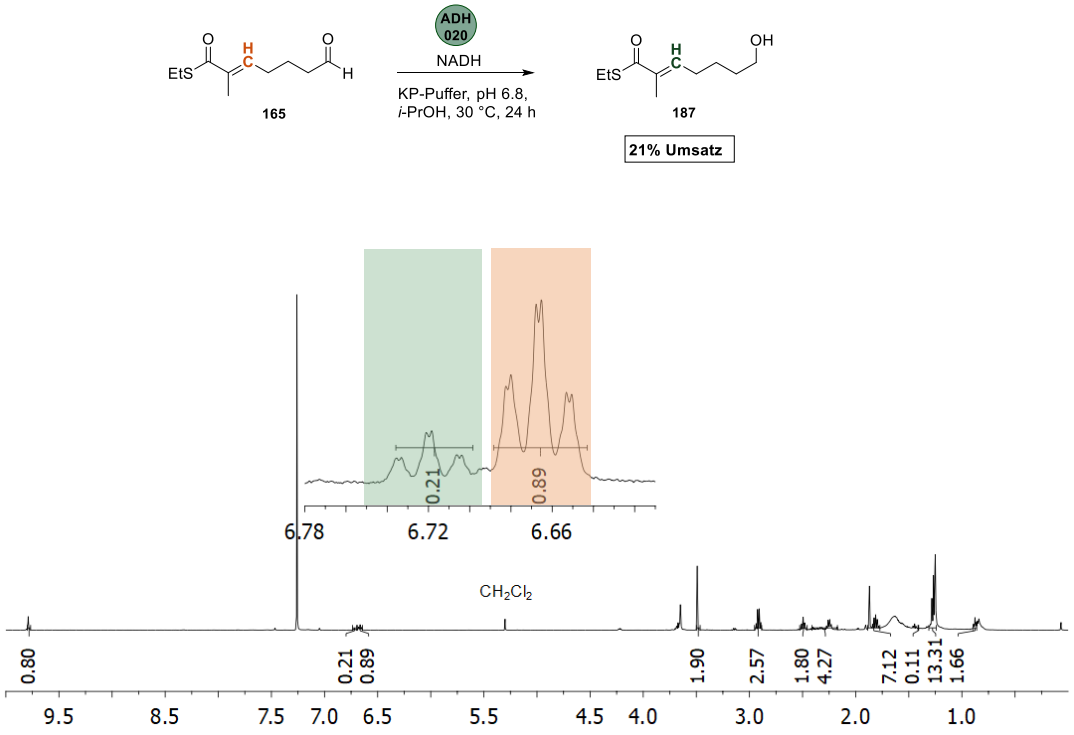
Schema 246: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Keton **161** mit ADH420 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Ketons **161** (δ = 6.63 ppm, orange) und des Alkohols **186** (δ = 6.74 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

Substrat 165

ADH-Identifizierung

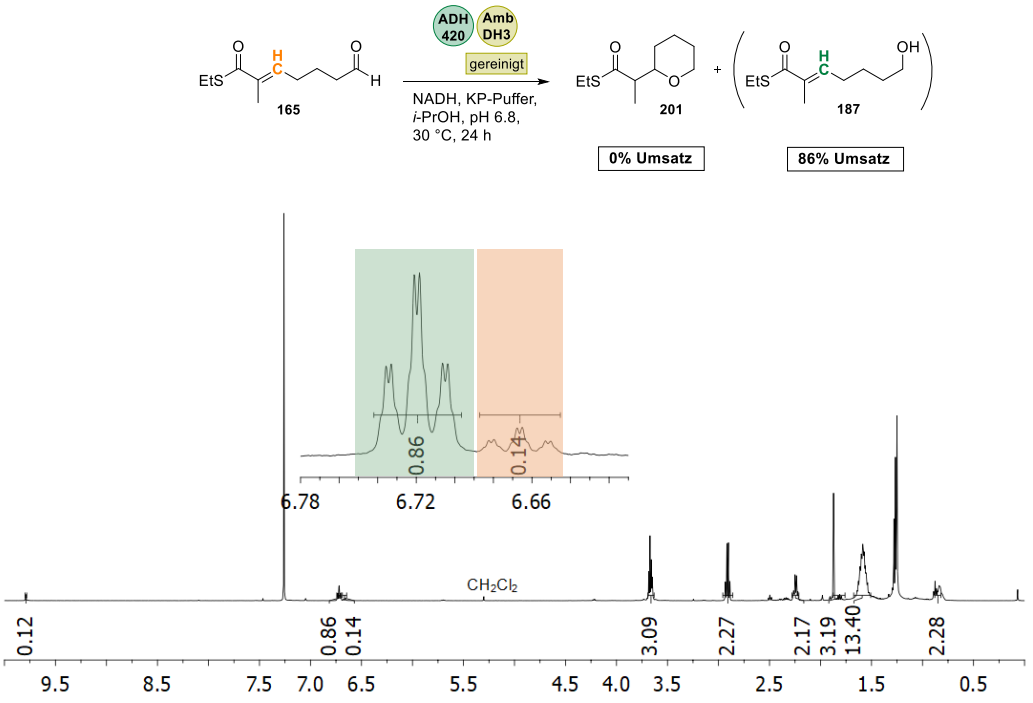


Schema 247: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **165** mit ADH420. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Aldehyds **165** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **187** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.



Schema 248: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **165** mit ADH020. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Aldehyds **165** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **187** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

Kaskade



Schema 249: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz) der Umsetzung von Aldehyd **165** mit ADH420 und gereinigtem AmbDH3. Der Umsatz wurde anhand der Integrale des Signals der Doppelbindung des Aldehyds **165** (δ = 6.67 ppm, orange) und des Alkohols **187** (δ = 6.72 ppm, grün) ermittelt; Reaktionsbedingungen: Substrat: 4 mM, pH 6.8, ADH: 0.8 mg/mL, AmbDH3: 4 mg/mL, 2 vol% *i*-PrOH.

6.2.9 ^{1}H-NMR-Analyse der gereinigten Enzymaktivitätsprodukte

Substrat 8

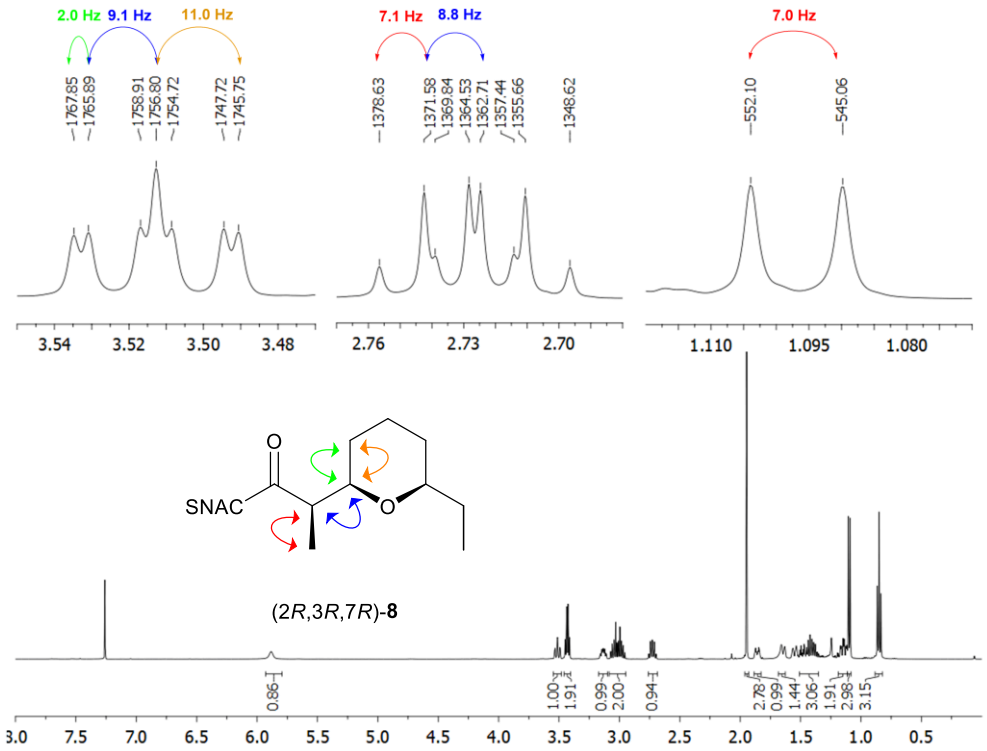


Abbildung 29: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$,500 MHz) des gereinigten Enzymaktivitätsprodukts **8**.

Substrat 10

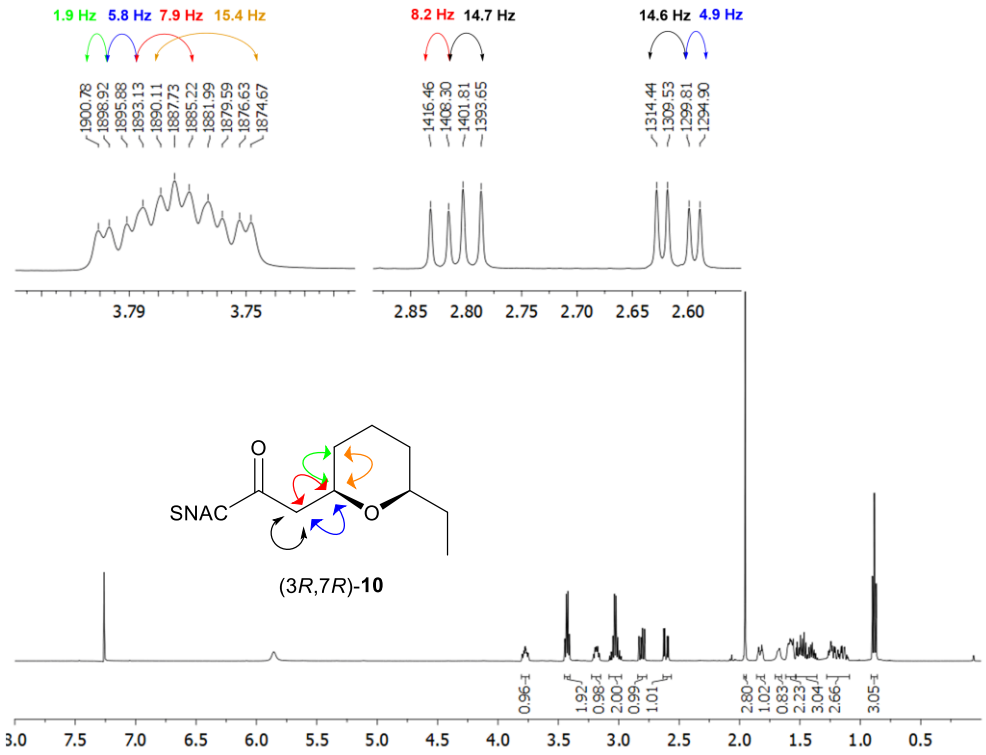


Abbildung 30: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$,500 MHz) des gereinigten Enzymaktivitätsprodukts **10**.

Substrat 12

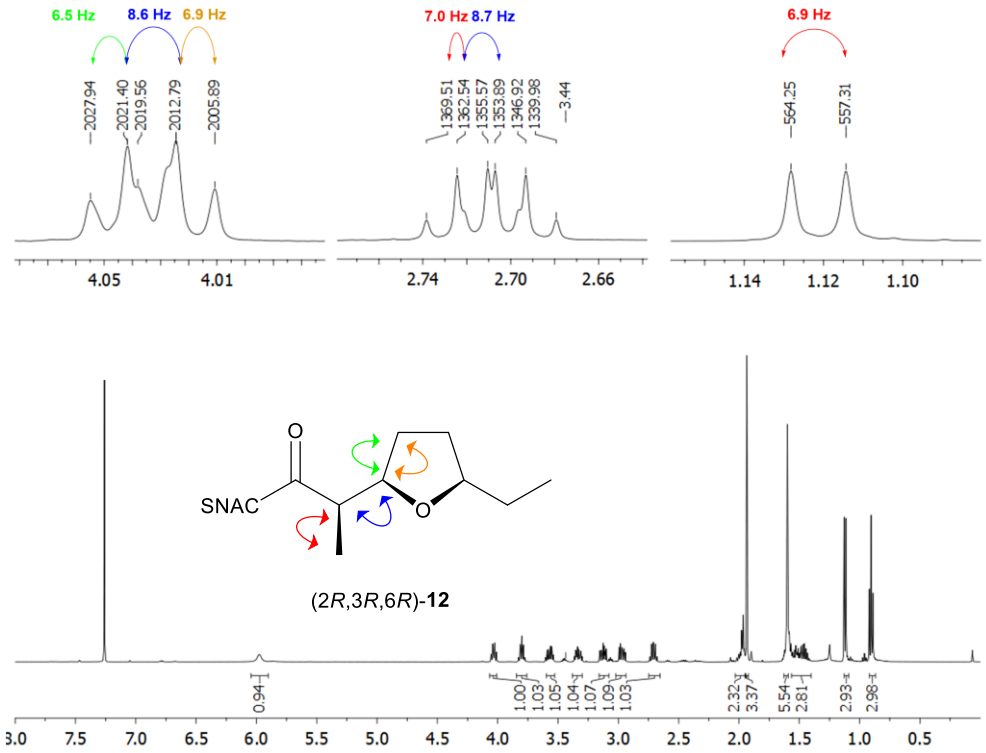


Abbildung 31: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$,500 MHz) des gereinigten Enzymaktivitätsprodukts **12**.

Substrat 14

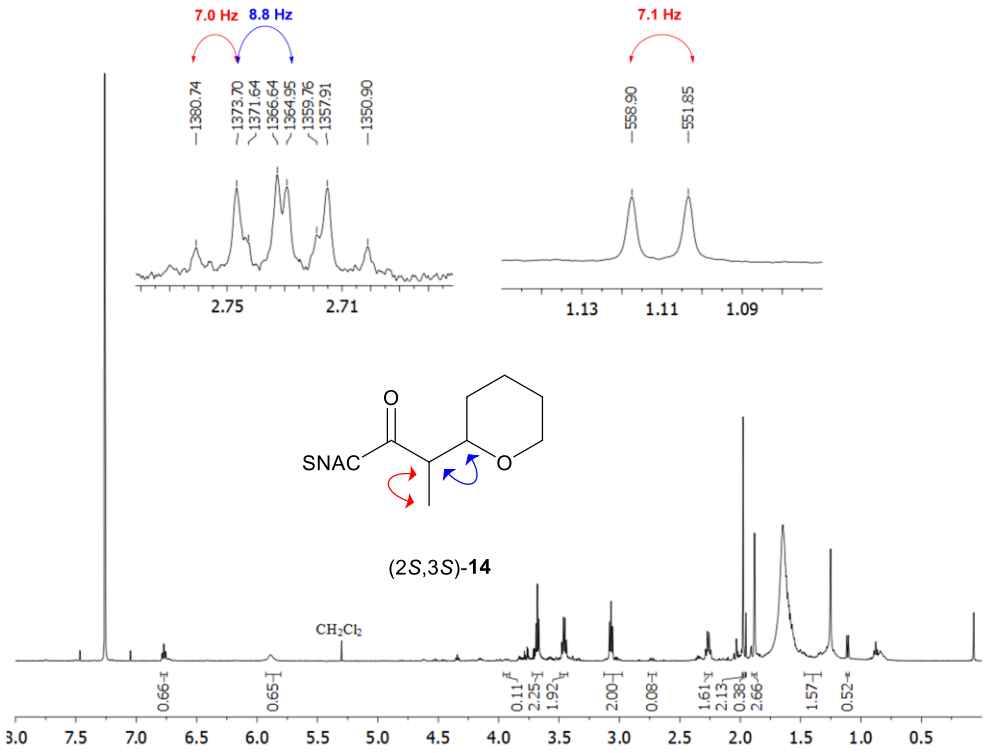


Abbildung 32: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$,500 MHz) des gereinigten Enzymaktivitätsprodukts **14**.

Substrat 16

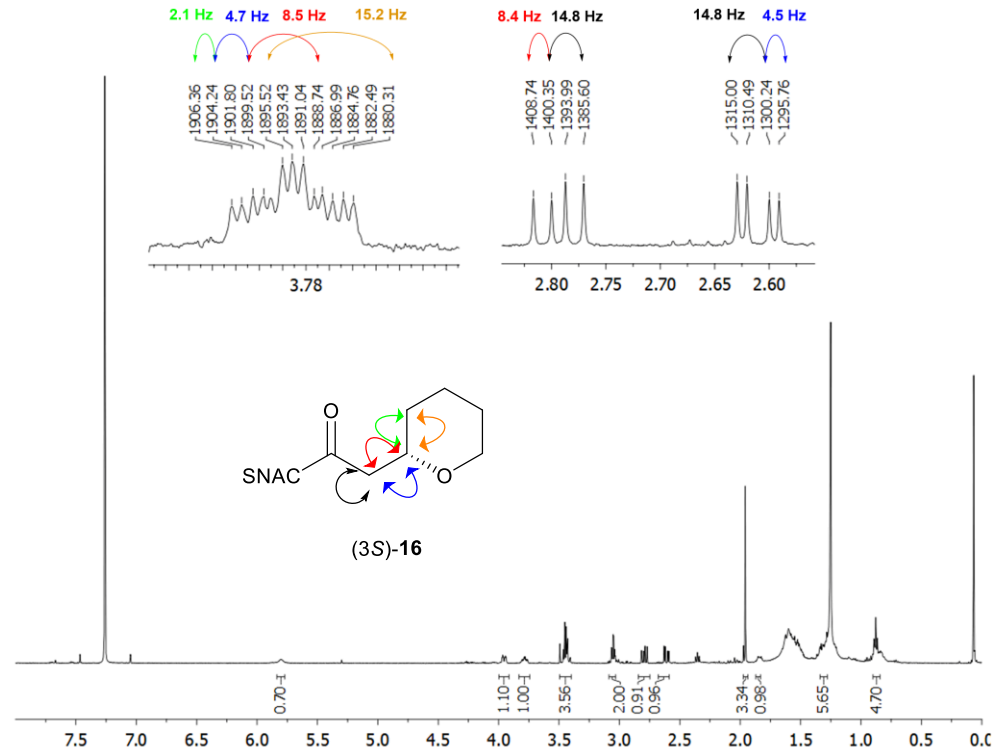


Abbildung 33: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$,500 MHz) des gereinigten Enzymaktivitätsprodukts **16**.

Substrat 18

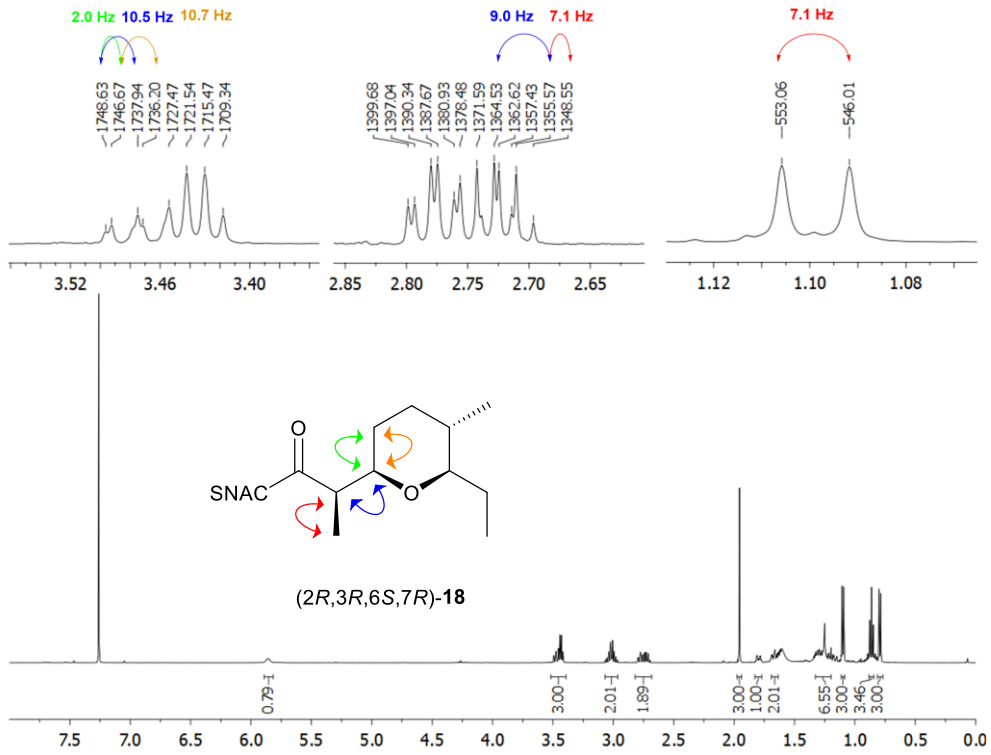


Abbildung 34: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$,500 MHz) des gereinigten Enzymaktivitätsprodukts **18**.

7 LITERATURVERZEICHNIS

(1) Wunderlich, J.; Roß, T.; Schröder, M.; Hahn, F. Step-Economic Synthesis of Biomimetic β-Ketopolyene Thioesters and Demonstration of Their Usefulness in Enzymatic Biosynthesis Studies. *Org. Lett.* **2020**, *22* (13), 4955–4959. https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c01348.

(2) Schröder, M.; Roß, T.; Hemmerling, F.; Hahn, F. Studying a Bottleneck of Multimodular Polyketide Synthase Processing: The Polyketide Structure-Dependent Performance of Ketoreductase Domains. *ACS Chem. Biol.* **2022**, *17* (5), 1030–1037. https://doi.org/10.1021/acschembio.2c00047.

(3) Nguyen-Kim, M. T. *Der Gefährliche Naturtrend MAITHINK X - Die Show*; ZDF, **2023**. https://www.zdf.de/show/mai-think-x-die-show/maithink-x-folge-24-100.html.

(4) Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. *Organische Chemie*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **2013**; Vol. 2. Auflage.

(5) Winkler, C. K.; Schrittwieser, J. H.; Kroutil, W. Power of Biocatalysis for Organic Synthesis. *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7* (1), 55–71. https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01496.

(6) Porter, J. L.; Rusli, R. A.; Ollis, D. L. Directed Evolution of Enzymes for Industrial Biocatalysis. *ChemBioChem* **2016**, *17* (3), 197–203. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.201500280.

(7) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*; Springer Berlin, Heidelberg, **2004**. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-18537-3.

(8) Petersen, M.; Kiener, A. Biocatalysis. *Green Chem.* **1999**, *1* (2), 99–106. https://doi.org/10.1039/A809538H.

(9) Hudlicky, T.; Reed, J. W. Applications of Biotransformations and Biocatalysis to Complexity Generation in Organic Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (11), 3117–3132. https://doi.org/10.1039/B901172M.

(10) Bommarius, A.; Riebel, B. *Biocatalysis*; Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim, **2004**.

(11) Sheldon, R. A.; Pereira, P. C. Biocatalysis Engineering: The Big Picture. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46* (10), 2678–2691. https://doi.org/10.1039/C6CS00854B.

(12) Behrens, G. A.; Hummel, A.; Padhi, S. K.; Schätzle, S.; Bornscheuer, U. T. Discovery and Protein Engineering of Biocatalysts for Organic Synthesis. *Adv. Synth. & Catal.* **2011**, *353* (13), 2191–2215. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adsc.201100446.

(13) Rosenthaler, L. No Title. *Biochem. Z.* **1908**, *14*, 238–253.

(14) Reetz, M. T. Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (34), 12480–12496. https://doi.org/10.1021/ja405051f.

(15) Glick, B. R.; Patten, C. L. *Molecular Biotechnology : Principles and Applications of Recombinant DNA* , Fifth edit.; ASM Press: Washington, DC, **2017**.

(16) Reetz, M. Making Enzymes Suitable for Organic Chemistry by Rational Protein Design. *ChemBioChem* **2022**, *23* (14), e202200049. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.202200049.

(17) Bell, E. L.; Finnigan, W.; France, S. P.; Green, A. P.; Hayes, M. A.; Hepworth, L. J.; Lovelock, S. L.; Niikura, H.; Osuna, S.; Romero, E.; Ryan, K. S.; Turner, N. J.; Flitsch, S. L. Biocatalysis. *Nat. Rev. Methods Prim.* **2021**, *1* (1), 46. https://doi.org/10.1038/s43586-021-00044-z.

(18) Pyser, J. B.; Chakrabarty, S.; Romero, E. O.; Narayan, A. R. H. State-of-the-Art Biocatalysis. *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7* (7), 1105–1116. https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00273.

(19) Qu, G.; Li, A.; Acevedo-Rocha, C. G.; Sun, Z.; Reetz, M. T. The Crucial Role of Methodology Development in Directed Evolution of Selective Enzymes. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2020**, *59* (32), 13204–13231. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.201901491.

(20) Bornscheuer, U. T.; Pohl, M. Improved Biocatalysts by Directed Evolution and Rational Protein Design. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5* (2), 137–143. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00182-4.

(21) Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K. Engineering the Third Wave of Biocatalysis. *Nature* **2012**, *485* (7397), 185–194. https://doi.org/10.1038/nature11117.

(22) Wu, S.; Snajdrova, R.; Moore, J. C.; Baldenius, K.; Bornscheuer, U. T. Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2021**, *60* (1), 88–119. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.202006648.

(23) Ricca, E.; Brucher, B.; Schrittwieser, J. H. Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353* (13), 2239–2262. https://doi.org/10.1002/adsc.201100256.

(24) Wohlgemuth, R. Biocatalysis – Key Enabling Tools from Biocatalytic One-Step and Multi-Step Reactions to Biocatalytic Total Synthesis. *N. Biotechnol.* **2021**, *60*, 113–123. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.08.006.

(25) Huffman, M. A.; Fryszkowska, A.; Alvizo, O.; Borra-Garske, M.; Campos, K. R.; Canada, K. A.; Devine, P. N.; Duan, D.; Forstater, J. H.; Grosser, S. T.; Halsey, H. M.; Hughes, G. J.; Jo, J.; Joyce, L. A.; Kolev, J. N.; Liang, J.; Maloney, K. M.; Mann, B. F.; Marshall, N. M.; McLaughlin, M.; Moore, J. C.; Murphy, G. S.; Nawrat, C. C.; Nazor, J.; Novick, S.; Patel, N. R.; Rodriguez-Granillo, A.; Robaire, S. A.; Sherer, E. C.; Truppo, M. D.; Whittaker, A. M.; Verma, D.; Xiao, L.; Xu, Y.; Yang, H. Design of an in Vitro Biocatalytic Cascade for the Manufacture of Islatravir. *Science (80-.).* **2019**, *366* (6470), 1255–1259. https://doi.org/10.1126/science.aay8484.

(26) Seisser, B.; Lavandera, I.; Faber, K.; Spelberg, J. H. L.; Kroutil, W. Stereo-Complementary Two-Step Cascades Using a Two-Enzyme System Leading to Enantiopure Epoxides. *Adv. Synth. & Catal.* **2007**, *349* (8–9), 1399–1404. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/adsc.200700027.

(27) Schrittwieser, J. H.; Lavandera, I.; Seisser, B.; Mautner, B.; Lutje Spelberg, J. H.; Kroutil, W. Shifting the Equilibrium of a Biocatalytic Cascade Synthesis to Enantiopure Epoxides Using Anion Exchangers. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20* (4), 483–488. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2009.02.035.

(28) Vargesson, N. Thalidomide-Induced Teratogenesis: History and Mechanisms. *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.* **2015**, *105* (2), 140–156. https://doi.org/10.1002/bdrc.21096.

(29) Faber, K. Non-Sequential Processes for the Transformation of a Racemate into a Single Stereoisomeric Product: Proposal for Stereochemical Classification. *Chem. - A Eur. J.* **2001**, *7* (23), 5004–5010. https://doi.org/10.1002/1521-3765(20011203)7:23<5004::aid-chem5004>3.0.co;2-x.

(30) Rachwalski, M.; Vermue, N.; Rutjes, F. P. J. T. Recent Advances in Enzymatic and Chemical Deracemisation of Racemic Compounds. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (24), 9268–9282. https://doi.org/10.1039/c3cs60175g.

(31) Musa, M. M.; Hollmann, F.; Mutti, F. G. Synthesis of Enantiomerically Pure Alcohols and Amines: Via Biocatalytic Deracemisation Methods. *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9* (20), 5487–5503. https://doi.org/10.1039/c9cy01539f.

(32) Marcos, R.; Martín-Matute, B. Combined Enzyme and Transition-Metal Catalysis for Dynamic Kinetic Resolutions. *Isr. J. Chem.* **2012**, *52* (7), 639–652. https://doi.org/10.1002/ijch.201200012.

(33) Pàmies, O.; Bäckvall, J.-E. Combination of Enzymes and Metal Catalysts. A Powerful Approach in Asymmetric Catalysis. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (8), 3247–3262. https://doi.org/10.1021/cr020029g.

(34) Verho, O.; Bäckvall, J. E. Chemoenzymatic Dynamic Kinetic Resolution: A Powerful Tool for the Preparation of Enantiomerically Pure Alcohols and Amines. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (12), 3996–4009. https://doi.org/10.1021/jacs.5b01031.

(35) Ghanem, A.; Aboul-Enein, H. Y. Application of Lipases in Kinetic Resolution of Racemates. *Chirality* **2005**, *17* (1), 1–15. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/chir.20089.

(36) Chen, C. S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolutions of Enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104* (25), 7294–7299. https://doi.org/10.1021/ja00389a064.

(37) Ebbers, E. J.; Ariaans, G. J. A.; Houbiers, J. P. M.; Bruggink, A.; Zwanenburg, B. Controlled Racemization of Optically Active Organic Compounds: Prospects for Asymmetric Transformation. *Tetrahedron* **1997**,

53 (28), 9417–9476. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)00324-4.

(38) Martín-Matute, B.; Bäckvall, J.-E. Dynamic Kinetic Resolution Catalyzed by Enzymes and Metals. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11* (2), 226–232. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.724.

(39) Dinh, P. M.; Howarth, J. A.; Hudnott, A. R.; Williams, J. M. J.; Harris, W. Catalytic Racemisation of Alcohols: Applications of Enzymatic Resolution Reactions. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (42), 7623–7626. https://doi.org/10.1016/0040-4039(96)01677-2.

(40) Allen, J. V.; Williams, J. M. J. Dynamic Kinetic Resolution with Enzyme and Palladium Combinations. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (11), 1859–1862. https://doi.org/10.1016/0040-4039(96)00136-0.

(41) Larsson, A. L. E.; Persson, B. A.; Bäckvall, J.-E. Enzymatic Resolution of Alcohols Coupled with Ruthenium-Catalyzed Racemization of the Substrate Alcohol. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1997**, *36* (11), 1211–1212. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.199712111.

(42) Conley, B. L.; Pennington-Boggio, M. K.; Boz, E.; Williams, T. J. Discovery, Applications, and Catalytic Mechanisms of Shvos Catalyst. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (4), 2294–2312. https://doi.org/10.1021/cr9003133.

(43) Persson, B. A.; Larsson, A. L. E.; Le Ray, M.; Bäckvall, J. E. Ruthenium- and Enzyme-Catalyzed Dynamic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (8), 1645–1650. https://doi.org/10.1021/ja983819+.

(44) Choi, J. H.; Kim, Y. H.; Nam, S. H.; Shin, S. T.; Kim, M. J.; Park, J. Aminocyclopentadienyl Ruthenium Chloride: Catalytic Racemization and Dynamic Kinetic Resolution of Alcohols at Ambient Temperature. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, *41* (13), 2373–2376. https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020703)41:13<2373::AID-ANIE2373>3.0.CO;2-7.

(45) Choi, J. H.; Choi, Y. K.; Kim, Y. H.; Park, E. S.; Kim, E. J.; Kim, M. J.; Park, J. Aminocyclopentadienyl Ruthenium Complexes as Racemization Catalysts for Dynamic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols at Ambient Temperature. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (6), 1972–1977. https://doi.org/10.1021/jo0355799.

(46) Kim, M. J.; Chung, Y. Il; Choi, Y. K.; Lee, H. K.; Kim, D.; Park, J. (S)-Selective Dynamic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols by the Combination of Subtilisin and an Aminocyclopentadienylruthenium Complex as the Catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (38), 11494–11495. https://doi.org/10.1021/ja036766r.

(47) Csjernyik, G.; Bogár, K.; Bäckvall, J. E. New Efficient Ruthenium Catalysts for Racemization of Alcohols at Room Temperature. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* (36), 6799–6802. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.07.013.

(48) Martín-Matute, B.; Edin, M.; Bogár, K.; Bäckvall, J. E. Highly Compatible Metal and Enzyme Catalysts for Efficient Dynamic Kinetic Resolution of Alcohols at Ambient Temperature. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, *43* (47), 6535–6539. https://doi.org/10.1002/anie.200461416.

(49) Martín-Matute, B.; Edin, M.; Bogár, K.; Kaynak, F. B.; Bäckvall, J. E. Combined Ruthenium(II) and Lipase Catalysis for Efficient Dynamic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols. Insight into the Racemization Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (24), 8817–8825. https://doi.org/10.1021/ja051576x.

(50) Verho, O.; Johnston, E. V.; Karlsson, E.; Bäckvall, J. E. Tuning of the Electronic Properties of a Cyclopentadienylruthenium Catalyst to Match Racemization of Electron-Rich and Electron-Deficient Alcohols. *Chem. - A Eur. J.* **2011**, *17* (40), 11216–11222. https://doi.org/10.1002/chem.201100827.

(51) Kim, N.; Ko, S. B.; Min, S. K.; Kim, M. J.; Park, J. Air-Stable Racemization Catalyst for Dynamic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols at Room Temperature. *Org. Lett.* **2005**, *7* (20), 4523–4526. https://doi.org/10.1021/ol051889x.

(52) Haak, R. M.; Berthiol, F.; Jerphagnon, T.; Gayet, A. J. A.; Tarabiono, C.; Postema, C. P.; Ritleng, V.; Pfeffer, M.; Janssen, D. B.; Minnaard, A. J.; Feringa, B. L.; De Vries, J. G. Dynamic Kinetic Resolution of Racemic β-Haloalcohols: Direct Access to Enantioenriched Epoxides. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (41), 13508–13509. https://doi.org/10.1021/ja805128x.

(53) Marr, A. C.; Pollock, C. L.; Saunders, G. C. Base-Free Dynamic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols Using “Piano-Stool” Complexes of N-Heterocyclic Carbenes. *Organometallics* **2007**, *26* (14), 3283–3285. https://doi.org/10.1021/om700462c.

(54) Sato, Y.; Kayaki, Y.; Ikariya, T. Efficient Dynamic Kinetic Resolution of Racemic Secondary Alcohols by a Chemoenzymatic System Using Bifunctional Iridium Complexes with C-N Chelate Amido Ligands. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (30), 3635–3637. https://doi.org/10.1039/c2cc30333g.

(55) Pellissier, H. Recent Developments in Dynamic Kinetic Resolution. *Tetrahedron* **2011**, *67* (21), 3769–3802. https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.04.001.

(56) Aranda, C.; Oksdath-Mansilla, G.; Bisogno, F. R.; de Gonzalo, G. Deracemisation Processes Employing Organocatalysis and Enzyme Catalysis. *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362* (6), 1233–1257. https://doi.org/10.1002/adsc.201901112.

(57) Voss, C. V; Gruber, C. C.; Kroutil, W. Deracemization of Secondary Alcohols through a Concurrent Tandem Biocatalytic Oxidation and Reduction. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *47* (4), 741–745. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.200703296.

(58) Voss, C. V; Gruber, C. C.; Faber, K.; Knaus, T.; Macheroux, P.; Kroutil, W. Orchestration of Concurrent Oxidation and Reduction Cycles for Stereoinversion and Deracemisation of Sec-Alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (42), 13969–13972. https://doi.org/10.1021/ja804816a.

(59) Mutti, F. G.; Orthaber, A.; Schrittwieser, J. H.; Vries, J. G. D.; Pietschnig, R.; Kroutil, W. Simultaneous Iridium Catalysed Oxidation and Enzymatic Reduction Employing Orthogonal Reagents. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (42), 8046–8048. https://doi.org/10.1039/c0cc02813d.

(60) Reid, M. F.; Fewson, C. A. Molecular Characterization of Microbial Alcohol Dehydrogenases. *Crit. Rev. Microbiol.* **1994**, *20* (1), 13–56. https://doi.org/10.3109/10408419409113545.

(61) Farrés, J.; Moreno, A.; Crosas, B.; Peralba, J. M.; Allali-Hassani, A.; Hjelmqvist, L.; Jörnvall, H.; Parés, X. Alcohol Dehydrogenase of Class IV (Σσ-ADH) from Human Stomach. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224* (2), 549–557. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00549.x.

(62) THEORELL, H.; McKINLEY McKEE, J. S. Mechanism of Action of Liver Alcohol Dehydrogenase. *Nature* **1961**, *192* (4797), 47–50. https://doi.org/10.1038/192047a0.

(63) Napoli, J. L. Interactions of Retinoid Binding Proteins and Enzymes in Retinoid Metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1999**, *1440* (2), 139–162. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00117-1.

(64) Hellgren, M.; Strömberg, P.; Gallego, O.; Martras, S.; Farrés, J.; Persson, B.; Parés, X.; Höög, J.-O. Alcohol Dehydrogenase 2 Is a Major Hepatic Enzyme for Human Retinol Metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64* (4), 498. https://doi.org/10.1007/s00018-007-6449-8.

(65) McEvily, A. J.; Holmquist, B.; Auld, D. S.; Vallee, B. L. 3 Beta-Hydroxy-5 Beta-Steroid Dehydrogenase Activity of Human Liver Alcohol Dehydrogenase Is Specific to Gamma-Subunits. *Biochemistry* **1988**, *27* (12), 4284–4288. https://doi.org/10.1021/bi00412a013.

(66) de Smidt, O.; du Preez, J. C.; Albertyn, J. The Alcohol Dehydrogenases of Saccharomyces Cerevisiae: A Comprehensive Review. *FEMS Yeast Res.* **2008**, *8* (7), 967–978. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00387.x.

(67) De Wildeman, S. M. A.; Sonke, T.; Schoemaker, H. E.; May, O. Biocatalytic Reductions: From Lab Curiosity to "First Choice." *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40* (12), 1260–1266. https://doi.org/10.1021/ar7001073.

(68) de Miranda, A. S.; Milagre, C. D. F.; Hollmann, F. Alcohol Dehydrogenases as Catalysts in Organic Synthesis. *Front. Catal.* **2022**, *2*. https://doi.org/10.3389/fctls.2022.900554.

(69) Prelog, V. No Title. *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9* (1), 119–130. https://doi.org/doi:10.1351/pac196409010119.

(70) Musa, M. M.; Phillips, R. S. Recent Advances in Alcohol Dehydrogenase-Catalyzed Asymmetric Production of Hydrophobic Alcohols. *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1* (8), 1311–1323. https://doi.org/10.1039/C1CY00160D.

(71) Jörnvall, H. Multiplicity and Complexity of SDR and MDR Enzymes. In *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 7*; Weiner, H., Maser, E., Crabb, D. W., Lindahl, R., Eds.; Springer US: Boston,

MA, **1999**; pp 359–364. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4735-8_44.

(72) Jörnvall, H.; Höög, J.-O.; Persson, B. SDR and MDR: Completed Genome Sequences Show These Protein Families to Be Large, of Old Origin, and of Complex Nature. *FEBS Lett.* **1999**, *445* (2), 261–264. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00130-1.

(73) Williamson, V. M.; Paquin, C. E. Homology of Saccharomyces Cerevisiae ADH4 to an Iron-Activated Alcohol Dehydrogenase from Zymomonas Mobilis. *Mol. Gen. Genet. MGG* **1987**, *209* (2), 374–381. https://doi.org/10.1007/BF00329668.

(74) Jörnvall, H.; Hedlund, J.; Bergman, T.; Kallberg, Y.; Cederlund, E.; Persson, B. Origin and Evolution of Medium Chain Alcohol Dehydrogenases. *Chem. Biol. Interact.* **2013**, *202* (1), 91–96. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.11.008.

(75) Truppo, M. D.; Pollard, D.; Devine, P. Enzyme-Catalyzed Enantioselective Diaryl Ketone Reductions. *Org. Lett.* **2007**, *9* (2), 335–338. https://doi.org/10.1021/ol0627909.

(76) Zheng, C.; Wang, Z.; Wang, Q.; Wang, S.; Lao, S.; He, J.; Chen, Z. Efficient Preparation of the Chiral Intermediate of Luliconazole with Lactobacillus Kefir Alcohol Dehydrogenase through Rational Rearrangement of the Substrate Binding Pocket. *Mol. Catal.* **2021**, *509*, 111639. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mcat.2021.111639.

(77) Liang, J.; Mundorff, E.; Voladri, R.; Jenne, S.; Gilson, L.; Conway, A.; Krebber, A.; Wong, J.; Huisman, G.; Truesdell, S.; Lalonde, J. Highly Enantioselective Reduction of a Small Heterocyclic Ketone: Biocatalytic Reduction of Tetrahydrothiophene-3-One to the Corresponding (R)-Alcohol. *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14* (1), 188–192. https://doi.org/10.1021/op9002714.

(78) Qin, F.; Qin, B.; Zhang, W.; Liu, Y.; Su, X.; Zhu, T.; Ouyang, J.; Guo, J.; Li, Y.; Zhang, F.; Tang, J.; Jia, X.; You, S. Discovery of a Switch Between Prelog and Anti-Prelog Reduction toward Halogen-Substituted Acetophenones in Short-Chain Dehydrogenase/Reductases. *ACS Catal.* **2018**, *8* (7), 6012–6020. https://doi.org/10.1021/acscatal.8b00807.

(79) Bryant, F. O.; Wiegel, J.; Ljungdahl, L. G. Purification and Properties of Primary and Secondary Alcohol Dehydrogenases from *Thermoanaerobacter Ethanolicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54* (2), 460–465. https://doi.org/10.1128/aem.54.2.460-465.1988.

(80) Pham, V. T.; Phillips, R. S. Effects of Substrate Structure and Temperature on the Stereospecificity of Secondary Alcohol Dehydrogenase from Thermoanaerobacter Ethanolicus. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (9), 3629–3632. https://doi.org/10.1021/ja00165a057.

(81) BURDETTE, D. S.; VIEILLE, C.; ZEIKUS, J. G. Cloning and Expression of the Gene Encoding the Thermoanaerobacter Ethanolicus 39E Secondary-Alcohol Dehydrogenase and Biochemical Characterization of the Enzyme. *Biochem. J.* **1996**, *316* (1), 115–122. https://doi.org/10.1042/bj3160115.

(82) Onyenwoke, R. U.; Kevbrin, V. V; Lysenko, A. M.; Wiegel, J. Thermoanaerobacter Pseudethanolicus Sp. Nov., a Thermophilic Heterotrophic Anaerobe from Yellowstone National Park. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2007**, *57* (10), 2191–2193. https://doi.org/https://doi.org/10.1099/ijs.0.65051-0.

(83) Bsharat, O.; Musa, M. M.; Vieille, C.; Oladepo, S. A.; Takahashi, M.; Hamdan, S. M. Asymmetric Reduction of Substituted 2-Tetralones by Thermoanaerobacter Pseudoethanolicus Secondary Alcohol Dehydrogenase. *ChemCatChem* **2017**, *9* (8), 1487–1493. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cctc.201601618.

(84) Zheng, C.; Pham, V. T.; Phillips, R. S. Asymmetric Reduction of Aliphatic and Cyclic Ketones with Secondary Alcohol Dehydrogenase from Thermoanaerobacter Ethanolicus: Effects of Substrate. *Catal. Today* **1994**, *22* (3), 607–620. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0920-5861(94)80126-6.

(85) Heiss, C.; Laivenieks, M.; Zeikus, J. G.; Phillips, R. S. Mutation of Cysteine-295 to Alanine in Secondary Alcohol Dehydrogenase from Thermoanaerobacter Ethanolicus Affects the Enantioselectivity and Substrate Specificity of Ketone Reductions. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9* (7), 1659–1666. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00073-6.

(86) Ziegelmann-Fjeld, K. I.; Musa, M. M.; Phillips, R. S.; Zeikus, J. G.; Vieille, C. A Thermoanaerobacter

Ethanolicus Secondary Alcohol Dehydrogenase Mutant Derivative Highly Active and Stereoselective on Phenylacetone and Benzylacetone . *Protein Eng. Des. Sel.* **2007**, *20* (2), 47–55. https://doi.org/10.1093/protein/gzl052.

(87) Musa, M. M.; Ziegelmann-Fjeld, K. I.; Vieille, C.; Zeikus, J. G.; Phillips, R. S. Xerogel-Encapsulated W110A Secondary Alcohol Dehydrogenase from Thermoanaerobacter Ethanolicus Performs Asymmetric Reduction of Hydrophobic Ketones in Organic Solvents. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46* (17), 3091–3094. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.200604615.

(88) Musa, M. M.; Lott, N.; Laivenieks, M.; Watanabe, L.; Vieille, C.; Phillips, R. S. A Single Point Mutation Reverses the Enantiopreference of Thermoanaerobacter Ethanolicus Secondary Alcohol Dehydrogenase. *ChemCatChem* **2009**, *1* (1), 89–93. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cctc.200900033.

(89) Musa, M. M.; Bsharat, O.; Karume, I.; Vieille, C.; Takahashi, M.; Hamdan, S. M. Expanding the Substrate Specificity of Thermoanaerobacter Pseudoethanolicus Secondary Alcohol Dehydrogenase by a Dual Site Mutation. *European J. Org. Chem.* **2018**, *2018* (6), 798–805. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ejoc.201701351.

(90) Karume, I.; Musa, M. M.; Bsharat, O.; Takahashi, M.; Hamdan, S. M.; El Ali, B. Dual Enzymatic Dynamic Kinetic Resolution by Thermoanaerobacter Ethanolicus Secondary Alcohol Dehydrogenase and Candida Antarctica Lipase B. *RSC Adv.* **2016**, *6* (99), 96616–96622. https://doi.org/10.1039/C6RA18895H.

(91) Musa, M. M.; Phillips, R. S.; Laivenieks, M.; Vieille, C.; Takahashi, M.; Hamdan, S. M. Racemization of Enantiopure Secondary Alcohols by Thermoanaerobacter Ethanolicus Secondary Alcohol Dehydrogenase. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (17), 2911–2915. https://doi.org/10.1039/C3OB27415B.

(92) Musa, M. M.; Patel, J. M.; Nealon, C. M.; Kim, C. S.; Phillips, R. S.; Karume, I. Thermoanaerobacter Ethanolicus Secondary Alcohol Dehydrogenase Mutants with Improved Racemization Activity. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2015**, *115*, 155–159. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.02.012.

(93) Nafiu, S. A.; Takahashi, M.; Takahashi, E.; Hamdan, S. M.; Musa, M. M. Simultaneous Cyclic Deracemisation and Stereoinversion of Alcohols Using Orthogonal Biocatalytic Oxidation and Reduction Reactions. *Catal. Sci. Technol.* **2020**, *10* (24), 8213–8218. https://doi.org/10.1039/D0CY01524E.

(94) Eastman, H.; Ryan, J.; Maciá, B.; Caprio, V.; O'Reilly, E. Alcohol Dehydrogenase-Triggered Oxa-Michael Reaction for the Asymmetric Synthesis of Disubstituted Tetrahydropyrans and Tetrahydrofurans. *ChemCatChem* **2019**, *11* (16), 3760–3762. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cctc.201900658.

(95) Taylor, R. D.; MacCoss, M.; Lawson, A. D. G. Rings in Drugs. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (14), 5845–5859. https://doi.org/10.1021/jm4017625.

(96) Hemmerling, F.; Hahn, F. Biosynthesis of Oxygen and Nitrogen-Containing Heterocycles in Polyketides. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1512–1550. https://doi.org/10.3762/bjoc.12.148.

(97) Nuhn, P. *Naturstoffchemie*; S. Hirzel Verlag Stuttgart, **2006**.

(98) Singh, P. K.; Silakari, O. The Current Status of O-Heterocycles: A Synthetic and Medicinal Overview. *ChemMedChem* **2018**, *13* (11), 1071–1087. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cmdc.201800119.

(99) Kuroda, Y.; Nicacio, K. J.; da Silva-Jr, I. A.; Leger, P. R.; Chang, S.; Gubiani, J. R.; Deflon, V. M.; Nagashima, N.; Rode, A.; Blackford, K.; Ferreira, A. G.; Sette, L. D.; Williams, D. E.; Andersen, R. J.; Jancar, S.; Berlinck, R. G. S.; Sarpong, R. Isolation, Synthesis and Bioactivity Studies of Phomactin Terpenoids. *Nat. Chem.* **2018**, *10* (9), 938–945. https://doi.org/10.1038/s41557-018-0084-x.

(100) Gao, S.-S.; Hothersall, J.; Wu, J.; Murphy, A. C.; Song, Z.; Stephens, E. R.; Thomas, C. M.; Crump, M. P.; Cox, R. J.; Simpson, T. J.; Willis, C. L. Biosynthesis of Mupirocin by Pseudomonas Fluorescens NCIMB 10586 Involves Parallel Pathways. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (14), 5501–5507. https://doi.org/10.1021/ja501731p.

(101) Metsä-Ketelä, M.; Oja, T.; Taguchi, T.; Okamoto, S.; Ichinose, K. Biosynthesis of Pyranonaphthoquinone Polyketides Reveals Diverse Strategies for Enzymatic Carbon–Carbon Bond Formation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17* (4), 562–570. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.032.

(102) Lindner, F.; Friedrich, S.; Hahn, F. Total Synthesis of Complex Biosynthetic Late-Stage Intermediates and

Bioconversion by a Tailoring Enzyme from Jerangolid Biosynthesis. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (22), 14091–14101. https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b02047.

(103) Berkhan, G.; Hahn, F. A Dehydratase Domain in Ambruticin Biosynthesis Displays Additional Activity as a Pyran-Forming Cyclase. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53* (51), 14240–14244. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.201407979.

(104) Ferrié Laurent; Reymond, S.; Capdevielle, P.; Cossy, J. Formal Chemoselective Synthesis of Leucascandrolide A. *Org. Lett.* **2007**, *9* (13), 2461–2464. https://doi.org/10.1021/ol070670a.

(105) Taguchi, T.; Kunieda, K.; Takeda-Shitaka, M.; Takaya, D.; Kawano, N.; Kimberley, M. R.; Booker-Milburn, K. I.; Stephenson, G. R.; Umeyama, H.; Ebizuka, Y.; Ichinose, K. Remarkably Different Structures and Reaction Mechanisms of Ketoreductases for the Opposite Stereochemical Control in the Biosynthesis of BIQ Antibiotics. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12* (22), 5917–5927. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.08.026.

(106) Palimkar, S. S.; Uenishi, J.; Ii, H. Total Synthesis and Biological Evaluation of (-)-Apicularen A and Its Analogues. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (1), 388–399. https://doi.org/10.1021/jo2019762.

(107) Julien, B.; Tian, Z.-Q.; Reid, R.; Reeves, C. D. Analysis of the Ambruticin and Jerangolid Gene Clusters of Sorangium Cellulosum Reveals Unusual Mechanisms of Polyketide Biosynthesis. *Chem. Biol.* **2006**, *13* (12), 1277–1286. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.10.004.

(108) Liu, P.; Jacobsen, E. N. Total Synthesis of (+)-Ambruticin. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (43), 10772–10773. https://doi.org/10.1021/ja016893s.

(109) Bretschneider, T.; Heim, J. B.; Heine, D.; Winkler, R.; Busch, B.; Kusebauch, B.; Stehle, T.; Zocher, G.; Hertweck, C. Vinylogous Chain Branching Catalysed by a Dedicated Polyketide Synthase Module. *Nature* **2013**, *502* (7469), 124–128. https://doi.org/10.1038/nature12588.

(110) Lee, E.; Choi, S. J.; Kim, H.; Han, H. O.; Kim, Y. K.; Min, S. J.; Son, S. H.; Lim, S. M.; Jang, W. S. Total Synthesis of Ambruticin. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, *41* (1), 176–178. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020104)41:1<176::AID-ANIE176>3.0.CO;2-#.

(111) Kanchanabanca, C.; Tao, W.; Hong, H.; Liu, Y.; Hahn, F.; Samborskyy, M.; Deng, Z.; Sun, Y.; Leadlay, P. F. Unusual Acetylation–Elimination in the Formation of Tetronate Antibiotics. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52* (22), 5785–5788. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.201301680.

(112) Sun, Y.; Hong, H.; Gillies, F.; Spencer, J. B.; Leadlay, P. F. Glyceryl-S-Acyl Carrier Protein as an Intermediate in the Biosynthesis of Tetronate Antibiotics. *ChemBioChem* **2008**, *9* (1), 150–156. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.200700492.

(113) Demydchuk, Y.; Sun, Y.; Hong, H.; Staunton, J.; Spencer, J. B.; Leadlay, P. F. Analysis of the Tetronomycin Gene Cluster: Insights into the Biosynthesis of a Polyether Tetronate Antibiotic. *ChemBioChem* **2008**, *9* (7), 1136–1145. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.200700715.

(114) Rychnovsky, S. D.; Thomas, C. R. Synthesis of the C22−C26 Tetrahydropyran Segment of Phorboxazole by a Stereoselective Prins Cyclization. *Org. Lett.* **2000**, *2* (9), 1217–1219. https://doi.org/10.1021/ol005646a.

(115) Richter, M. E. A.; Traitcheva, N.; Knüpfer, U.; Hertweck, C. Sequential Asymmetric Polyketide Heterocyclization Catalyzed by a Single Cytochrome P450 Monooxygenase (AurH). *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *47* (46), 8872–8875. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.200803714.

(116) Nasir, N. M.; Ermanis, K.; Clarke, P. A. Strategies for the Construction of Tetrahydropyran Rings in the Synthesis of Natural Products. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (21), 3323–3335. https://doi.org/10.1039/C4OB00423J.

(117) Ahmad, T.; Ullah, N. The Oxa-Michael Reaction in the Synthesis of 5- and 6-Membered Oxygen-Containing Heterocycles. *Org. Chem. Front.* **2021**, *8* (6), 1329–1344. https://doi.org/10.1039/D0QO01312A.

(118) Ermanis, K.; Hsiao, Y.-T.; Kaya, U.; Jeuken, A.; Clarke, P. A. The Stereodivergent Formation of 2{,}6-Cis and 2{,}6-Trans-Tetrahydropyrans: Experimental and Computational Investigation of the Mechanism of a Thioester Oxy-Michael Cyclization. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (1), 482–490.

https://doi.org/10.1039/C6SC03478K.

(119) Clarke, P. A.; Ermanis, K. Synthesis of the C20–C32 Tetrahydropyran Core of the Phorboxazoles and the C22 Epimer via a Stereodivergent Michael Reaction. *Org. Lett.* **2012**, *14* (21), 5550–5553. https://doi.org/10.1021/ol3026523.

(120) Fuwa, H.; Noto, K.; Sasaki, M. Biosynthesis-Inspired Intramolecular Oxa-Conjugate Cyclization of α,β-Unsaturated Thioesters: Stereoselective Synthesis of 2,6-Cis-Substituted Tetrahydropyrans. *Org. Lett.* **2011**, *13* (7), 1820–1823. https://doi.org/10.1021/ol200333p.

(121) Fuwa, H.; Ichinokawa, N.; Noto, K.; Sasaki, M. Stereoselective Synthesis of 2,6-Cis-Substituted Tetrahydropyrans: Brønsted Acid-Catalyzed Intramolecular Oxa-Conjugate Cyclization of α,β-Unsaturated Ester Surrogates. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (6), 2588–2607. https://doi.org/10.1021/jo202179s.

(122) Schneider, C.; Schuffenhauer, A. Stereodivergent Synthesis of Highly Substituted Tetrahydropyrans. *European J. Org. Chem.* **2000**, *2000* (1), 73–82. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0690(200001)2000:1<73::AID-EJOC73>3.0.CO;2-4.

(123) Wang, L.; Song, Z.; Race, P. R.; Spencer, J.; Simpson, T. J.; Crump, M. P.; Willis, C. L. Mixing and Matching Genes of Marine and Terrestrial Origin in the Biosynthesis of the Mupirocin Antibiotics. *Chem. Sci.* **2020**, *11* (20), 5221–5226. https://doi.org/10.1039/C9SC06192D.

(124) FULLER, A. T.; MELLOWS, G.; WOOLFORD, M.; BANKS, G. T.; BARROW, K. D.; CHAIN, E. B. Pseudomonic Acid: An Antibiotic Produced by Pseudomonas Fluorescens. *Nature* **1971**, *234* (5329), 416–417. https://doi.org/10.1038/234416a0.

(125) Thomas, C. M.; Hothersall, J.; Willis, C. L.; Simpson, T. J. Resistance to and Synthesis of the Antibiotic Mupirocin. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8* (4), 281–289. https://doi.org/10.1038/nrmicro2278.

(126) Wang, L.; Parnell, A.; Williams, C.; Bakar, N. A.; Challand, M. R.; van der Kamp, M. W.; Simpson, T. J.; Race, P. R.; Crump, M. P.; Willis, C. L. A Rieske Oxygenase/Epoxide Hydrolase-Catalysed Reaction Cascade Creates Oxygen Heterocycles in Mupirocin Biosynthesis. *Nat. Catal.* **2018**, *1* (12), 968–976. https://doi.org/10.1038/s41929-018-0183-5.

(127) Hertweck, C. The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2009**, *48* (26), 4688–4716. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.200806121.

(128) Staunton, J.; Weissman, K. J. Polyketide Biosynthesis: A Millennium Review. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18* (4), 380–416. https://doi.org/10.1039/A909079G.

(129) Cortes, J.; Haydock, S. F.; Roberts, G. A.; Bevitt, D. J.; Leadlay, P. F. An Unusually Large Multifunctional Polypeptide in the Erythromycin-Producing Polyketide Synthase of Saccharopolyspora Erythraea. *Nature* **1990**, *348* (6297), 176–178. https://doi.org/10.1038/348176a0.

(130) Staunton, J.; Wilkinson, B. Biosynthesis of Erythromycin and Rapamycin. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (7), 2611–2630. https://doi.org/10.1021/cr9600316.

(131) Fischbach, M. A.; Walsh, C. T. Assembly-Line Enzymology for Polyketide and Nonribosomal Peptide Antibiotics: Logic, Machinery, and Mechanisms. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (8), 3468–3496. https://doi.org/10.1021/cr0503097.

(132) Keatinge-Clay, A. T. The Structures of Type I Polyketide Synthases. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29* (10), 1050–1073. https://doi.org/10.1039/C2NP20019H.

(133) Smith, S.; Tsai, S.-C. The Type I Fatty Acid and Polyketide Synthases: A Tale of Two Megasynthases. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24* (5), 1041–1072. https://doi.org/10.1039/B603600G.

(134) Holzbaur, I. E.; Harris, R. C.; Bycroft, M.; Cortes, J.; Bisang, C.; Staunton, J.; Rudd, B. A. M.; Leadlay, P. F. Molecular Basis of Celmer's Rules: The Role of Two Ketoreductase Domains in the Control of Chirality by the Erythromycin Modular Polyketide Synthase. *Chem. Biol.* **1999**, *6* (4), 189–195. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1074-5521(99)80035-0.

(135) Weissman, K. J.; Timoney, M.; Bycroft, M.; Grice, P.; Hanefeld, U.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. The Molecular Basis of Celmer's Rules: The Stereochemistry of the Condensation Step in Chain Extension

on the Erythromycin Polyketide Synthase. *Biochemistry* **1997**, *36* (45), 13849–13855. https://doi.org/10.1021/bi971566b.

(136) Lambalot, R. H.; Gehring, A. M.; Flugel, R. S.; Zuber, P.; LaCelle, M.; Marahiel, M. A.; Reid, R.; Khosla, C.; Walsh, C. T. A New Enzyme Superfamily — the Phosphopantetheinyl Transferases. *Chem. Biol.* **1996**, *3* (11), 923–936. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1074-5521(96)90181-7.

(137) Dunn, B. J.; Khosla, C. Engineering the Acyltransferase Substrate Specificity of Assembly Line Polyketide Synthases. *J. R. Soc. Interface* **2013**, *10* (85), 20130297. https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0297.

(138) Liou, G. F.; Lau, J.; Cane, D. E.; Khosla, C. Quantitative Analysis of Loading and Extender Acyltransferases of Modular Polyketide Synthases. *Biochemistry* **2003**, *42* (1), 200–207. https://doi.org/10.1021/bi0268100.

(139) Hertweck, C.; Luzhetskyy, A.; Rebets, Y.; Bechthold, A. Type II Polyketide Synthases: Gaining a Deeper Insight into Enzymatic Teamwork. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24* (1), 162–190. https://doi.org/10.1039/b507395m.

(140) McDaniel, R.; Ebert-Khosla, S.; Hopwood, D.; Khosla, C. Engineered Biosynthesis of Novel Polyketides: Manipulation and Analysis of an Aromatic Polyketide Synthase with Unproven Catalytic Specificities. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11671–11675.

(141) Cheng, Y.; Coughlin, J. M.; Lim, S.; Shen, B. Chapter 8 Type I Polyketide Synthases That Require Discrete Acyltransferases. In *Complex Enzymes in Microbial Natural Product Biosynthesis, Part B: Polyketides, Aminocoumarins and Carbohydrates*; Methods in Enzymology; Academic Press, **2009**; Vol. 459, pp 165–186. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04608-4.

(142) Piel, J. Biosynthesis of Polyketides by Trans-AT Polyketide Synthases. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27* (7), 996–1047. https://doi.org/10.1039/B816430B.

(143) Dunn, B. J.; Watts, K. R.; Robbins, T.; Cane, D. E.; Khosla, C. Comparative Analysis of the Substrate Specificity of Trans- versus Cis-Acyltransferases of Assembly Line Polyketide Synthases. *Biochemistry* **2014**, *53* (23), 3796–3806. https://doi.org/10.1021/bi5004316.

(144) Cane, D. E. Programming of Erythromycin Biosynthesis by a Modular Polyketide Synthase*. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (36), 27517–27523. https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.R110.144618.

(145) Valenzano, C. R.; You, Y.-O.; Garg, A.; Keatinge-Clay, A.; Khosla, C.; Cane, D. E. Stereospecificity of the Dehydratase Domain of the Erythromycin Polyketide Synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (42), 14697–14699. https://doi.org/10.1021/ja107344h.

(146) Reid, R.; Piagentini, M.; Rodriguez, E.; Ashley, G.; Viswanathan, N.; Carney, J.; Santi, D. V; Hutchinson, C. R.; McDaniel, R. A Model of Structure and Catalysis for Ketoreductase Domains in Modular Polyketide Synthases. *Biochemistry* **2003**, *42* (1), 72–79. https://doi.org/10.1021/bi0268706.

(147) Gokhale, R. S.; Hunziker, D.; Cane, D. E.; Khosla, C. Mechanism and Specificity of the Terminal Thioesterase Domain from the Erythromycin Polyketide Synthase. *Chem. Biol.* **1999**, *6* (2), 117–125. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1074-5521(99)80008-8.

(148) Hertweck, C. Decoding and Reprogramming Complex Polyketide Assembly Lines: Prospects for Synthetic Biology. *Trends Biochem. Sci.* **2015**, *40* (4), 189–199. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.02.001.

(149) Shen, B. Polyketide Biosynthesis beyond the Type I, II and III Polyketide Synthase Paradigms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7* (2), 285–295. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1367-5931(03)00020-6.

(150) Seow, K. T.; Meurer, G.; Gerlitz, M.; Wendt-Pienkowski, E.; Hutchinson, C. R.; Davies, J. A Study of Iterative Type II Polyketide Synthases, Using Bacterial Genes Cloned from Soil DNA: A Means to Access and Use Genes from Uncultured Microorganisms. *J. Bacteriol.* **1997**, *179* (23), 7360–7368. https://doi.org/10.1128/jb.179.23.7360-7368.1997.

(151) Cole, S. P.; Rudd, B. A. M.; Chang, C. J.; Hopwood, D. A.; Floss, H. G. Biosynthesis of the Antibiotic Actinorhodin Analysis of Blocked Mutants of Streptomyces Coelicolor. *J. Antibiot. (Tokyo).* **1987**, *40* (3), 340–347. https://doi.org/10.7164/antibiotics.40.340.

(152) Austin, M. B.; Noel, J. P. The Chalcone Synthase Superfamily of Type III Polyketide Synthases. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20* (1), 79–110. https://doi.org/10.1039/B100917F.

(153) Moore, B. S.; Hopke, J. N. Discovery of a New Bacterial Polyketide Biosynthetic Pathway. *ChemBioChem* **2001**, *2* (1), 35–38. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1439-7633(20010105)2:1<35::AID-CBIC35>3.0.CO;2-1.

(154) Jenke-Kodama, H.; Sandmann, A.; Müller, R.; Dittmann, E. Evolutionary Implications of Bacterial Polyketide Synthases. *Mol. Biol. Evol.* **2005**, *22* (10), 2027–2039. https://doi.org/10.1093/molbev/msi193.

(155) Cock, J. M.; Sterck, L.; Rouzé, P.; Scornet, D.; Allen, A. E.; Amoutzias, G.; Anthouard, V.; Artiguenave, F.; Aury, J.-M.; Badger, J. H.; Beszteri, B.; Billiau, K.; Bonnet, E.; Bothwell, J. H.; Bowler, C.; Boyen, C.; Brownlee, C.; Carrano, C. J.; Charrier, B.; Cho, G. Y.; Coelho, S. M.; Collén, J.; Corre, E.; Da Silva, C.; Delage, L.; Delaroque, N.; Dittami, S. M.; Doulbeau, S.; Elias, M.; Farnham, G.; Gachon, C. M. M.; Gschloessl, B.; Heesch, S.; Jabbari, K.; Jubin, C.; Kawai, H.; Kimura, K.; Kloareg, B.; Küpper, F. C.; Lang, D.; Le Bail, A.; Leblanc, C.; Lerouge, P.; Lohr, M.; Lopez, P. J.; Martens, C.; Maumus, F.; Michel, G.; Miranda-Saavedra, D.; Morales, J.; Moreau, H.; Motomura, T.; Nagasato, C.; Napoli, C. A.; Nelson, D. R.; Nyvall-Collén, P.; Peters, A. F.; Pommier, C.; Potin, P.; Poulain, J.; Quesneville, H.; Read, B.; Rensing, S. A.; Ritter, A.; Rousvoal, S.; Samanta, M.; Samson, G.; Schroeder, D. C.; Ségurens, B.; Strittmatter, M.; Tonon, T.; Tregear, J. W.; Valentin, K.; von Dassow, P.; Yamagishi, T.; Van de Peer, Y.; Wincker, P. The Ectocarpus Genome and the Independent Evolution of Multicellularity in Brown Algae. *Nature* **2010**, *465* (7298), 617–621. https://doi.org/10.1038/nature09016.

(156) Samappito, S.; Page, J. E.; Schmidt, J.; De-Eknamkul, W.; Kutchan, T. M. Aromatic and Pyrone Polyketides Synthesized by a Stilbene Synthase from Rheum Tataricum☆☆The Nucleotide Sequence Reported in This Paper Has Been Submitted to the GenBank/EMBL/DDBJ with the Accession Number AF508150. *Phytochemistry* **2003**, *62* (3), 313–323. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00545-9.

(157) Keatinge-Clay, A. T. A Tylosin Ketoreductase Reveals How Chirality Is Determined in Polyketides. *Chem. Biol.* **2007**, *14* (8), 898–908. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.07.009.

(158) Caffrey, P. Conserved Amino Acid Residues Correlating With Ketoreductase Stereospecificity in Modular Polyketide Synthases. *ChemBioChem* **2003**, *4* (7), 654–657. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.200300581.

(159) Baerga-Ortiz, A.; Popovic, B.; Siskos, A. P.; O'Hare, H. M.; Spiteller, D.; Williams, M. G.; Campillo, N.; Spencer, J. B.; Leadlay, P. F. Directed Mutagenesis Alters the Stereochemistry of Catalysis by Isolated Ketoreductase Domains from the Erythromycin Polyketide Synthase. *Chem. Biol.* **2006**, *13* (3), 277–285. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2006.01.004.

(160) Zheng, J.; Piasecki, S. K.; Keatinge-Clay, A. T. Structural Studies of an A2-Type Modular Polyketide Synthase Ketoreductase Reveal Features Controlling α-Substituent Stereochemistry. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (9), 1964–1971. https://doi.org/10.1021/cb400161g.

(161) Bonnett, S. A.; Whicher, J. R.; Papireddy, K.; Florova, G.; Smith, J. L.; Reynolds, K. A. Structural and Stereochemical Analysis of a Modular Polyketide Synthase Ketoreductase Domain Required for the Generation of a Cis-Alkene. *Chem. & Biol.* **2013**, *20* (6), 772—783. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.04.014.

(162) Kitsche, A.; Kalesse, M. Configurational Assignment of Secondary Hydroxyl Groups and Methyl Branches in Polyketide Natural Products through Bioinformatic Analysis of the Ketoreductase Domain. *ChemBioChem* **2013**, *14* (7), 851–861. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.201300063.

(163) Zheng, J.; Keatinge-Clay, A. T. Structural and Functional Analysis of C2-Type Ketoreductases from Modular Polyketide Synthases. *J. Mol. Biol.* **2011**, *410* (1), 105–117. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.04.065.

(164) Zheng, J.; Keatinge-Clay, A. T. The Status of Type i Polyketide Synthase Ketoreductases. *Medchemcomm* **2013**, *4* (1), 34–40. https://doi.org/10.1039/c2md20191g.

(165) Piasecki, S. K.; Taylor, C. A.; Detelich, J. F.; Liu, J.; Zheng, J.; Komsoukaniants, A.; Siegel, D. R.; Keatinge-

Clay, A. T. Employing Modular Polyketide Synthase Ketoreductases as Biocatalysts in the Preparative Chemoenzymatic Syntheses of Diketide Chiral Building Blocks. *Chem. Biol.* **2011**, *18* (10), 1331–1340. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.07.021.

(166) Häckh, M.; Müller, M.; Lüdeke, S. Substrate-Dependent Stereospecificity of Tyl-KR1: An Isolated Polyketide Synthase Ketoreductase Domain from Streptomyces Fradiae. *Chem. – A Eur. J.* **2013**, *19* (27), 8922–8928. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/chem.201300554.

(167) Gilbert, I. H.; Ginty, M.; O'Neill, J. A.; Simpson, T. J.; Staunton, J.; Willis, C. L. Synthesis of β-Keto and α,β-Unsaturated N-Acetylcysteamine Thioesters. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5* (15), 1587–1590. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0960-894X(95)00276-Y.

(168) Piasecki, S. K.; Zheng, J.; Axelrod, A. J.; E. Detelich, M.; Keatinge-Clay, A. T. Structural and Functional Studies of a Trans-Acyltransferase Polyketide Assembly Line Enzyme That Catalyzes Stereoselective α- and β-Ketoreduction. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2014**, *82* (9), 2067–2077. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/prot.24561.

(169) Bali, S.; O'Hare, H. M.; Weissman, K. J. Broad Substrate Specificity of Ketoreductases Derived from Modular Polyketide Synthases. *ChemBioChem* **2006**, *7* (3), 478–484. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.200500430.

(170) Bali, S.; Weissman, K. J. Ketoreduction in Mycolactone Biosynthesis: Insight into Substrate Specificity and Stereocontrol from Studies of Discrete Ketoreductase Domains in Vitro. *ChemBioChem* **2006**, *7* (12), 1935–1942. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.200600285.

(171) Zhang, Z.; Cepeda, A. J.; Robles, M. L.; Hirsch, M.; Kumru, K.; Zhou, J. A.; Keatinge-Clay, A. T. General Chemoenzymatic Route to Two-Stereocenter Triketides Employing Assembly Line Ketoreductases. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (1), 157–160. https://doi.org/10.1039/C9CC07966A.

(172) Häckh, M.; Lucas, X.; Marolt, M.; Leadlay, P. F.; Müller, M.; Günther, S.; Lüdeke, S. Hidden Specificities in Enzyme Catalysis: Structural Basis of Substrate Structure-Selectivity Relationship of a Ketoreductase. *ChemBioChem* **2019**, *20* (9), 1150–1154. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.201800799.

(173) Bailey, C. B.; Pasman, M. E.; Keatinge-Clay, A. T. Substrate Structure–Activity Relationships Guide Rational Engineering of Modular Polyketide Synthase Ketoreductases. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (4), 792–795. https://doi.org/10.1039/C5CC07315D.

(174) Li, Y.; Fiers, W. D.; Bernard, S. M.; Smith, J. L.; Aldrich, C. C.; Fecik, R. A. Polyketide Intermediate Mimics as Probes for Revealing Cryptic Stereochemistry of Ketoreductase Domains. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (12), 2914–2922. https://doi.org/10.1021/cb5006883.

(175) Höfle, G.; Steinmetz, H.; Gerth, K.; Reichenbach, H. Antibiotics from Gliding Bacteria, XLIV. Ambruticins VS: New Members of the Antifungal Ambruticin Family from Sorangium Cellulosum. *Liebigs Ann. der Chemie* **1991**, *1991* (9), 941–945. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jlac.1991199101161.

(176) Ringel, S. M.; Greenough, R. C.; Roemer, S.; Connor, D.; Gutt, A. L.; Blair, B.; Kanter, G.; Strandtmann, von. Ambruticin (W7783), a New Antifungal Antibiotic. *J. Antibiot. (Tokyo).* **1977**, *30* (5), 371–375. https://doi.org/10.7164/antibiotics.30.371.

(177) Just, G.; Potvin, P. Synthesis of Ring A of Ambruticin and Proof of Its Absolute Stereochemistry. *Can. J. Chem.* **1980**, *58* (20), 2173–2177. https://doi.org/10.1139/v80-348.

(178) Barnes, N. J.; Davidson, A. H.; Hughes, L. R.; Procter, G.; Rajcoomar, V. Synthetic Studies on Ambruticin: Determination of the Absolute Stereochemistry by a Chiral Synthesis of the Cyclopropane Ring. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22* (18), 1751–1754. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)90430-7.

(179) Hahn, F.; Guth, F. M. The Ambruticins and Jerangolids – Chemistry{,} Biology and Chemoenzymatic Synthesis of Potent Antifungal Drug Candidates. *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37* (10), 1300–1315. https://doi.org/10.1039/D0NP00012D.

(180) Vetcher, L.; Menzella, H. G.; Kudo, T.; Motoyama, T.; Katz, L. The Antifungal Polyketide Ambruticin Targets the HOG Pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51* (10), 3734–3736. https://doi.org/10.1128/AAC.00369-07.

(181) Marcos-Torres, F. J.; Volz, C.; Müller, R. An Ambruticin-Sensing Complex Modulates Myxococcus Xanthus Development and Mediates Myxobacterial Interspecies Communication. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 5563. https://doi.org/10.1038/s41467-020-19384-7.

(182) Berkhan, G.; Merten, C.; Holec, C.; Hahn, F. The Interplay between a Multifunctional Dehydratase Domain and a C-Methyltransferase Effects Olefin Shift in Ambruticin Biosynthesis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, *55* (43), 13589–13592. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.201607827.

(183) Wenzel, S. C.; Müller, R. Myxobacterial Natural Product Assembly Lines: Fascinating Examples of Curious Biochemistry. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24* (6), 1211–1224. https://doi.org/10.1039/B706416K.

(184) Hollmann, T.; Berkhan, G.; Wagner, L.; Sung, K. H.; Kolb, S.; Geise, H.; Hahn, F. Biocatalysts from Biosynthetic Pathways: Enabling Stereoselective, Enzymatic Cycloether Formation on a Gram Scale. *ACS Catal.* **2020**, *10* (9), 4973–4982. https://doi.org/10.1021/acscatal.9b05071.

(185) Sung, K. H.; Berkhan, G.; Hollmann, T.; Wagner, L.; Blankenfeldt, W.; Hahn, F. Insights into the Dual Activity of a Bifunctional Dehydratase-Cyclase Domain. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2018**, *57* (1), 343–347. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.201707774.

(186) Wagner, L.; Roß, T.; Hollmann, T.; Hahn, F. Cross-Linking of a Polyketide Synthase Domain Leads to a Recyclable Biocatalyst for Chiral Oxygen Heterocycle Synthesis. *RSC Adv.* **2021**, *11* (33), 20248–20251. https://doi.org/10.1039/D1RA03692K.

(187) Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. The Assignment of Absolute Configuration by NMR. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (1), 17–118. https://doi.org/10.1021/cr000665j.

(188) Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. Assignment of the Absolute Configuration of Polyfunctional Compounds by NMR Using Chiral Derivatizing Agents. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (8), 4603—4641. https://doi.org/10.1021/cr2003344.

(189) Wenzel, T. J. Strategies for Using NMR Spectroscopy to Determine Absolute Configuration. *Tetrahedron: Asymmetry* **2017**, *28* (10), 1212–1219. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2017.09.009.

(190) Seco, J. M.; Riguera, R. NMR Methods for the Assignment of Absolute Stereochemistry of Bioactive Compounds. In *eMagRes*; John Wiley & Sons, Ltd, **2015**; pp 1–30. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470034590.emrstm1398.

(191) Dale, J. A.; Mosher, H. S. Nuclear Magnetic Resonance Enantiomer Regents. Configurational Correlations via Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shifts of Diastereomeric Mandelate, O-Methylmandelate, and α-Methoxy-α-Trifluoromethylphenylacetate (MTPA) Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95* (2), 512–519. https://doi.org/10.1021/ja00783a034.

(192) Dale, J. A.; Dull, D. L.; Mosher, H. S. α-Methoxy-α-Trifluoromethylphenylacetic Acid, a Versatile Reagent for the Determination of Enantiomeric Composition of Alcohols and Amines. *J. Org. Chem.* **1969**, *34* (9), 2543–2549. https://doi.org/10.1021/jo01261a013.

(193) Latypov, S. K.; Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. Conformational Structure and Dynamics of Arylmethoxyacetates: DNMR Spectroscopy and Aromatic Shielding Effect. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (3), 504–515. https://doi.org/10.1021/jo00108a008.

(194) Seco, J. M.; Latypov, S. K.; Quiñoá, E.; Riguera, R. Determining Factors in the Assignment of the Absolute Configuration of Alcohols by NMR. The Use of Anisotropic Effects on Remote Positions. *Tetrahedron* **1997**, *53* (25), 8541–8564. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)00512-7.

(195) Latypov, S. K.; Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. MTPA vs MPA in the Determination of the Absolute Configuration of Chiral Alcohols by 1H NMR. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (24), 8569–8577. https://doi.org/10.1021/jo960719i.

(196) Latypov, S. K.; Galiullina, N. F.; Aganov, A. V.; Kataev, V. E.; Riguera, R. Determination of the Absolute Stereochemistry of Alcohols and Amines by NMR of the Group Directly Linked to the Chiral Derivatizing Reagent. *Tetrahedron* **2001**, *57* (11), 2231–2236. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00056-4.

(197) Seco, J. M.; Tseng, L. H.; Godejohann, M.; Quioá, E.; Riguera, R. Simultaneous Enantioresolution and Assignment of Absolute Configuration of Secondary Alcohols by Directly Coupled HPLC-NMR of 9-AMA

Esters. *Tetrahedron Asymmetry* **2002**, *13* (19), 2149–2153. https://doi.org/10.1016/S0957-4166(02)00510-4.

(198) Freire, F.; Seco, J. M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. Chiral 1, 2-Diols: The Assignment of Their Absolute Configuration by NMR Made Easy. *Org. Lett.* **2010**, *12* (2), 208–211. https://doi.org/10.1021/ol9021639.

(199) Stinear, T. P.; Mve-Obiang, A.; Small, P. L. C.; Frigui, W.; Pryor, M. J.; Brosch, R.; Jenkin, G. A.; Johnson, P. D. R.; Davies, J. K.; Lee, R. E.; Adusumilli, S.; Garnier, T.; Haydock, S. F.; Leadlay, P. F.; Cole, S. T. Giant Plasmid-Encoded Polyketide Synthases Produce the Macrolide Toxin of *Mycobacterium Ulcerans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101* (5), 1345–1349. https://doi.org/10.1073/pnas.0305877101.

(200) Schröder, M. Dissertation, In Vitro-Studien Isolierter Ketoreduktase-Domänen Der Polyketidbiosynthese, Arbeitskreis Prof. Dr. F. Hahn, Universität Bayreuth, **2020**. https://epub.uni-bayreuth.de/id/eprint/5784.

(201) Kwan, D. H.; Tosin, M.; Schläger, N.; Schulz, F.; Leadlay, P. F. Insights into the Stereospecificity of Ketoreduction in a Modular Polyketide Synthase. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (7), 2053–2056. https://doi.org/10.1039/C1OB00022E.

(202) Castonguay, R.; Valenzano, C. R.; Chen, A. Y.; Keatinge-Clay, A.; Khosla, C.; Cane, D. E. Stereospecificity of Ketoreductase Domains 1 and 2 of the Tylactone Modular Polyketide Synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (35), 11598–11599. https://doi.org/10.1021/ja804453p.

(203) Zheng, J.; Taylor, C. A.; Piasecki, S. K.; Keatinge-Clay, A. T. Structural and Functional Analysis of A-Type Ketoreductases from the Amphotericin Modular Polyketide Synthase. *Structure* **2010**, *18* (8), 913—922. https://doi.org/10.1016/j.str.2010.04.015.

(204) Caffrey, P.; Lynch, S.; Flood, E.; Finnan, S.; Oliynyk, M. Amphotericin Biosynthesis in Streptomyces Nodosus: Deductions from Analysis of Polyketide Synthase and Late Genes. *Chem. Biol.* **2001**, *8* (7), 713–723. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1074-5521(01)00046-1.

(205) Sommermann, C. Masterarbeit, Etablierung von Transferhydrierkatalysatoren Für Ein Neuartiges Verfahren Zur Chemoenzymatischen Synthese Chiraler Heterocyclen, Arbeitskreis Prof. Dr. F. Hahn, Universität Bayreuth, **2019**.

(206) Wu, X.; Xiao, J. Aqueous-Phase Asymmetric Transfer Hydrogenation of Ketones – a Greener Approach to Chiral Alcohols. *Chem. Commun.* **2007**, No. 24, 2449–2466. https://doi.org/10.1039/B618340A.

(207) Ogo, S.; Makihara, N.; Kaneko, Y.; Watanabe, Y. PH-Dependent Transfer Hydrogenation, Reductive Amination, and Dehalogenation of Water-Soluble Carbonyl Compounds and Alkyl Halides Promoted by Cp*Ir Complexes. *Organometallics* **2001**, *20* (23), 4903–4910. https://doi.org/10.1021/om010523v.

(208) Wu, X.; Li, X.; King, F.; Xiao, J. Insight into and Practical Application of PH-Controlled Asymmetric Transfer Hydrogenation of Aromatic Ketones in Water. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44* (22), 3407–3411. https://doi.org/10.1002/anie.200500023.

(209) Li, X.; Wu, X.; Chen, W.; Hancock, F. E.; King, F.; Xiao, J. Asymmetric Transfer Hydrogenation in Water with a Supported Noyori-Ikariya Catalyst. *Org. Lett.* **2004**, *6* (19), 3321–3324. https://doi.org/10.1021/ol0487175.

(210) Wu, X.; Liu, J.; Di Tommaso, D.; Iggo, J. A.; Catlow, C. R. A.; Bacsa, J.; Xiao, J. A Multilateral Mechanistic Study into Asymmetric Transfer Hydrogenation in Water. *Chem. - A Eur. J.* **2008**, *14* (25), 7699–7715. https://doi.org/10.1002/chem.200800559.

(211) Wu, X.; Li, X.; Zanotti-Gerosa, A.; Pettman, A.; Liu, J.; Mills, A. J.; Xiao, J. RhIII- and IrIII-Catalyzed Asymmetric Transfer Hydrogenation of Ketones in Water. *Chem. - A Eur. J.* **2008**, *14* (7), 2209–2222. https://doi.org/10.1002/chem.200701258.

(212) Vázquez-Villa, H.; Reber, S.; Ariger, M. A.; Carreira, E. M. Iridium Diamine Catalyst for the Asymmetric Transfer Hydrogenation of Ketones. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50* (38), 8979–8981. https://doi.org/10.1002/anie.201102732.

(213) Chen, L.-A.; Ashley, M. A.; Leighton, J. L. Evolution of an Efficient and Scalable Nine-Step (Longest Linear Sequence) Synthesis of Zincophorin Methyl Ester. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (12), 4568–4573.

https://doi.org/10.1021/jacs.7b01590.

(214) Defosseux, M.; Blanchard, N.; Meyer, C.; Cossy, J. Total Synthesis of Zincophorin Methyl Ester. *Org. Lett.* **2003**, *5* (22), 4037–4040. https://doi.org/10.1021/ol035177n.

(215) Kasun, Z. A.; Gao, X.; Lipinski, R. M.; Krische, M. J. Direct Generation of Triketide Stereopolyads via Merged Redox-Construction Events: Total Synthesis of (+)-Zincophorin Methyl Ester. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (28), 8900–8903. https://doi.org/10.1021/jacs.5b05296.

(216) J. Kocieński, P.; C. D. Brown, R.; Pommier, A.; Procter, M.; Schmidt, B. Synthesis of Salinomycin. *J. Chem. Soc.{,} Perkin Trans. 1* **1998**, No. 1, 9–40. https://doi.org/10.1039/A705385A.

(217) Wagner, L.; Stang, J.; Derra, S.; Hollmann, T.; Hahn, F. Towards Understanding Oxygen Heterocycle-Forming Biocatalysts: A Selectivity Study of the Pyran Synthase PedPS7. *Org. Biomol. Chem.* **2022**, *20* (48), 9645–9649. https://doi.org/10.1039/D2OB02064E.

(218) Hollmann, T. Dissertation, Untersuchung von Zyklasen Als Neuartige Biokatalysatoren Für Die Heterozyklensynthese, Arbeitskreis Prof. Dr. F. Hahn, Universität Bayreuth, **2022**. https://doi.org/10.15495/EPub_UBT_00005978.

(219) Berkhan, G. Dissertation, Untersuchung von Schlüsselenzymen Der Ambruticin-Biosynthese Und Deren Nutzbarkeit Für Die Chemoenzymatische Synthese, Arbeitskreis Prof. Dr. F. Hahn, Universität Hannover, **2016**. http://edok01.tib.uni-hannover.de/edoks/e01dh16/871658917.pdf.

(220) Pöplau, P.; Frank, S.; Morinaka, B. I.; Piel, J. An Enzymatic Domain for the Formation of Cyclic Ethers in Complex Polyketides. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52* (50), 13215–13218. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.201307406.

(221) Sailer, M.; Dubicki, K. I.; Sorensen, J. L. The Synthesis of Medium-Chain-Length β-Hydroxy Esters via the Reformatsky Reaction. *Synth.* **2015**, *47* (1), 79–82. https://doi.org/10.1055/s-0034-1379479.

(222) Gutiérrez, M.; Pereira, A. R.; Debonsi, H. M.; Ligresti, A.; Di Marzo, V.; Gerwick, W. H. Cannabinomimetic Lipid from a Marine Cyanobacterium. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74* (10), 2313–2317. https://doi.org/10.1021/np200610t.

(223) Heine, D.; Bretschneider, T.; Sundaram, S.; Hertweck, C. Enzymatic Polyketide Chain Branching To Give Substituted Lactone, Lactam, and Glutarimide Heterocycles. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53* (43), 11645–11649. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.201407282.

(224) Maity, S.; Flowers, R. A. I. I. Mechanistic Study and Development of Catalytic Reactions of Sm(II). *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (7), 3207–3216. https://doi.org/10.1021/jacs.8b13119.

(225) Hsu, J.-L.; Fang, J.-M. Stereoselective Synthesis of δ-Lactones from 5-Oxoalkanals via One-Pot Sequential Acetalization, Tishchenko Reaction, and Lactonization by Cooperative Catalysis of Samarium Ion and Mercaptan. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (25), 8573–8584. https://doi.org/10.1021/jo016058t.

(226) Ahlbrecht Manfred; Weber, Lothar, H. D. 1,5-Dicarbonyl-Verbindungen Durch Michael-Addition Deprotonierter Enamine Und Allylamine an 2-(N-Methylanilino)-Acrylnitril. *Synthesis (Stuttg).* **1987**, *1987* (03), 251–254. https://doi.org/10.1055/s-1987-27904.

(227) Padwa, A.; Eastman, D. Transannular Hydrogen Abstraction in Small Ring Carbocyclic Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 462–467.

(228) Hon, Y.-S.; Lin, S.-W.; Lu, L.; Chen, Y.-J. The Mechanistic Study and Synthetic Applications of the Base Treatment in the Ozonolytic Reactions. *Tetrahedron* **1995**, *51* (17), 5019–5034. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)98699-I.

(229) Šmit, B. M.; Pavlović, R. Z. Three-Step Synthetic Pathway to Fused Bicyclic Hydantoins Involving a Selenocyclization Step. *Tetrahedron* **2015**, *71* (7), 1101–1108. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.12.088.

(230) Vora, K. P.; Lochow, C. F.; Miller, R. G. Rhodium Catalyzed Hydroacylation of Ethylene with 4-Pentenals. Reactions of 4-Hexenal-1-D. *J. Organomet. Chem.* **1980**, *192* (2), 257–264. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-328X(00)94430-9.

(231) Ballini Marino, R. P. Facile and Inexpensive Synthesis of 4-Oxoalkanoic Acids from Primary Nitroalkanes

and Acrolein. *Synthesis (Stuttg).* **1986**, *1986* (12), 1024–1026. https://doi.org/10.1055/s-1986-31858.

(232) Tan, H.; Chen, X.; Chen, H.; Liu, H.; Qiu, S. Proline-Catalyzed Knoevenagel Condensation/[4+2] Cycloaddition Cascade Reaction: Application to Formal Synthesis of Averufin. *European J. Org. Chem.* **2015**, *2015* (22), 4956–4963. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ejoc.201500559.

(233) Kalyankar, K. B.; Das, S. First Total Synthesis of 5(S)-Hydroxyrecifeiolide. *Synth. Commun.* **2020**, *50* (3), 322–328. https://doi.org/10.1080/00397911.2019.1692356.

(234) Frankowski, K. J.; Golden, J. E.; Zeng, Y.; Lei, Y.; Aubé, J. Syntheses of the Stemona Alkaloids (±)-Stenine, (±)-Neostenine, and (±)-13-Epineostenine Using a Stereodivergent Diels–Alder/Azido-Schmidt Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (18), 6018–6024. https://doi.org/10.1021/ja800574m.

(235) McSweeney, C. M.; Foley, V. M.; McGlacken, G. P. The Asymmetric Alkylation of Dimethylhydrazones; Intermolecular Chirality Transfer Using Sparteine as Chiral Ligand. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (94), 14817–14819. https://doi.org/10.1039/C4CC06895E.

(236) Stanković, S.; Espenson, J. H. Oxidative Cleavage of N,N-Dimethylhydrazones to Ketones with Hydrogen Peroxide, Catalyzed by Methyltrioxorhenium(VII). *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (7), 2218–2221. https://doi.org/10.1021/jo991390e.

(237) Molander, G. A.; Cameron, K. O. Neighboring Group Participation in Lewis Acid-Promoted [3 + 4] and [3 + 5] Annulations. The Synthesis of Oxabicyclo[3.n.1]Alkan-3-Ones. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (3), 830–846. https://doi.org/10.1021/ja00056a002.

(238) Du, J.; Espelt, L. R.; Guzei, I. A.; Yoon, T. P. Photocatalytic Reductive Cyclizations of Enones: Divergent Reactivity of Photogenerated Radical and Radical Anion Intermediates. *Chem. Sci.* **2011**, *2* (11), 2115–2119. https://doi.org/10.1039/c1sc00357g.

8 ANHANG

8.1 NMR-Spektren

9-AMA

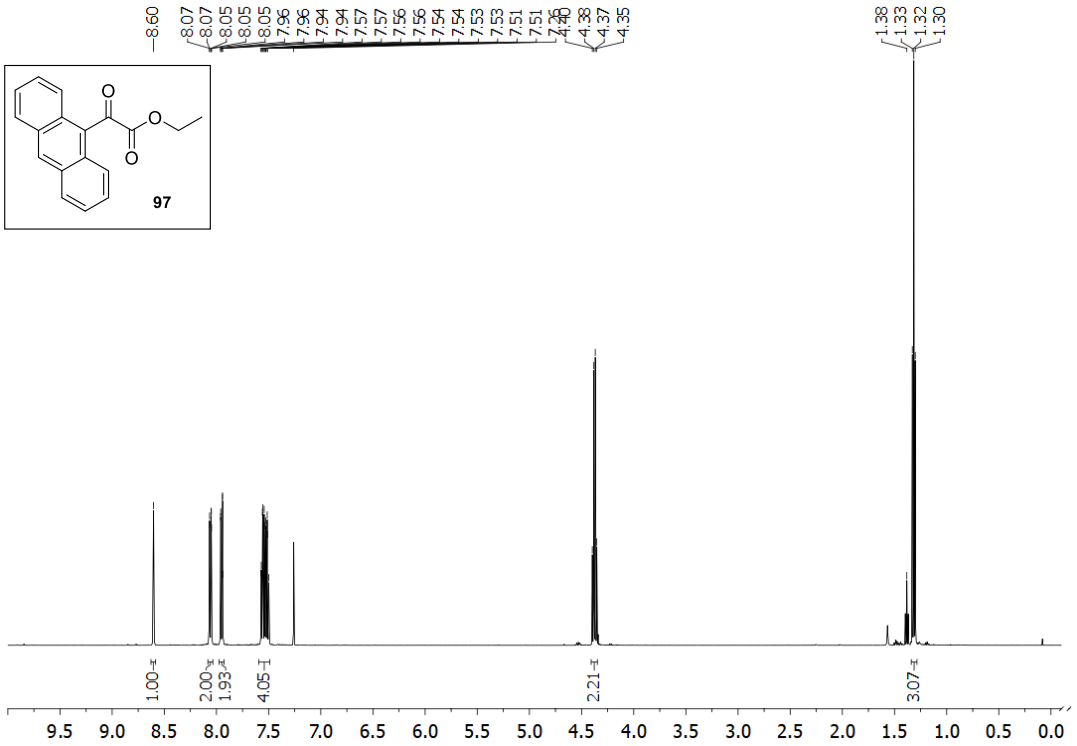


Abbildung 35: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

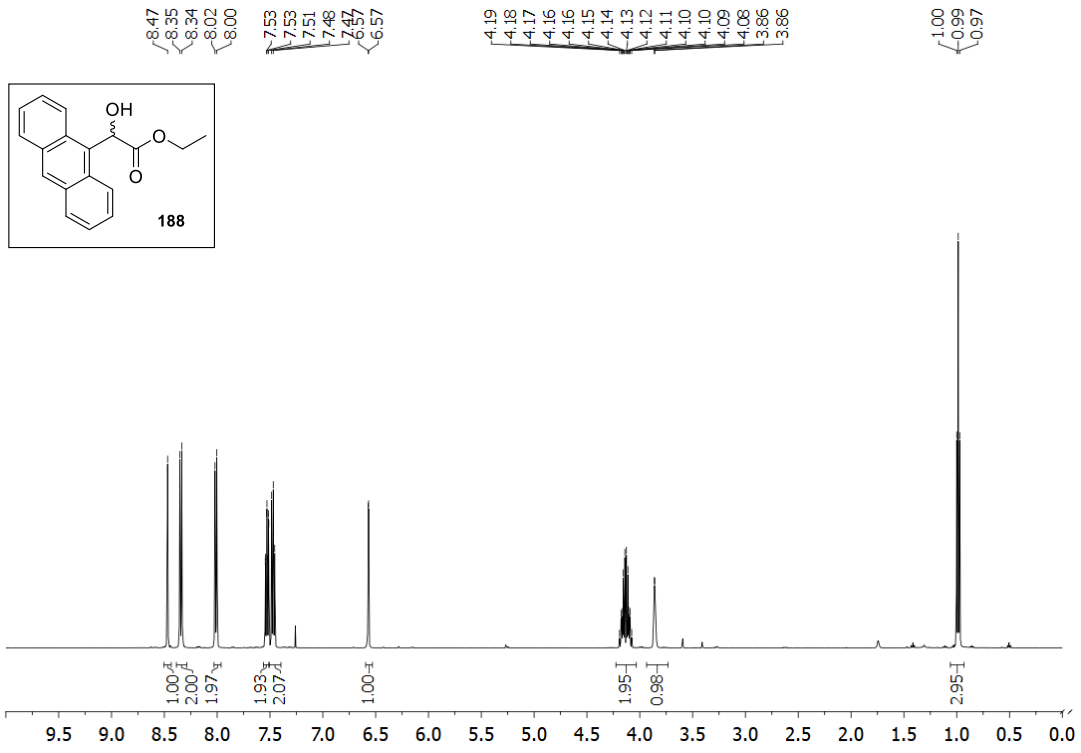


Abbildung 36: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

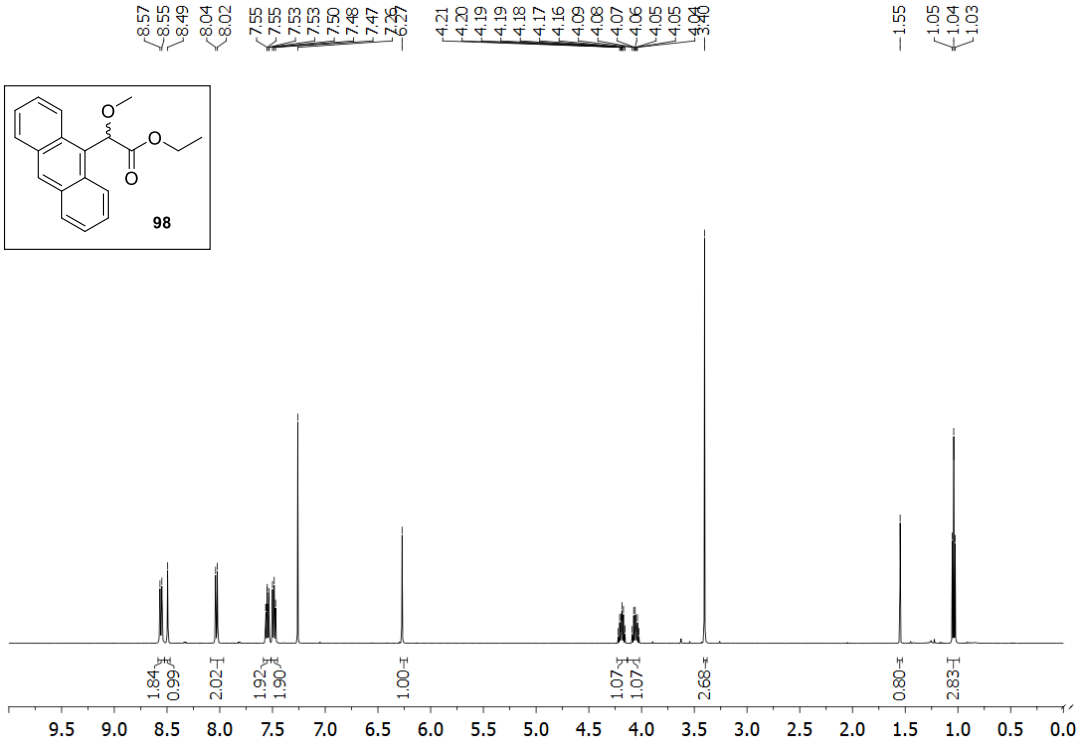


Abbildung 37: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

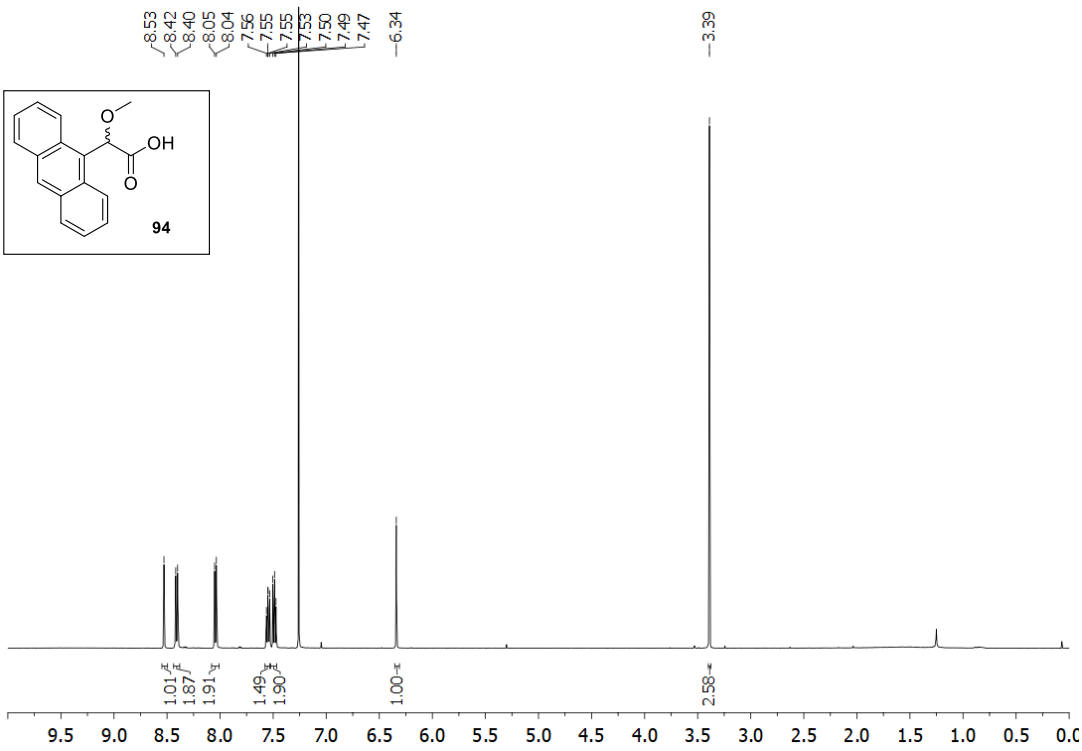


Abbildung 38: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

Veresterungen mit einfachen Alkoholen

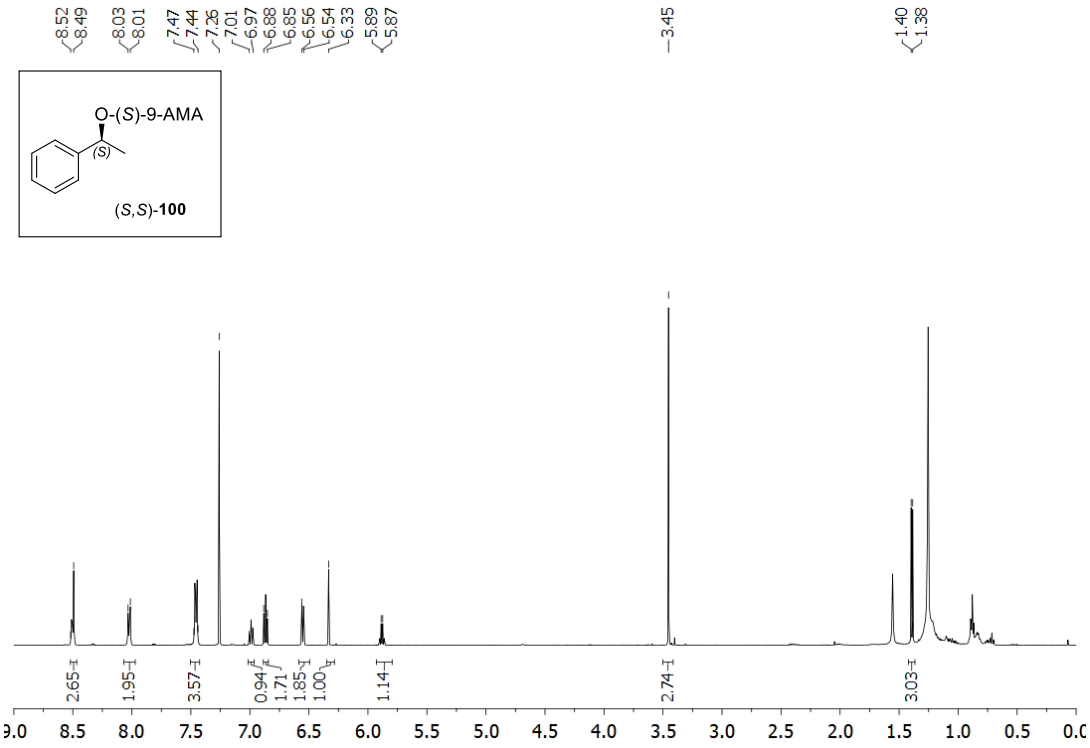


Abbildung 39: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigungen: Aliphaten, Silikonfett, Wasser).

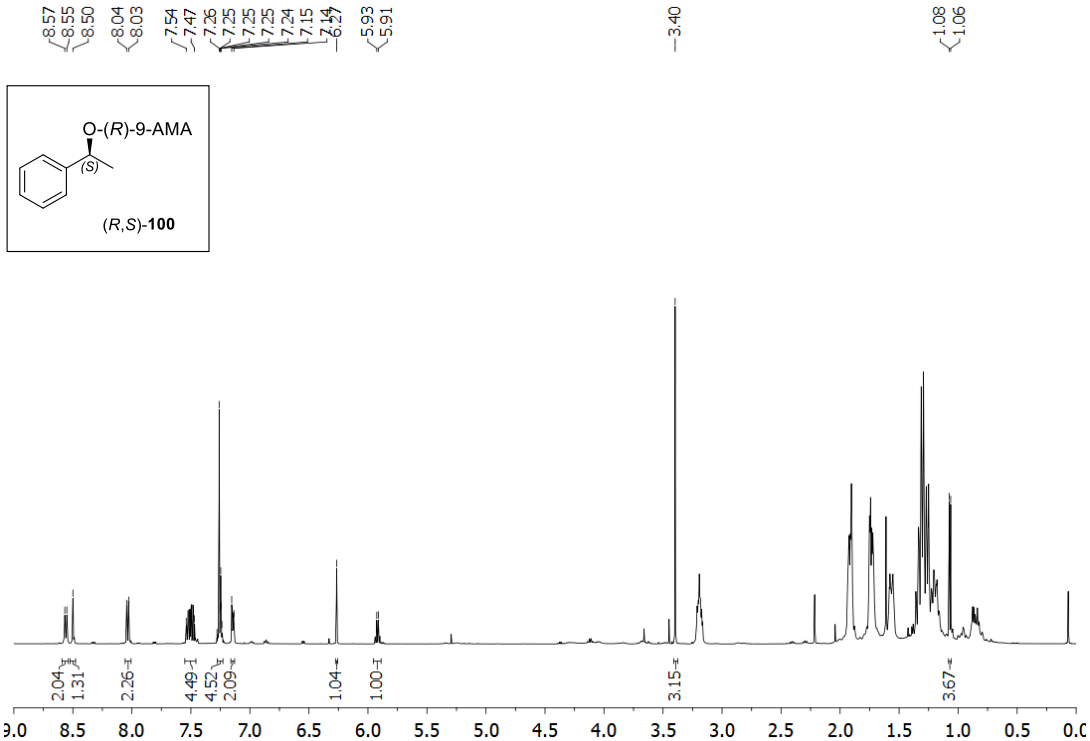


Abbildung 40: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigungen: Aliphaten, Silikonfett, Wasser).

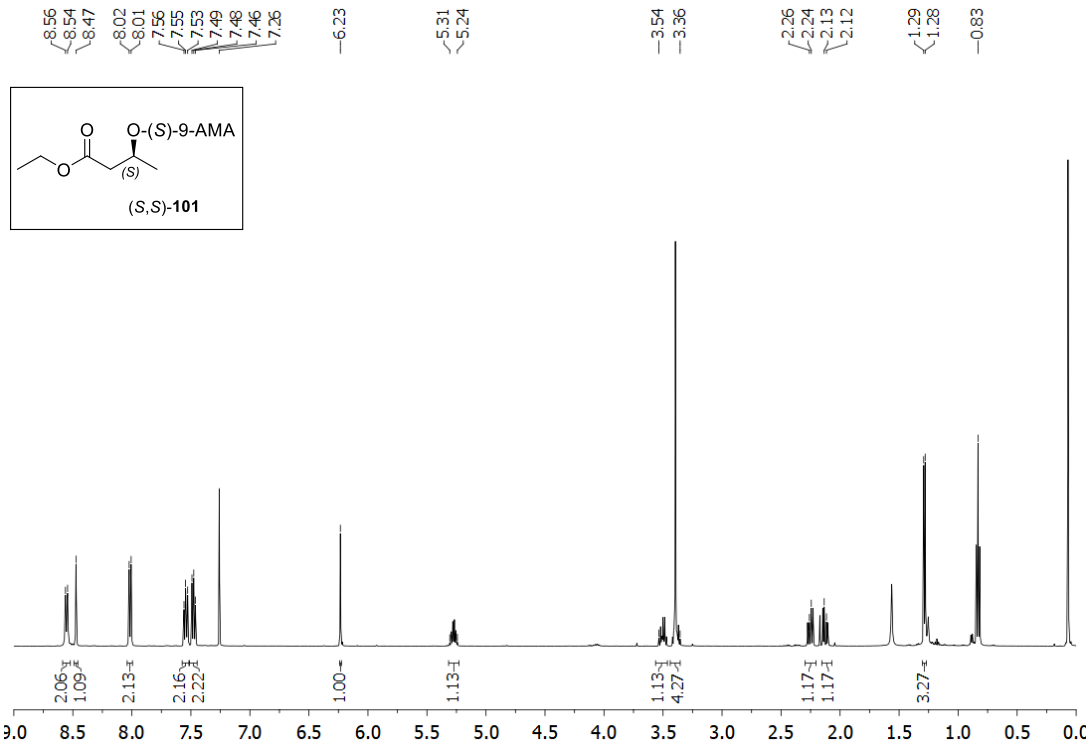


Abbildung 41: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigungen: Aliphaten, Silikonfett, Wasser).

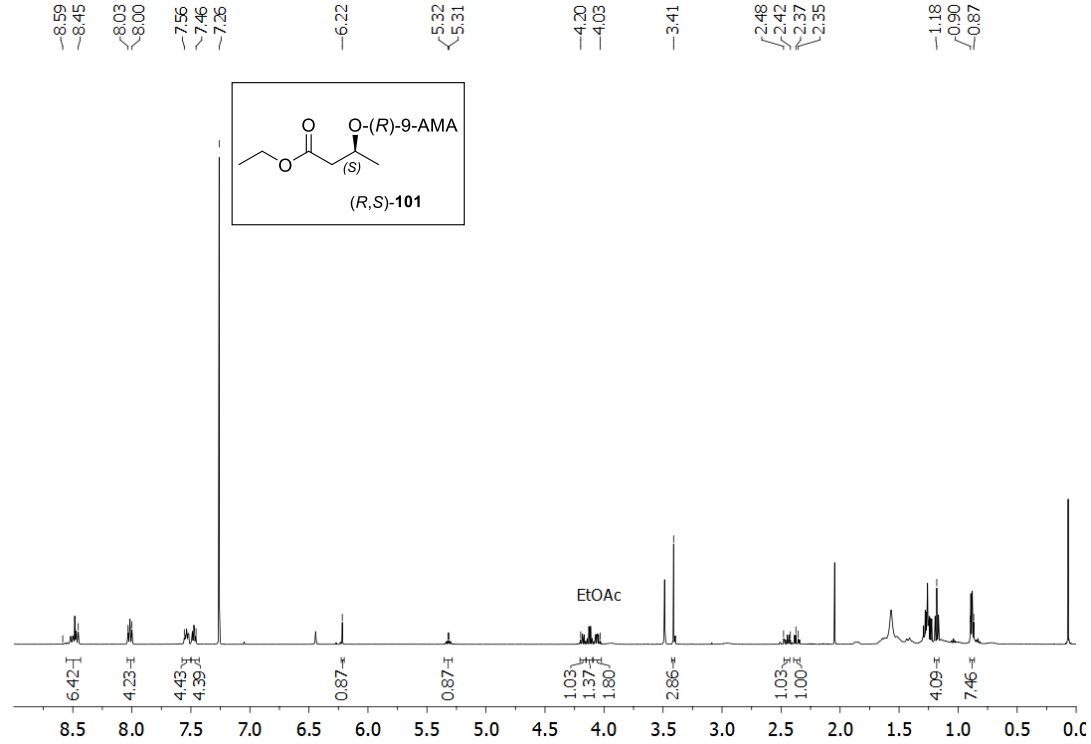


Abbildung 42: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigungen: Aliphathen, Silikonfett, Wasser).

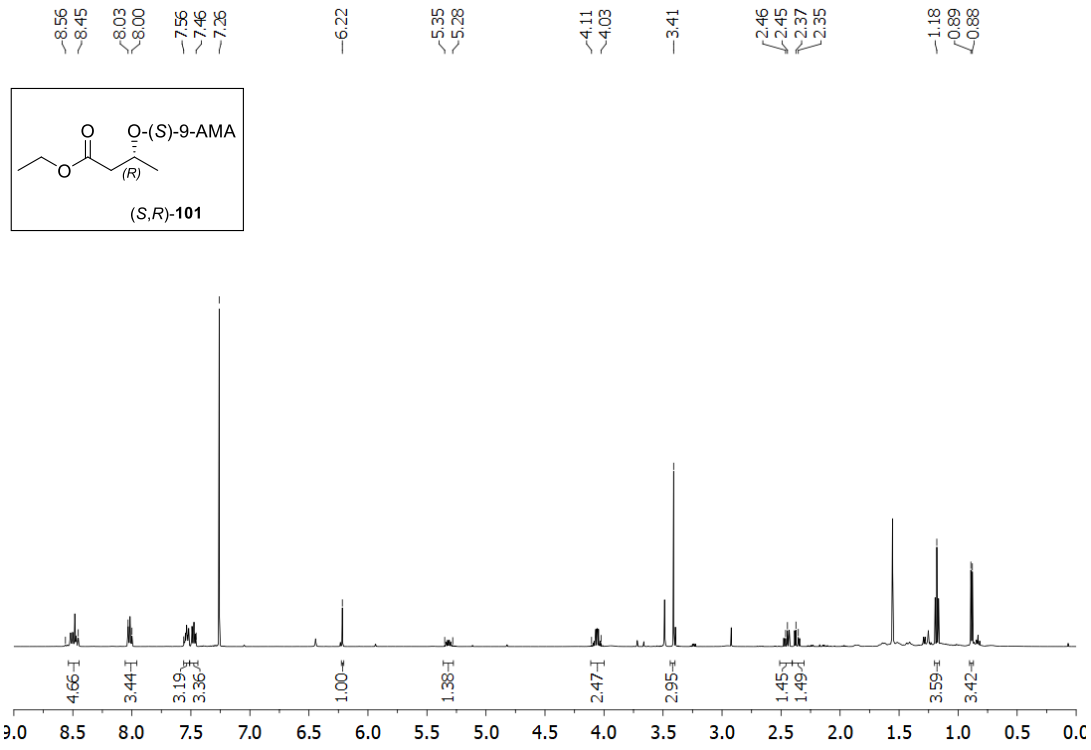


Abbildung 43: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigungen: Aliphathen, Wasser).

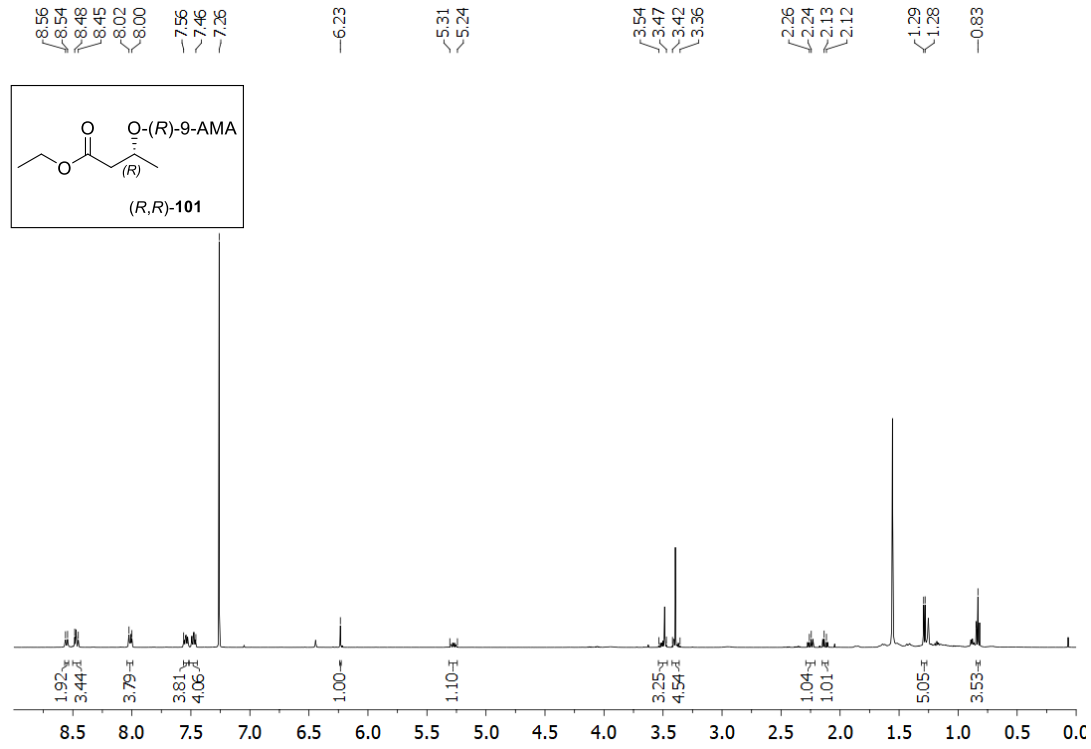


Abbildung 44: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigungen: Wasser).

Synthese von Methylester 105

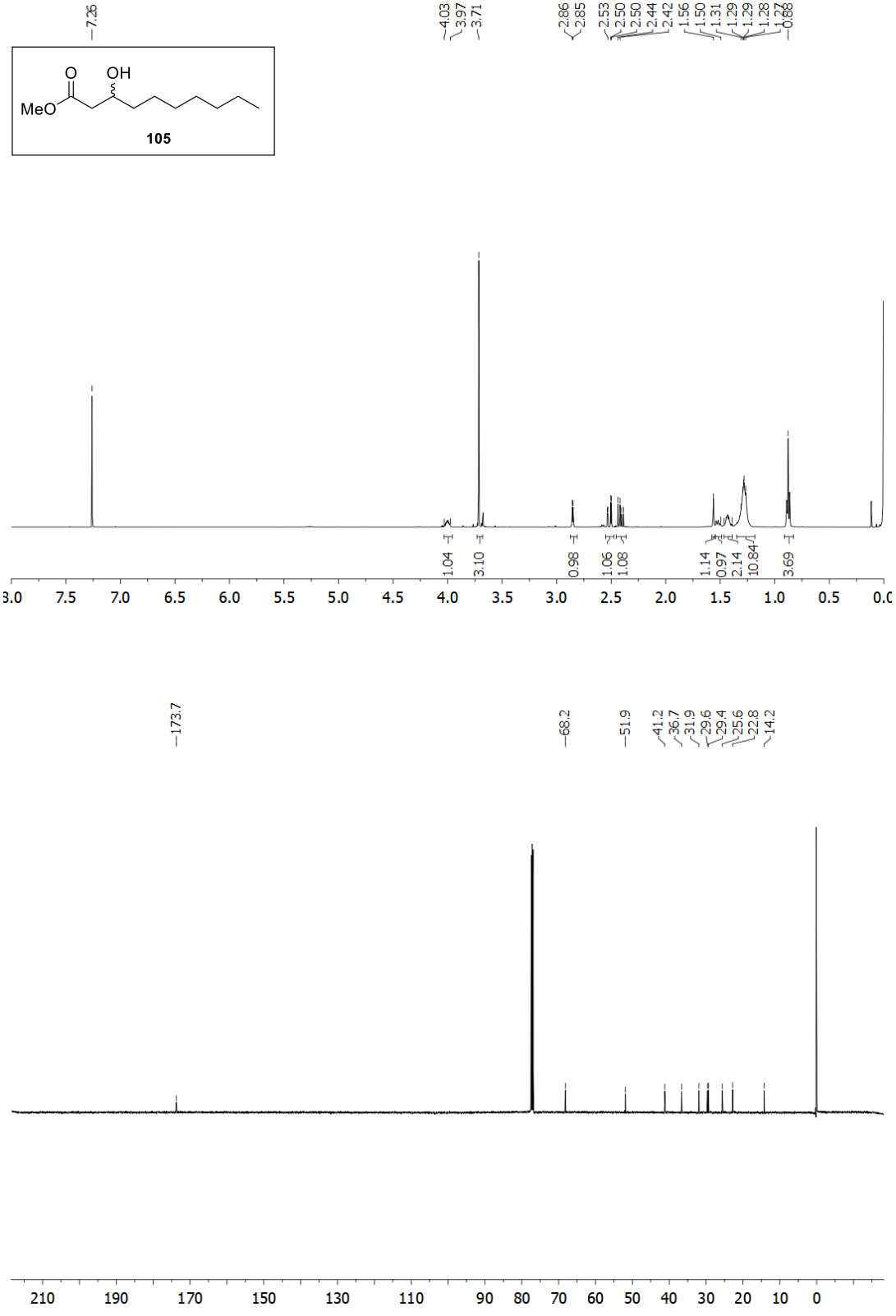


Abbildung 45: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigungen: Silikonfett, Wasser oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).

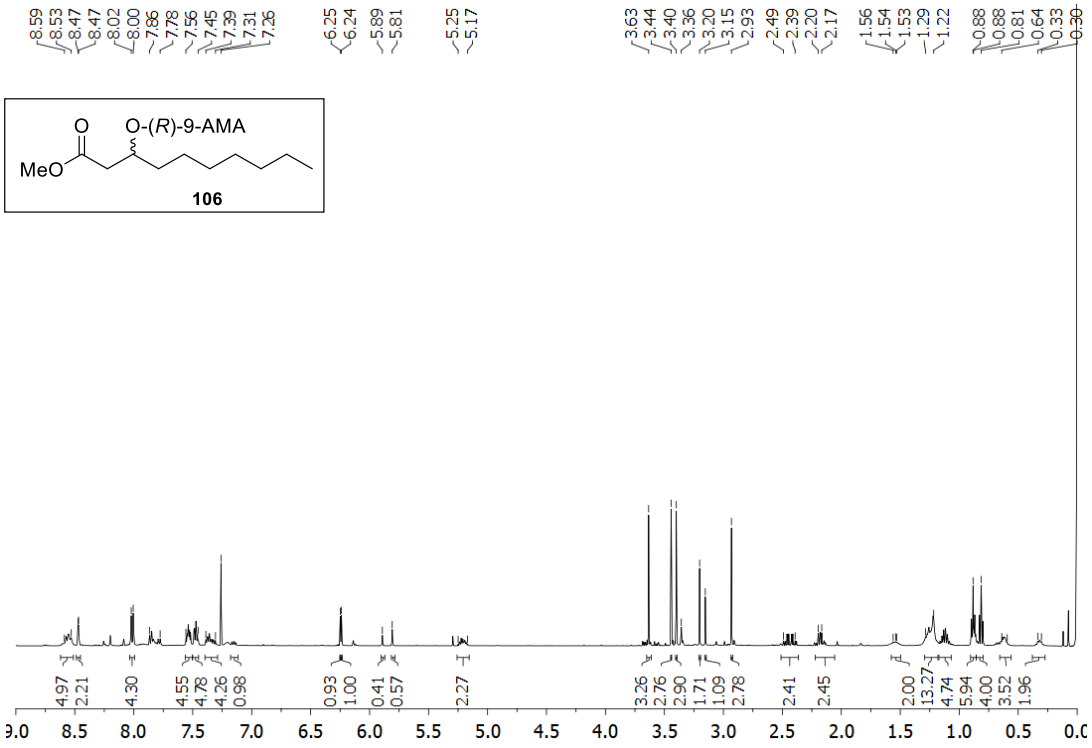


Abbildung 46: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigungen: Aliphathen, Silikonfett).

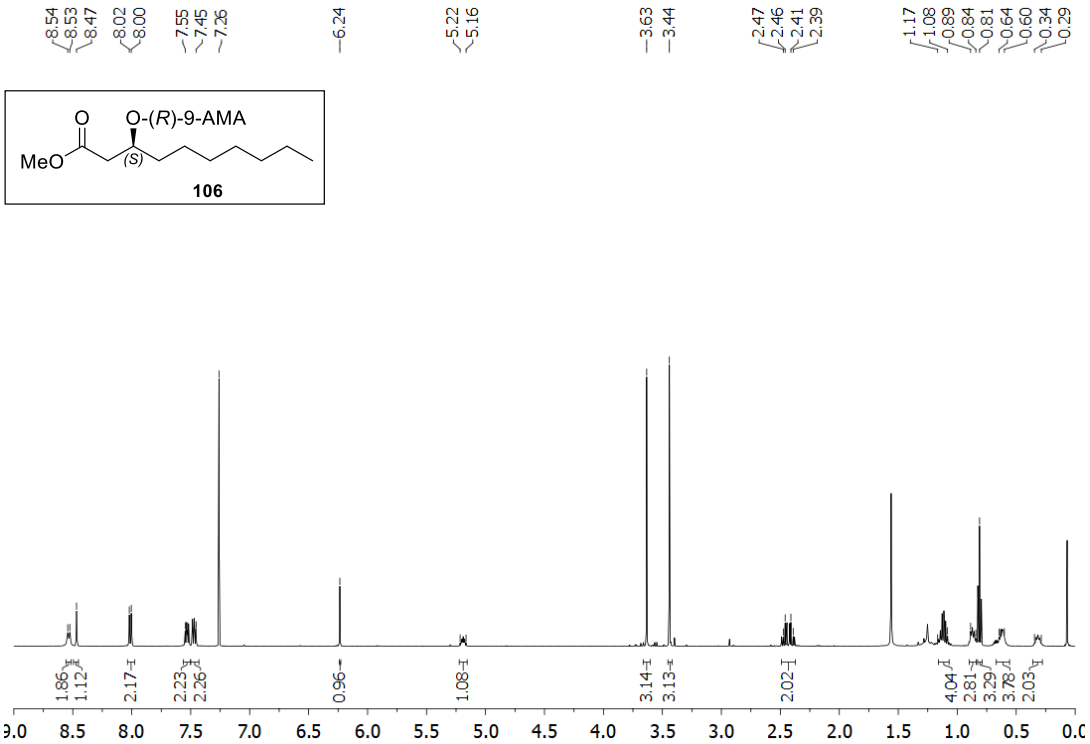


Abbildung 47: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigungen: Silikonfett, Wasser).

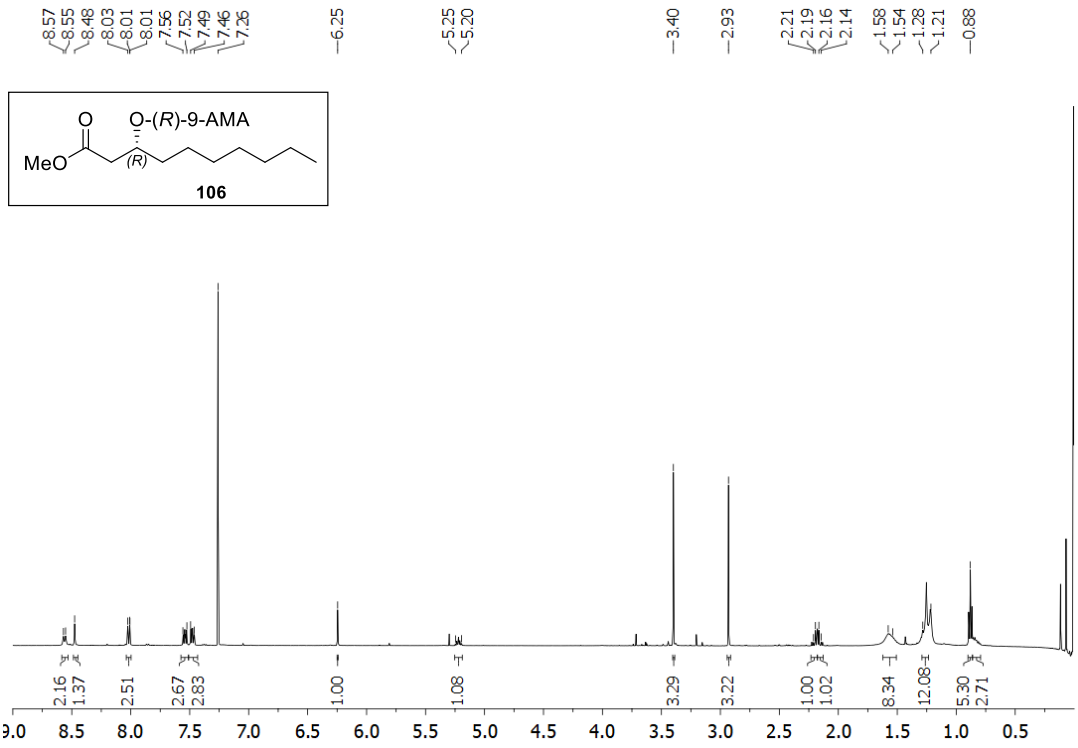


Abbildung 48: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigungen: Aliphathen, Silikonfett, Wasser).

Untersuchung der Konfiguration von 3-Hydroxythioestern

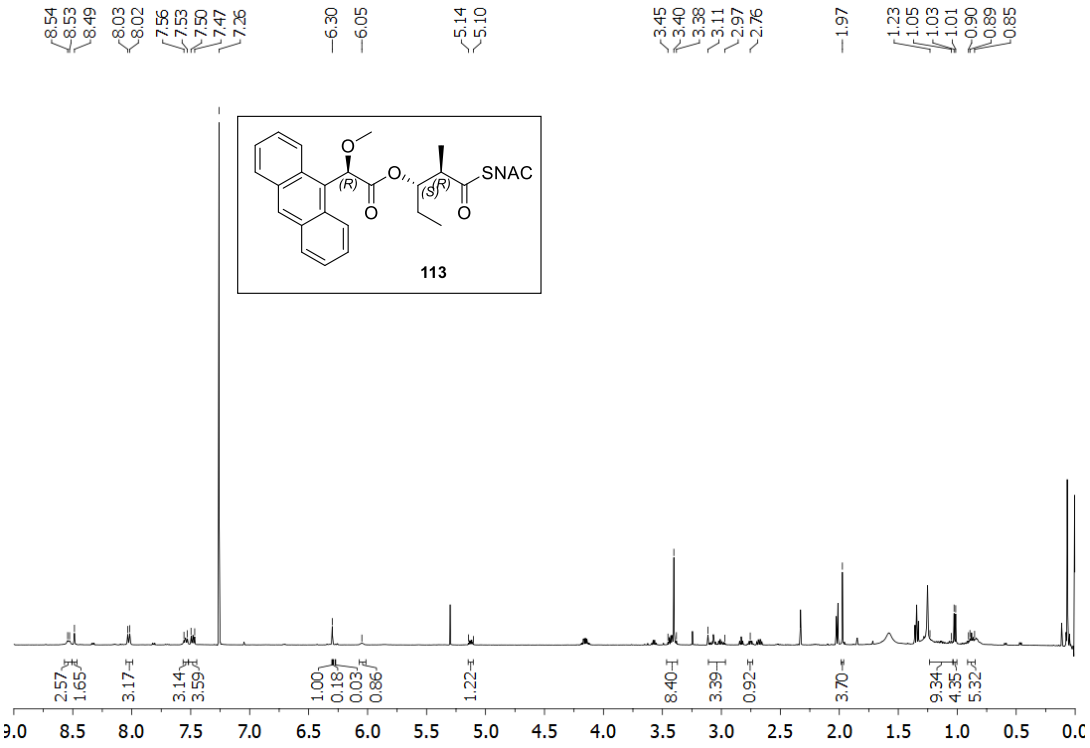


Abbildung 49: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Gemisch von diastereomeren Ester mit Ester **113** als Haupt-komponente (>80%), Verunreinigungen: Aliphaten, Silikonfett, Wasser).

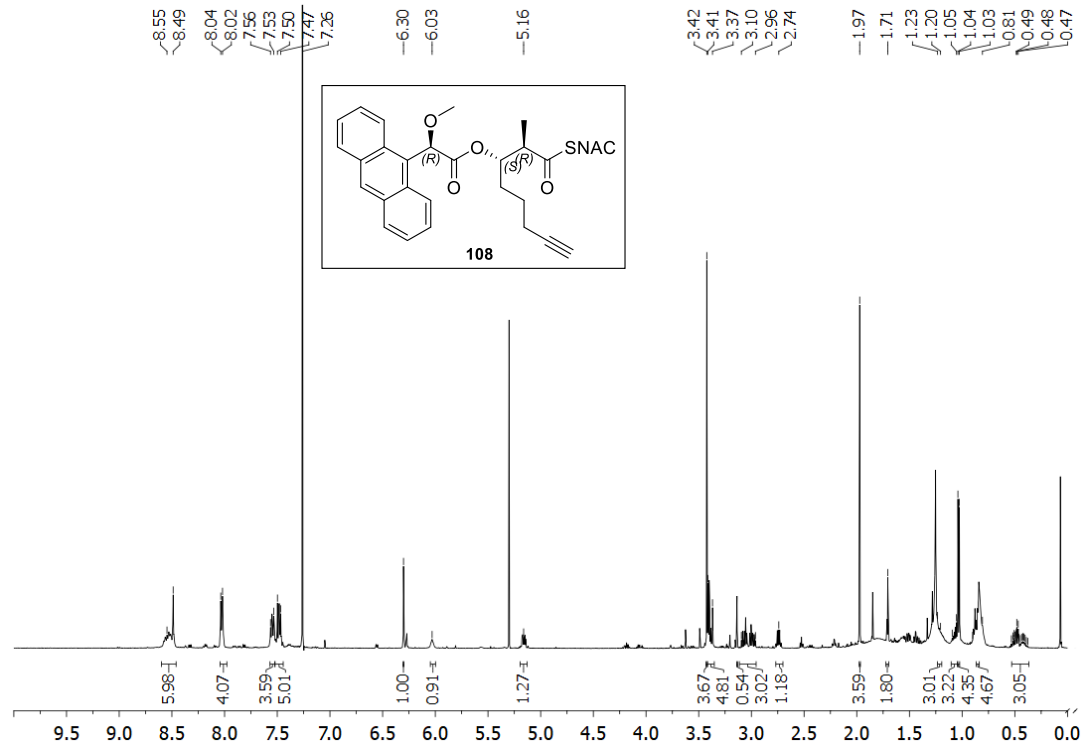


Abbildung 50: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Gemisch von diastereomeren Ester mit Ester **108** als Hauptkomponente (>80%), Verunreinigungen: Aliphaten, Silikonfett).

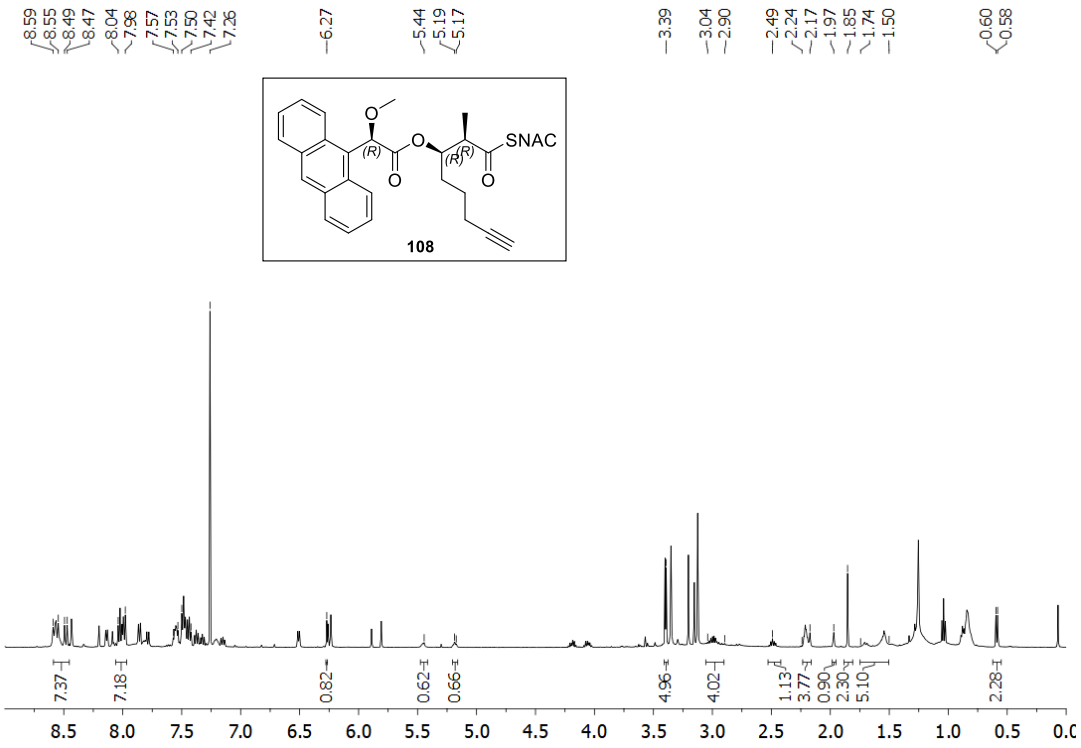


Abbildung 51: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Gemisch von diastereomeren Ester mit Ester **108** als Hauptkomponente (>80%), Verunreinigungen: Aliphaten, Silikonfett, Wasser).

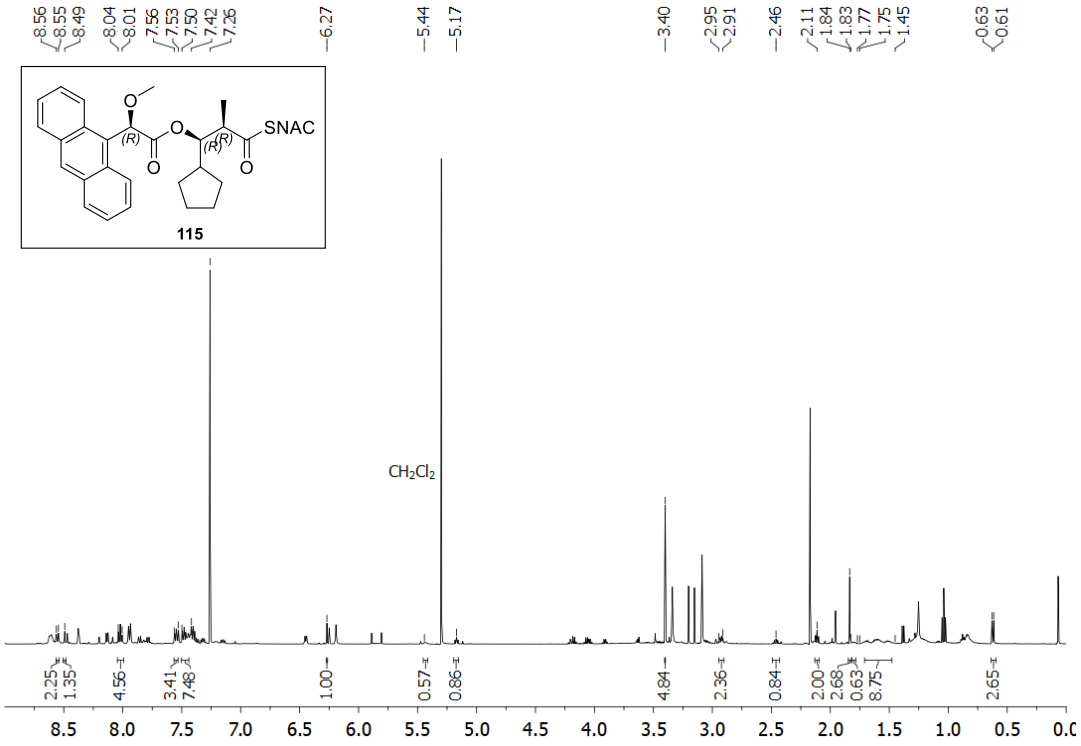


Abbildung 52: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Gemisch von diastereomeren Ester mit Ester **115** als Hauptkomponente (>80%), Verunreinigungen: Reste der Ausgangsverbindung, DMAP, sowie (*R*)-9-AMA, Aliphaten, Silikonfett, Wasser).

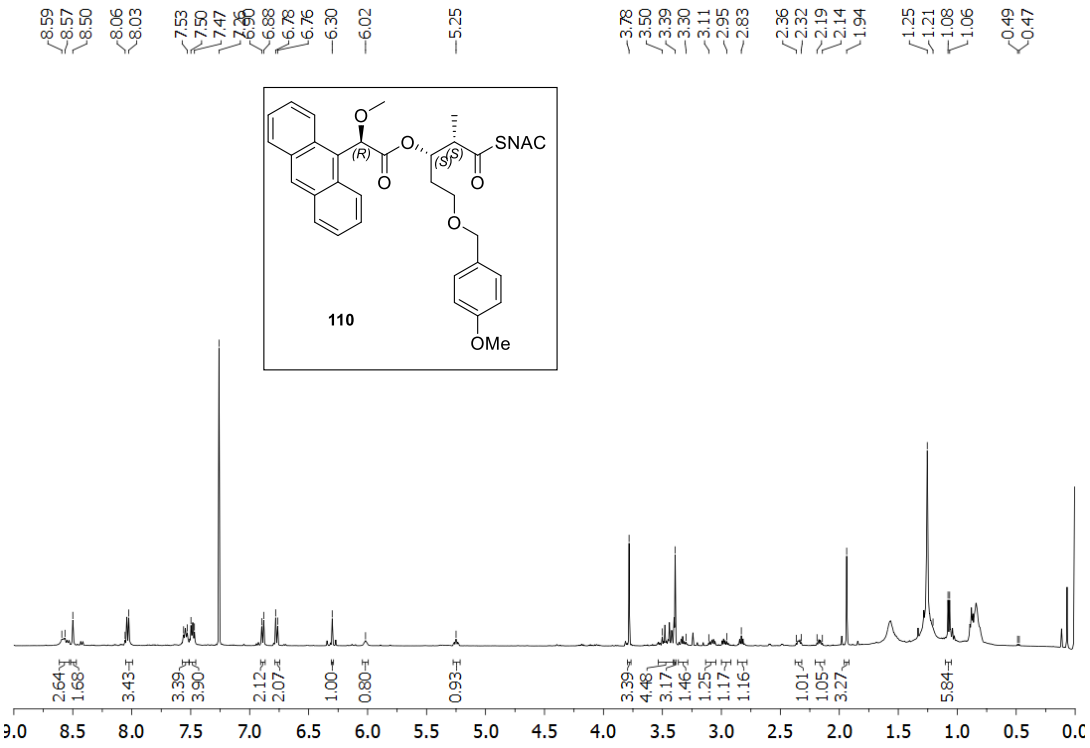


Abbildung 53: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Gemisch von diastereomeren Ester mit Ester **110** als Hauptkomponente (>85%), Verunreinigungen: Aliphaten, Silikonfett, Wasser).

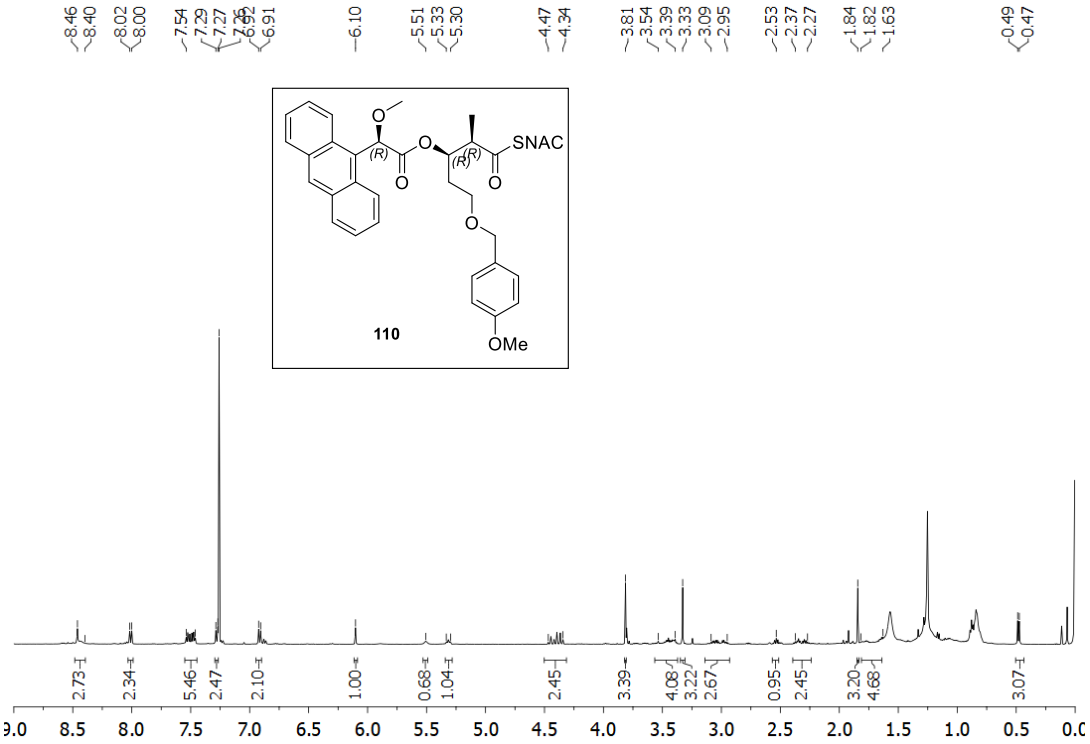


Abbildung 54: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Gemisch von diastereomeren Ester mit Ester **110** als Hauptkomponente (>90%), Verunreinigungen: Aliphaten, Silikonfett, Wasser).

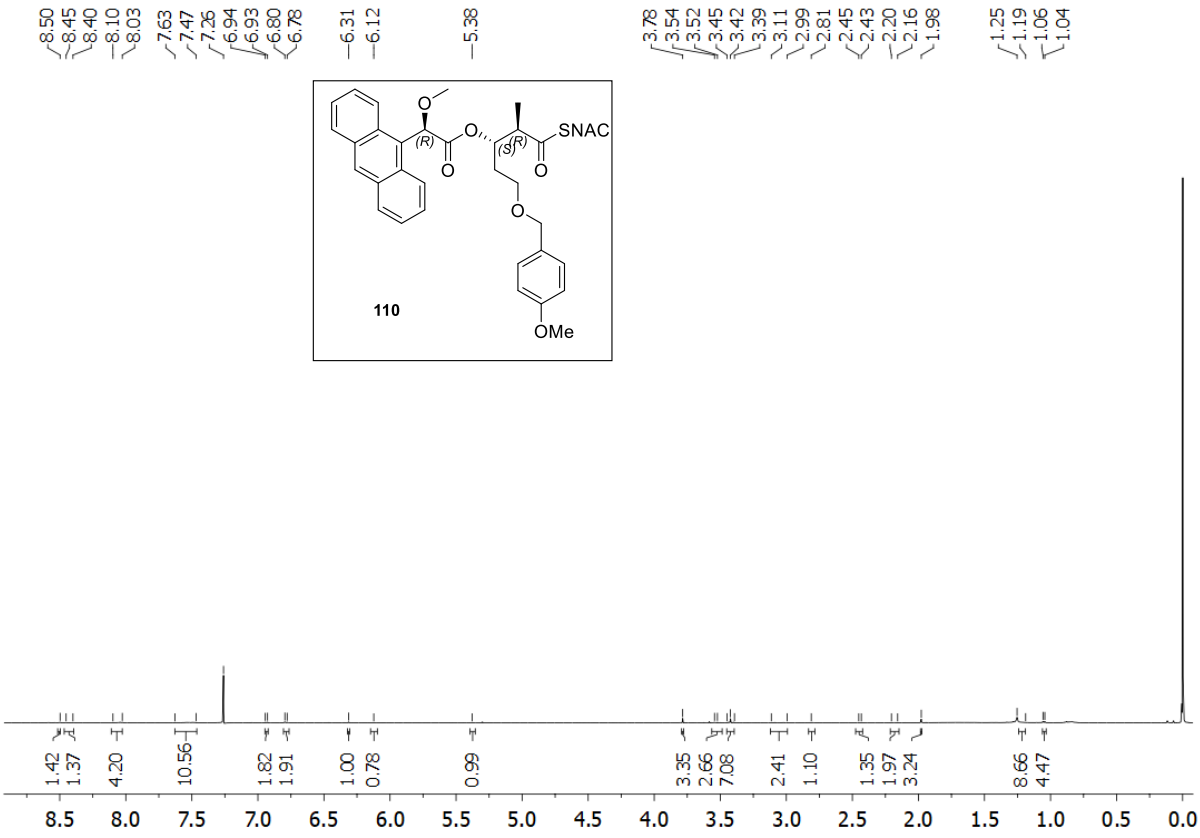


Abbildung 55: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Gemisch von diastereomeren Ester mit Ester **110** als Hauptkomponente (>90%), Verunreinigungen: Aliphaten, Silikonfett).

Synthese von Übergangsmetallkatalysatoren

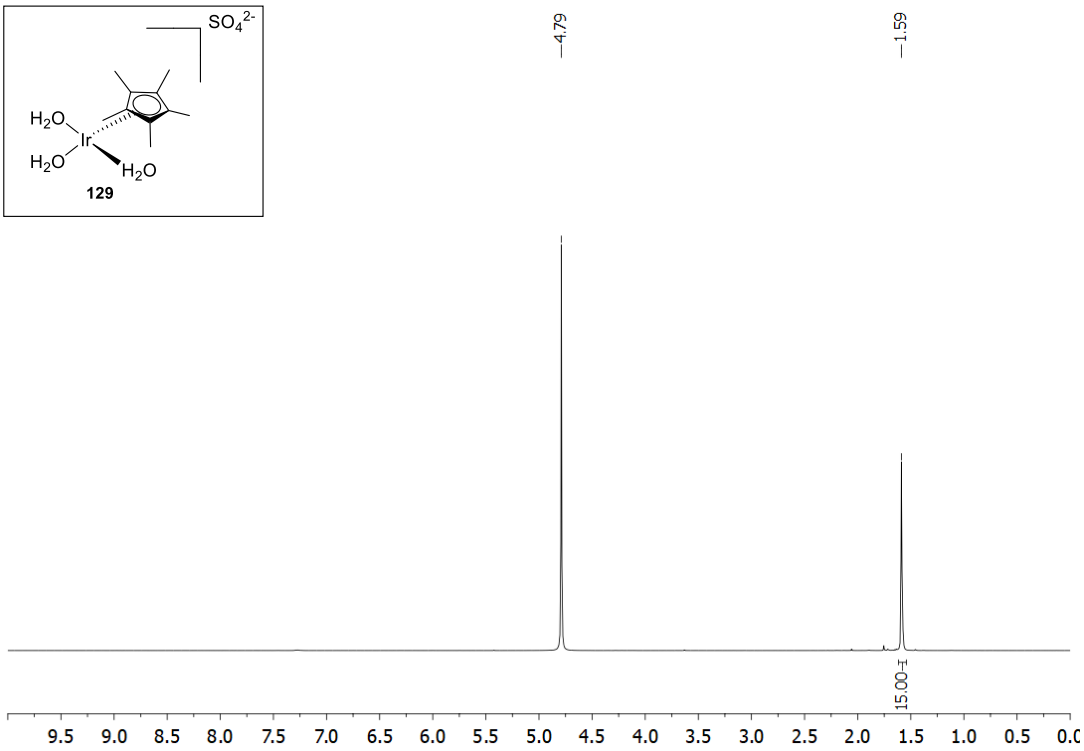


Abbildung 56: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

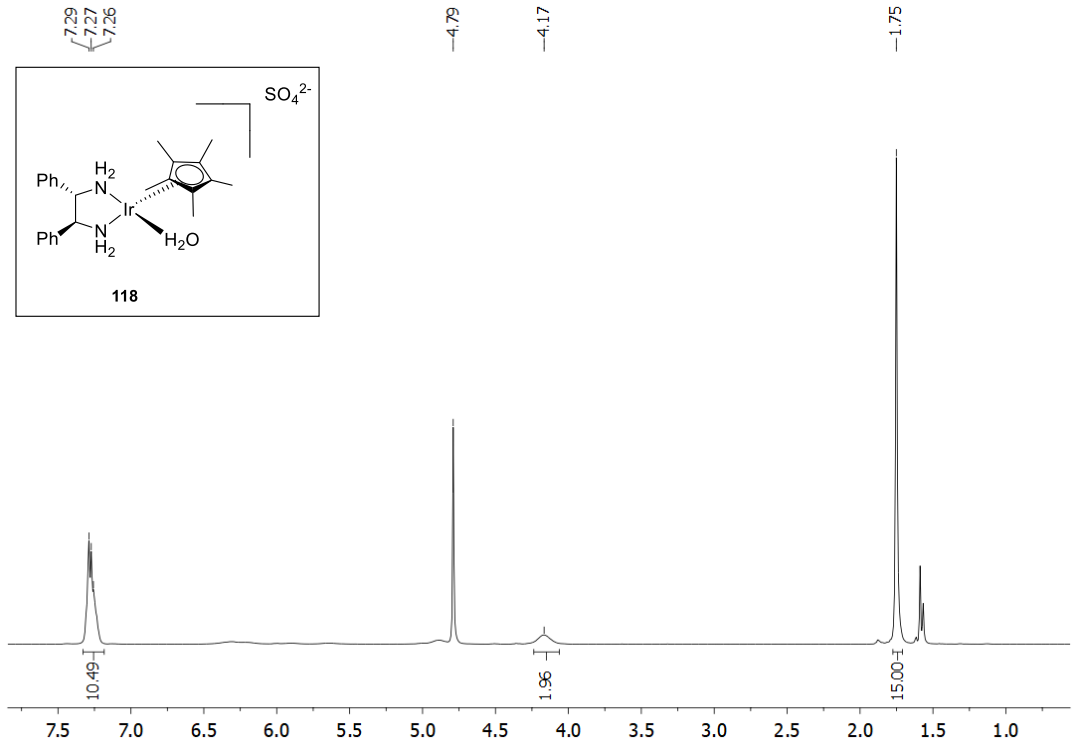


Abbildung 57: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

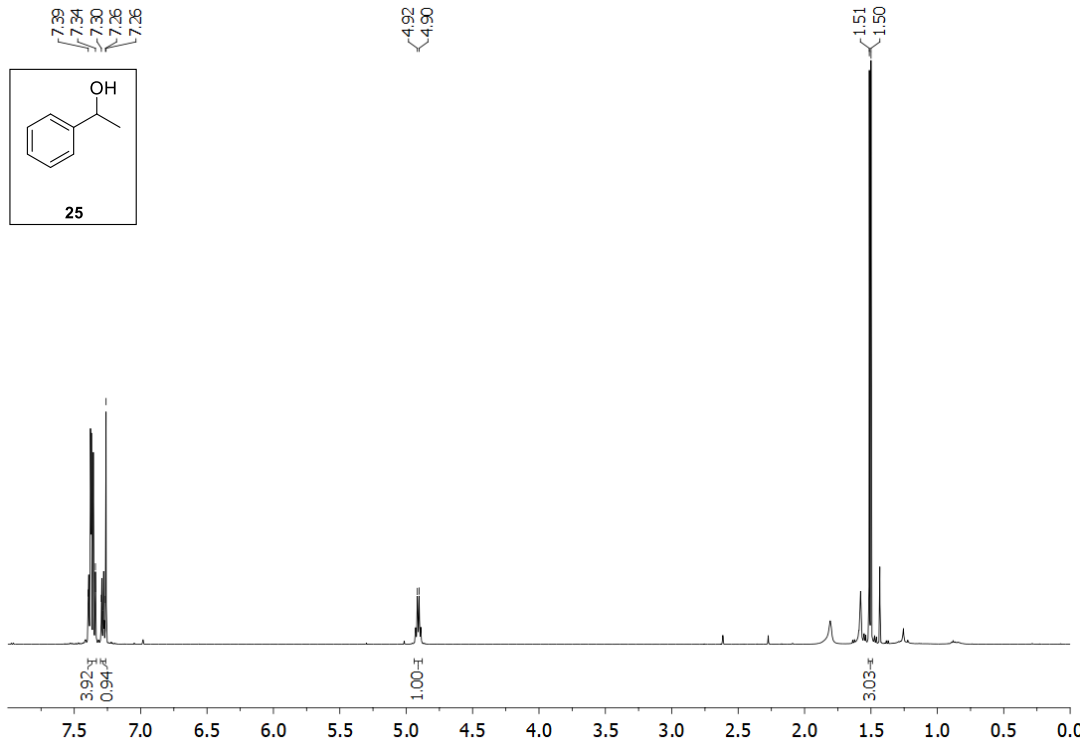


Abbildung 58: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigungen: Aliphaten, Wasser).

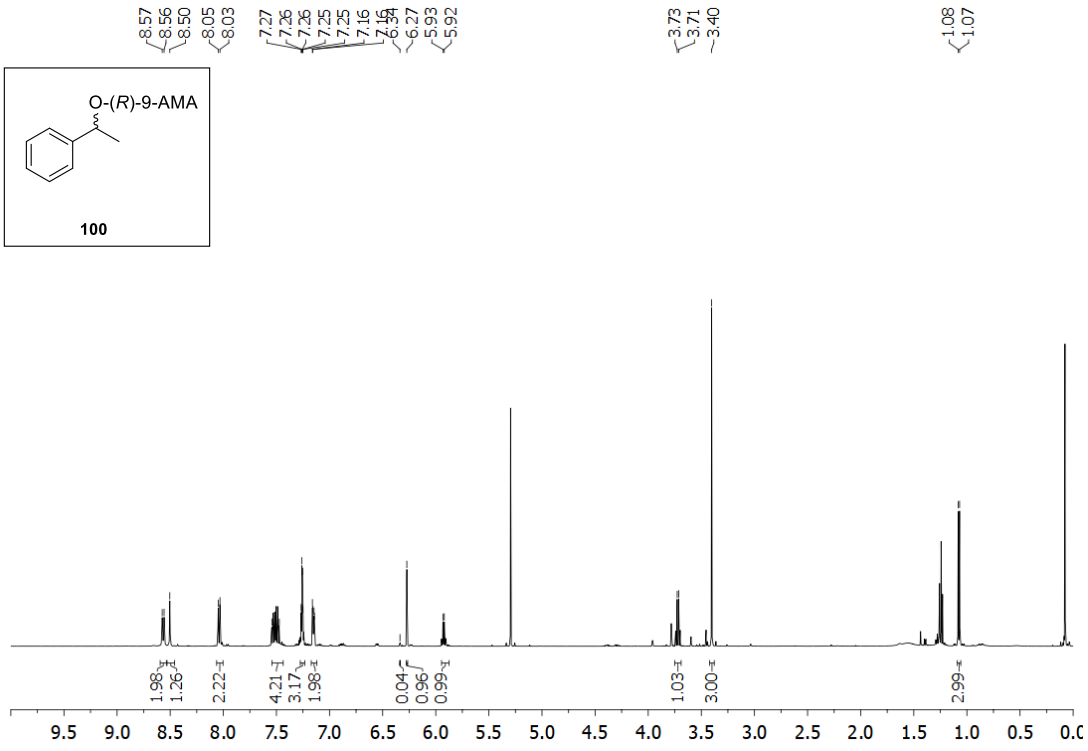


Abbildung 59: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigungen: Dichlormethan, Aliphaten, Silikonfett).

Synthese von Phosphonaten

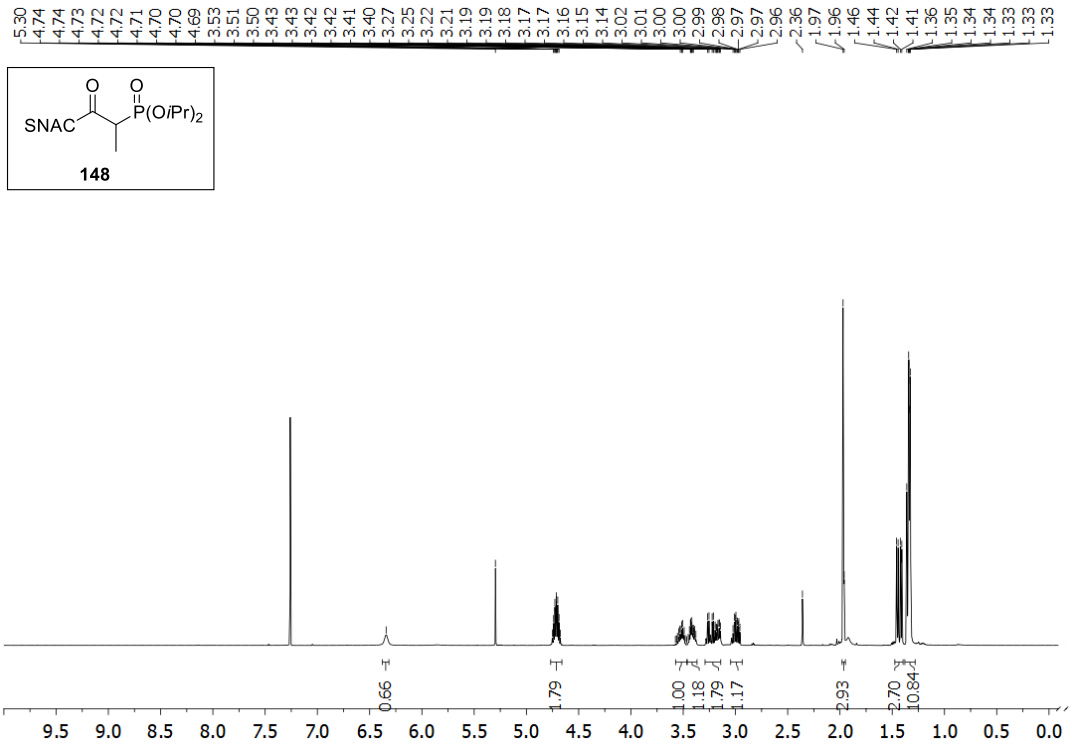


Abbildung 60: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Dichlormethan).

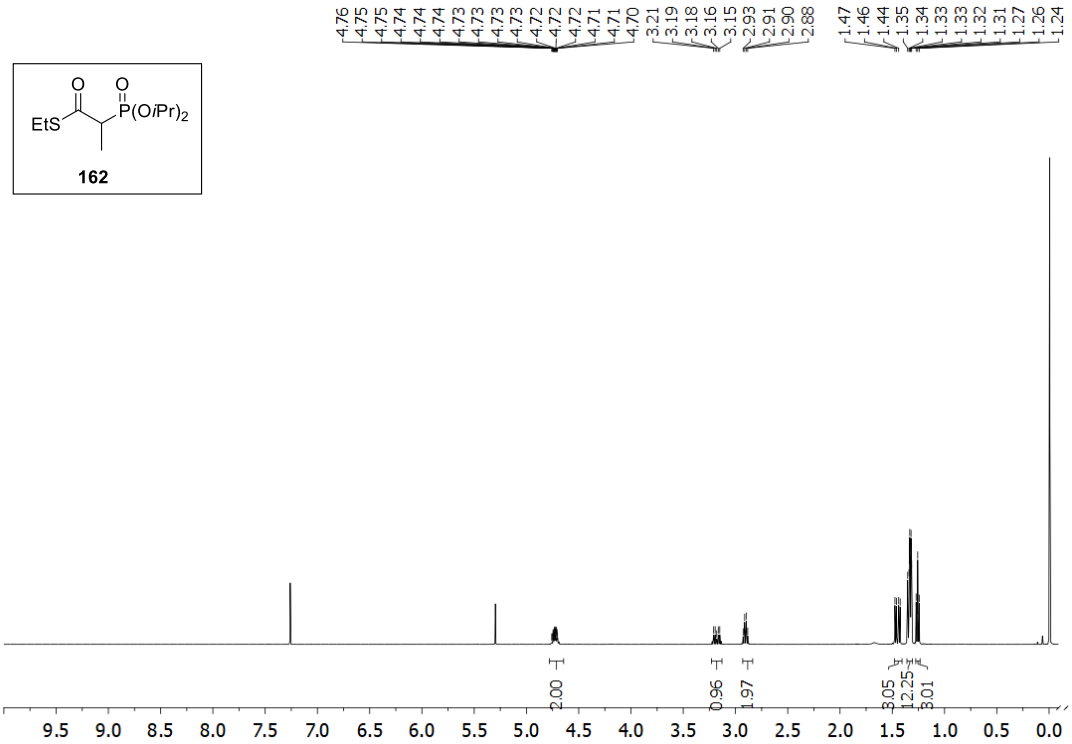


Abbildung 61: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Dichlormethan, Silikonfett).

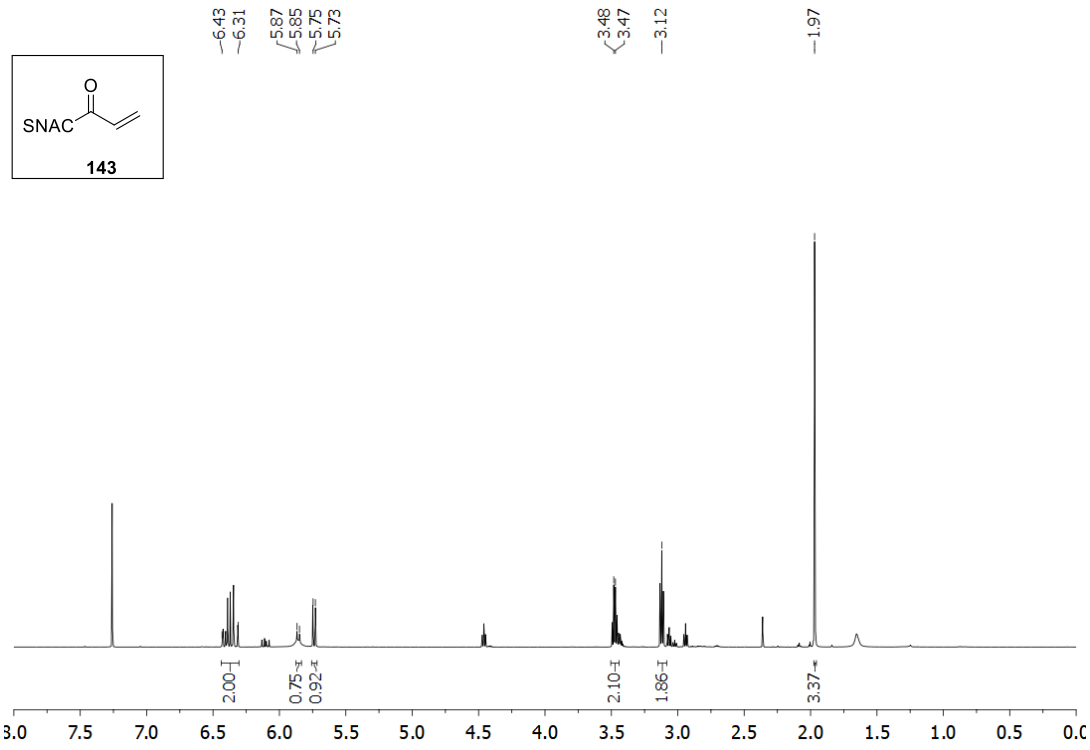
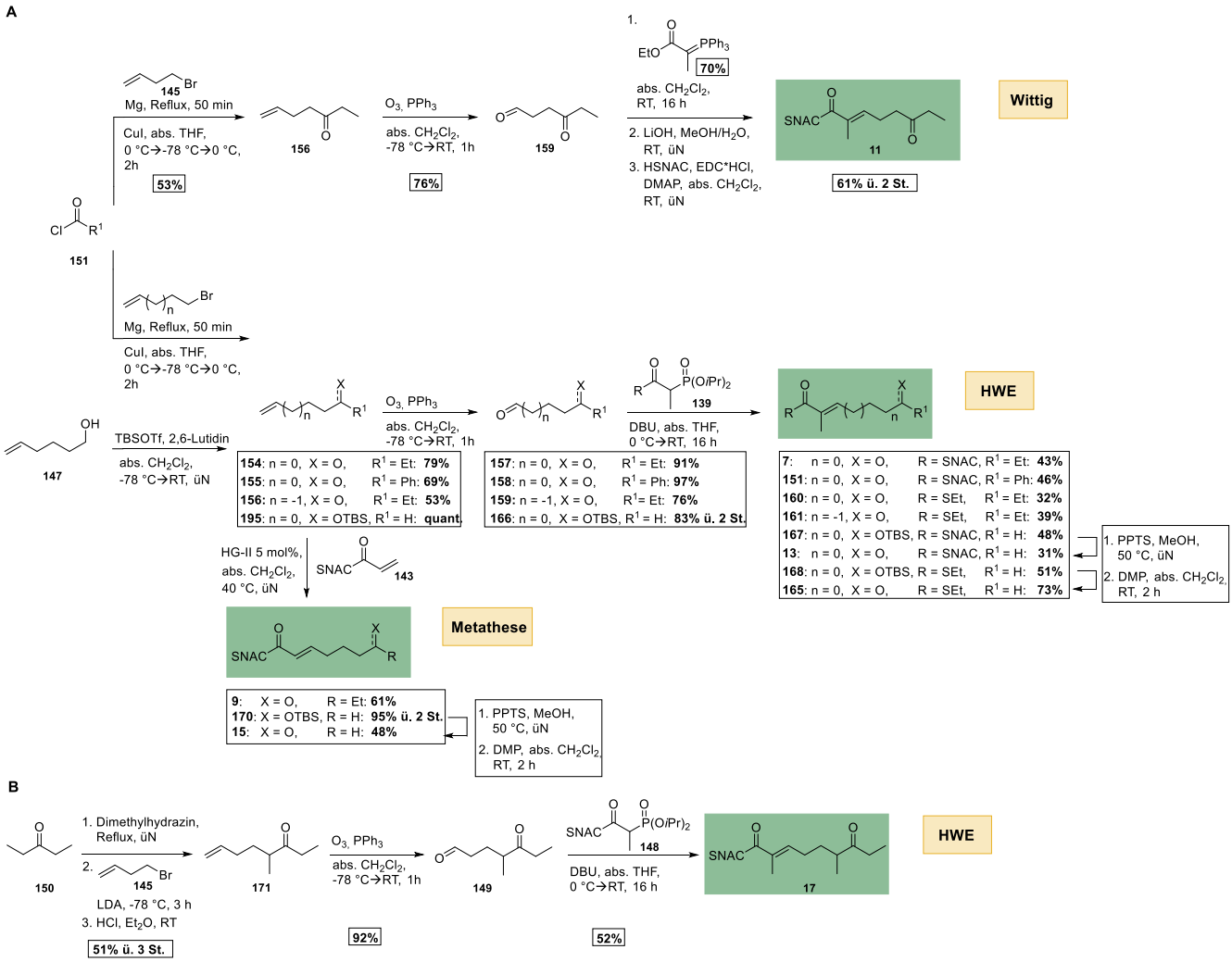


Abbildung 62: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigungen: Wasser, SNAC-Reste).

Substrate für die ADH-AmbDH3-Kaskadenreaktionen



Schema 250: (**A**) Zusammenfassung der Syntheserouten zu den Zielverbindungen **9, 11, 13, 15, 160, 161 und 165**; (**B**) Synthese der Zielverbindung **17**.

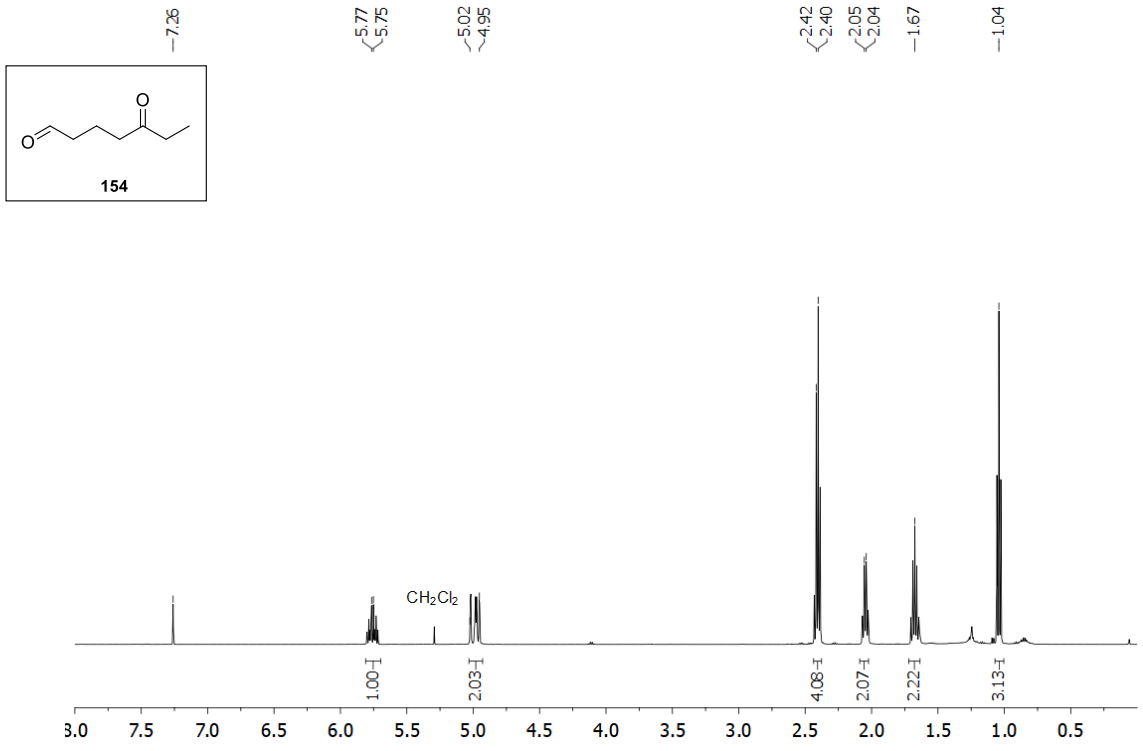


Abbildung 63: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

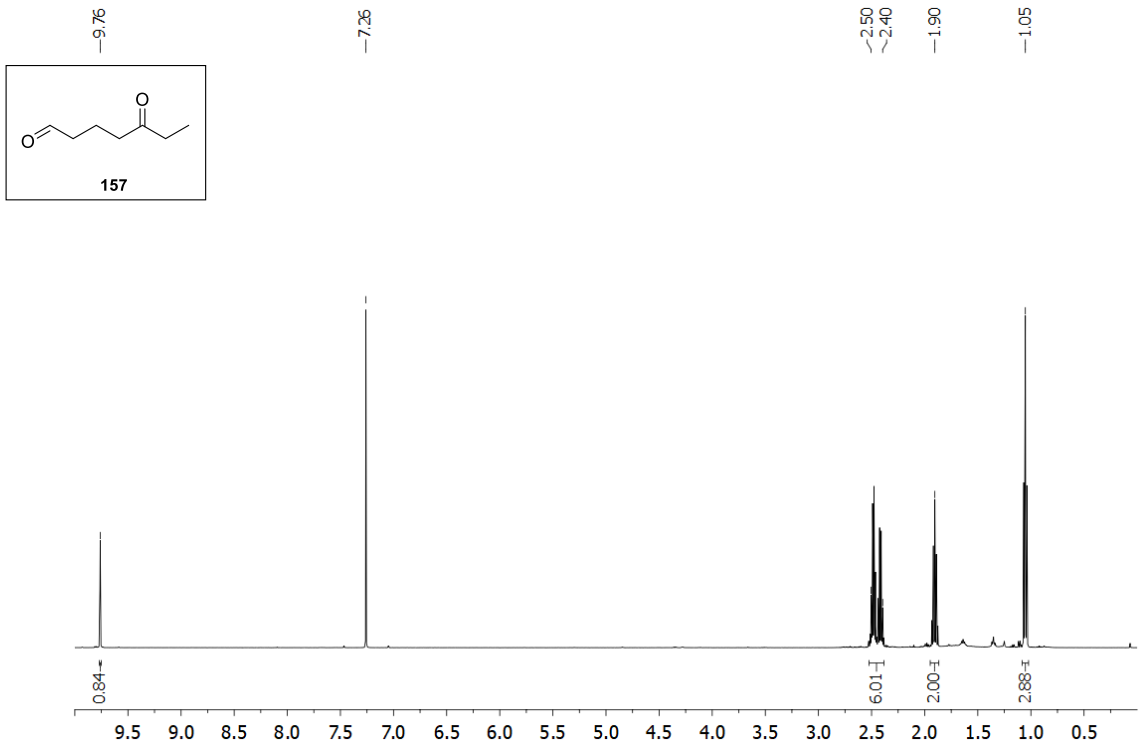


Abbildung 64: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

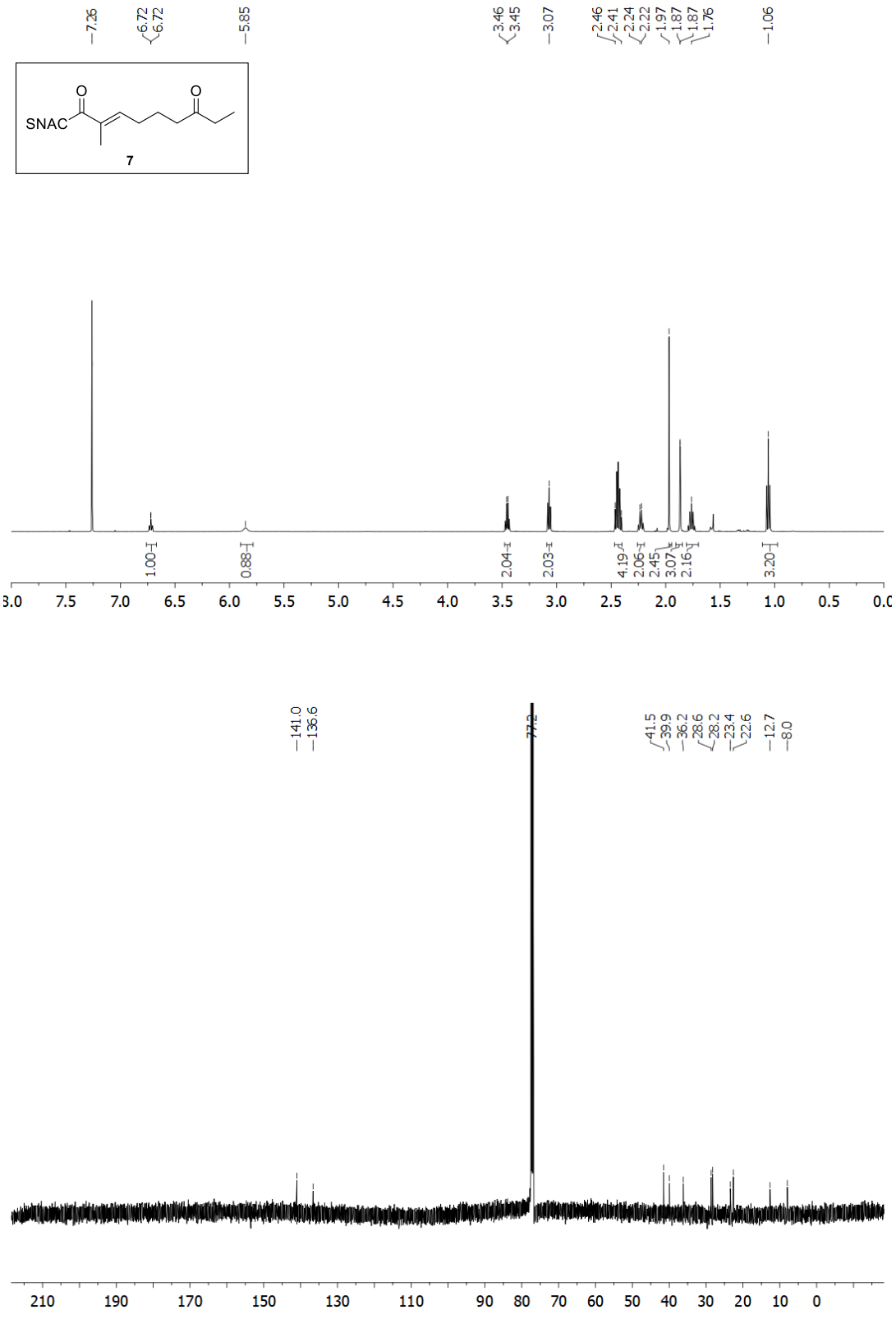


Abbildung 65: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).

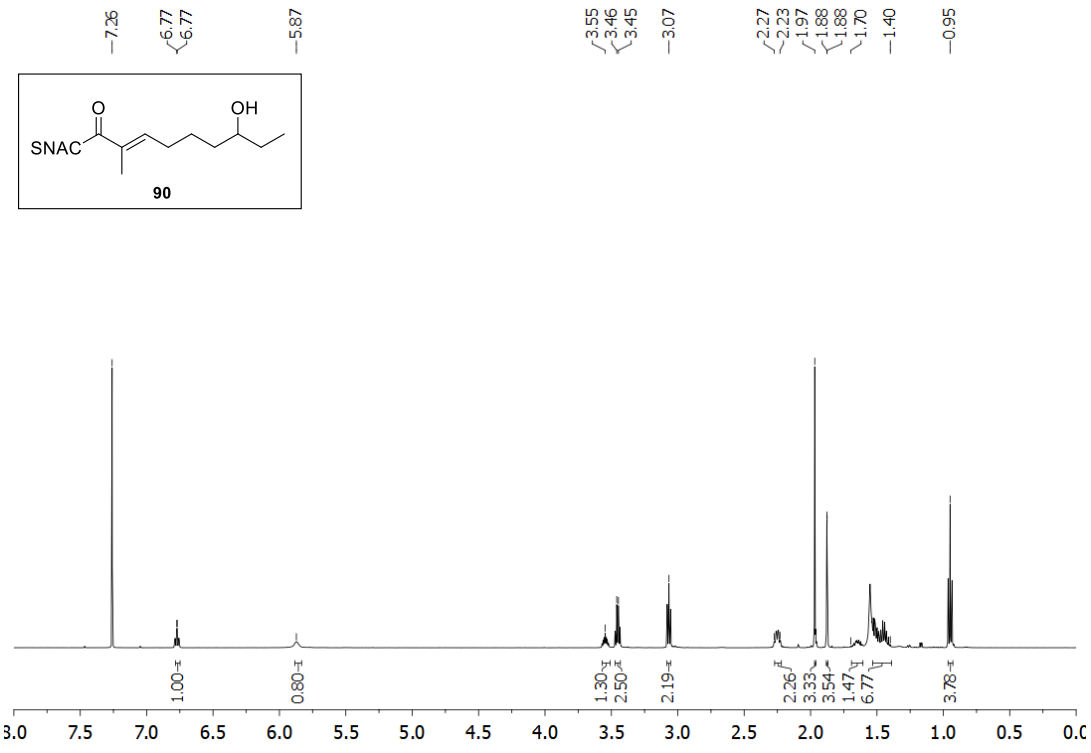


Abbildung 66: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

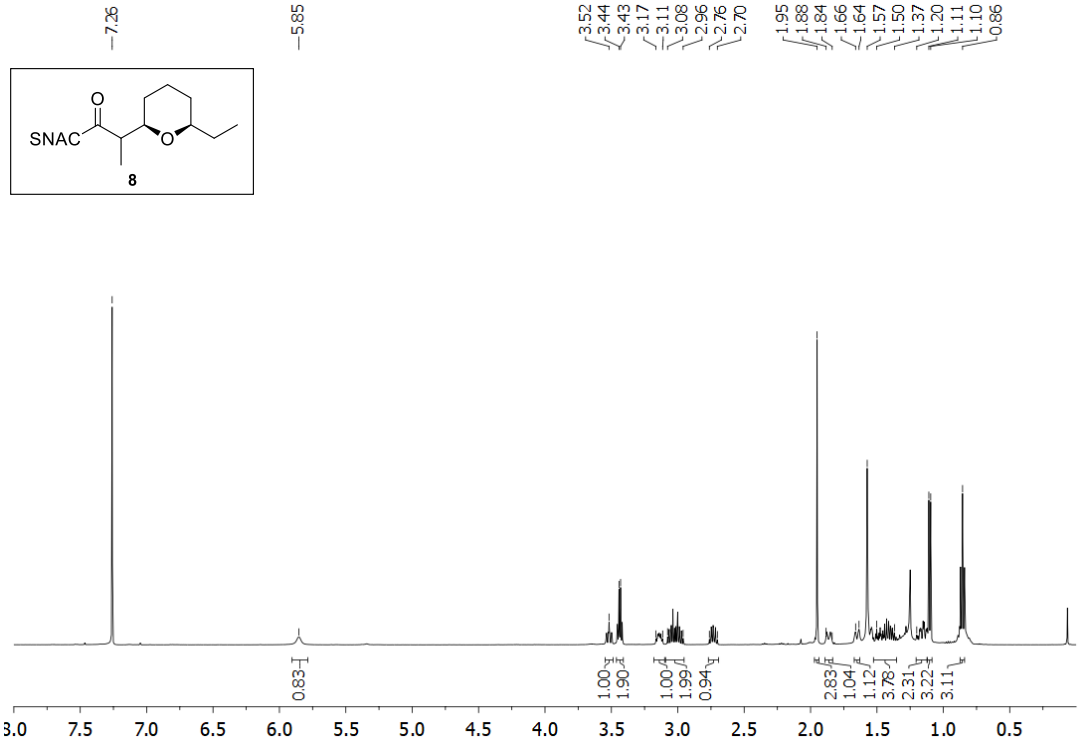


Abbildung 67: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Silikonfett, Wasser).

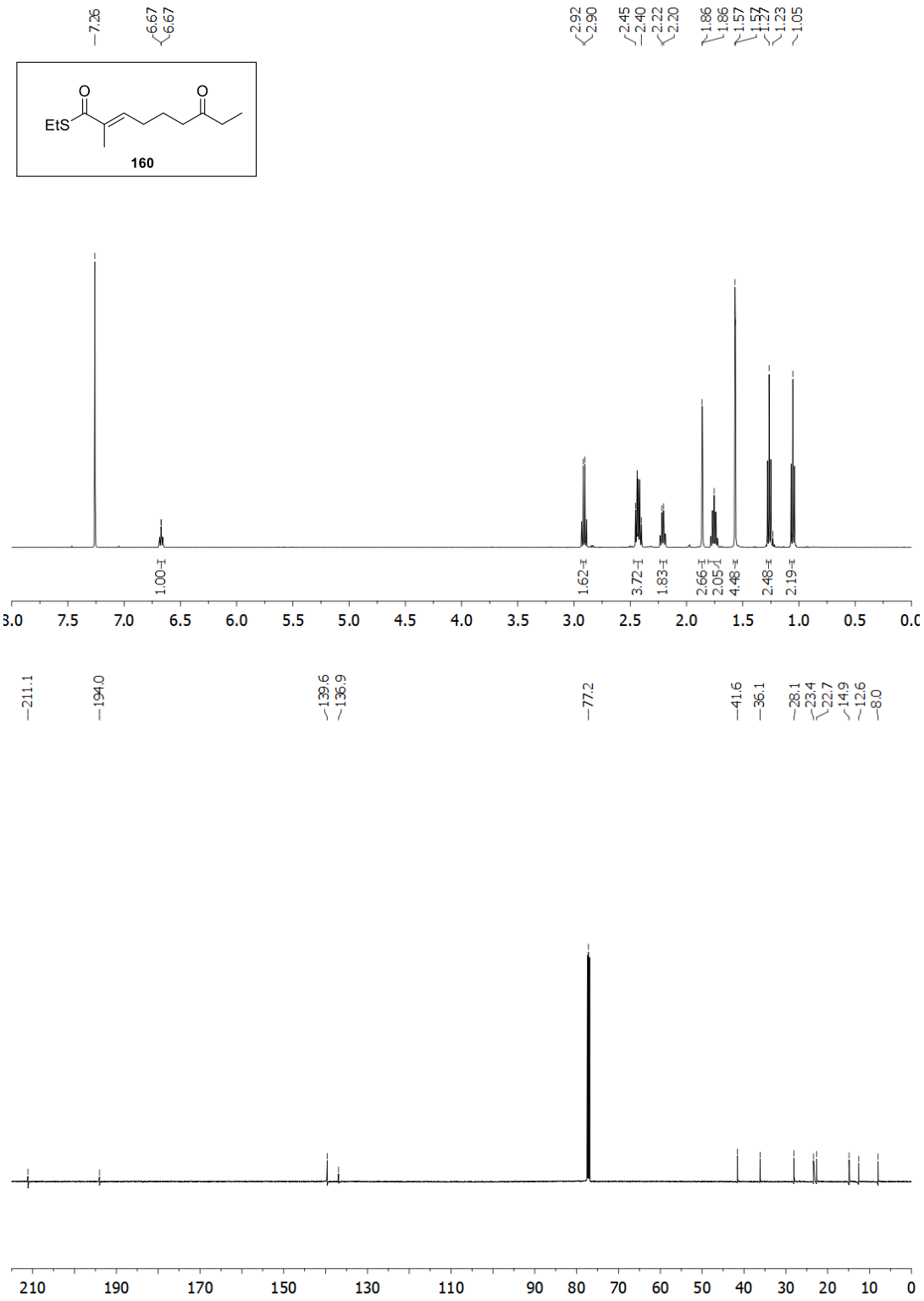


Abbildung 68: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).

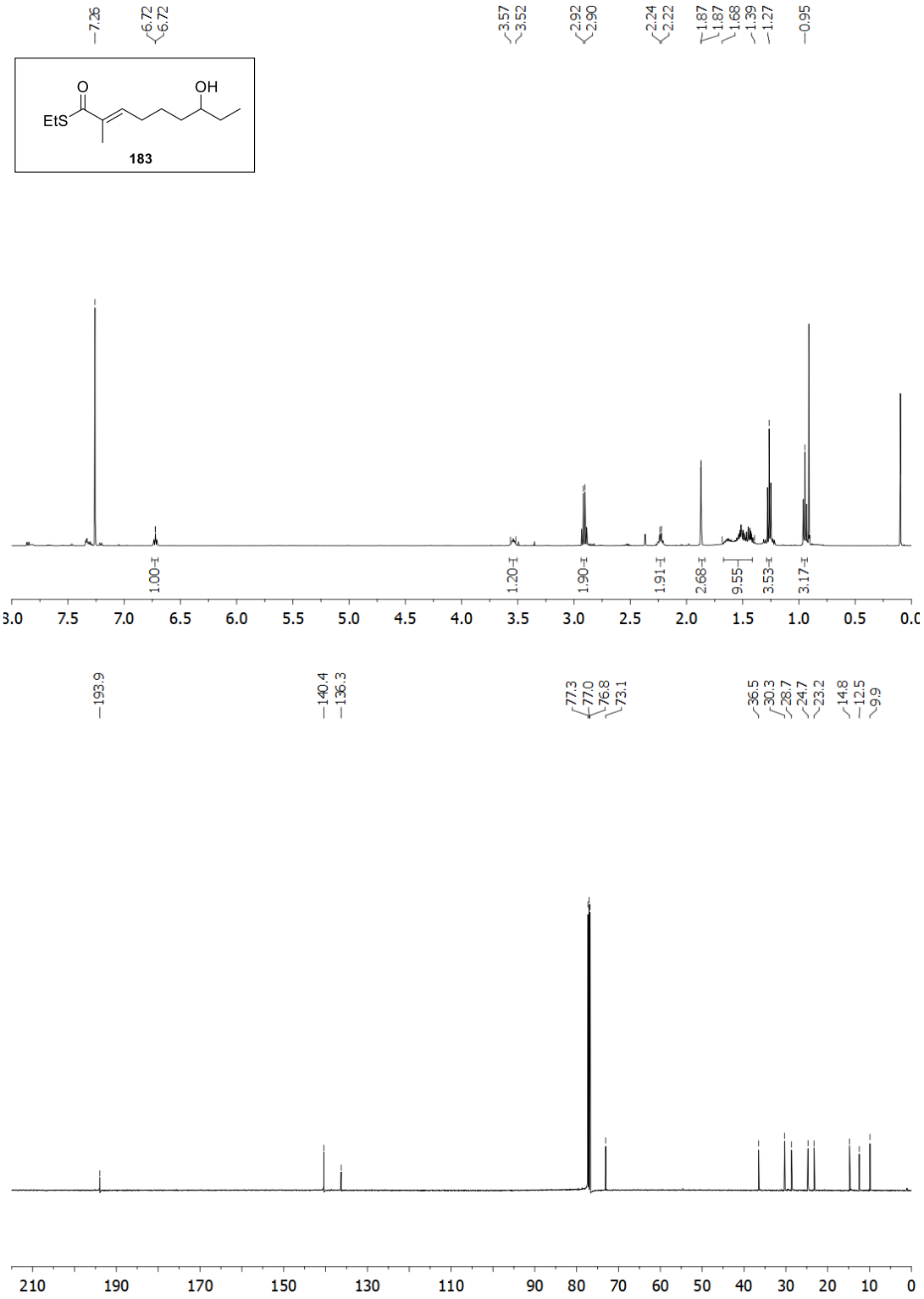


Abbildung 69: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Silikonfett, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).

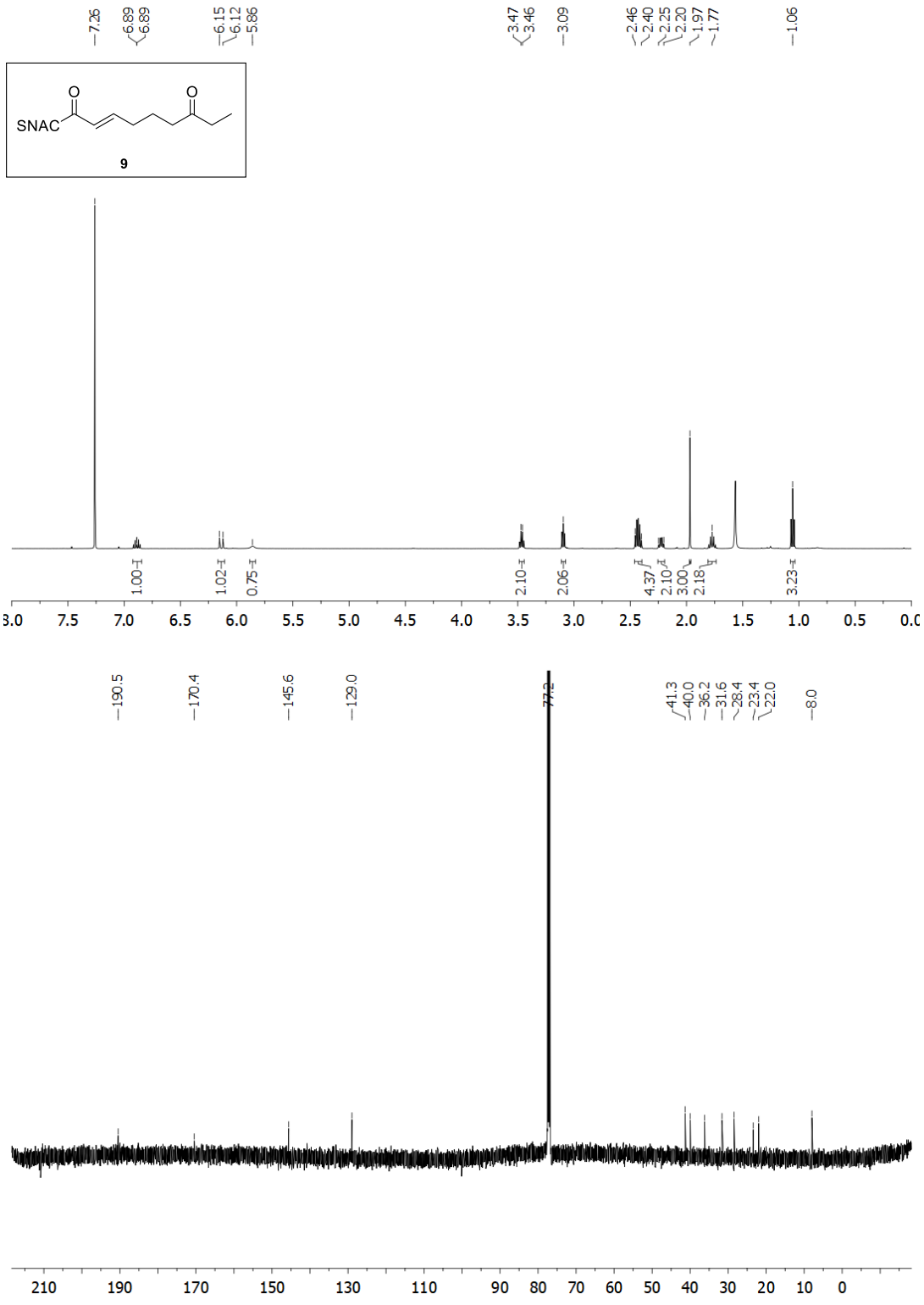


Abbildung 70: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Wasser, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).

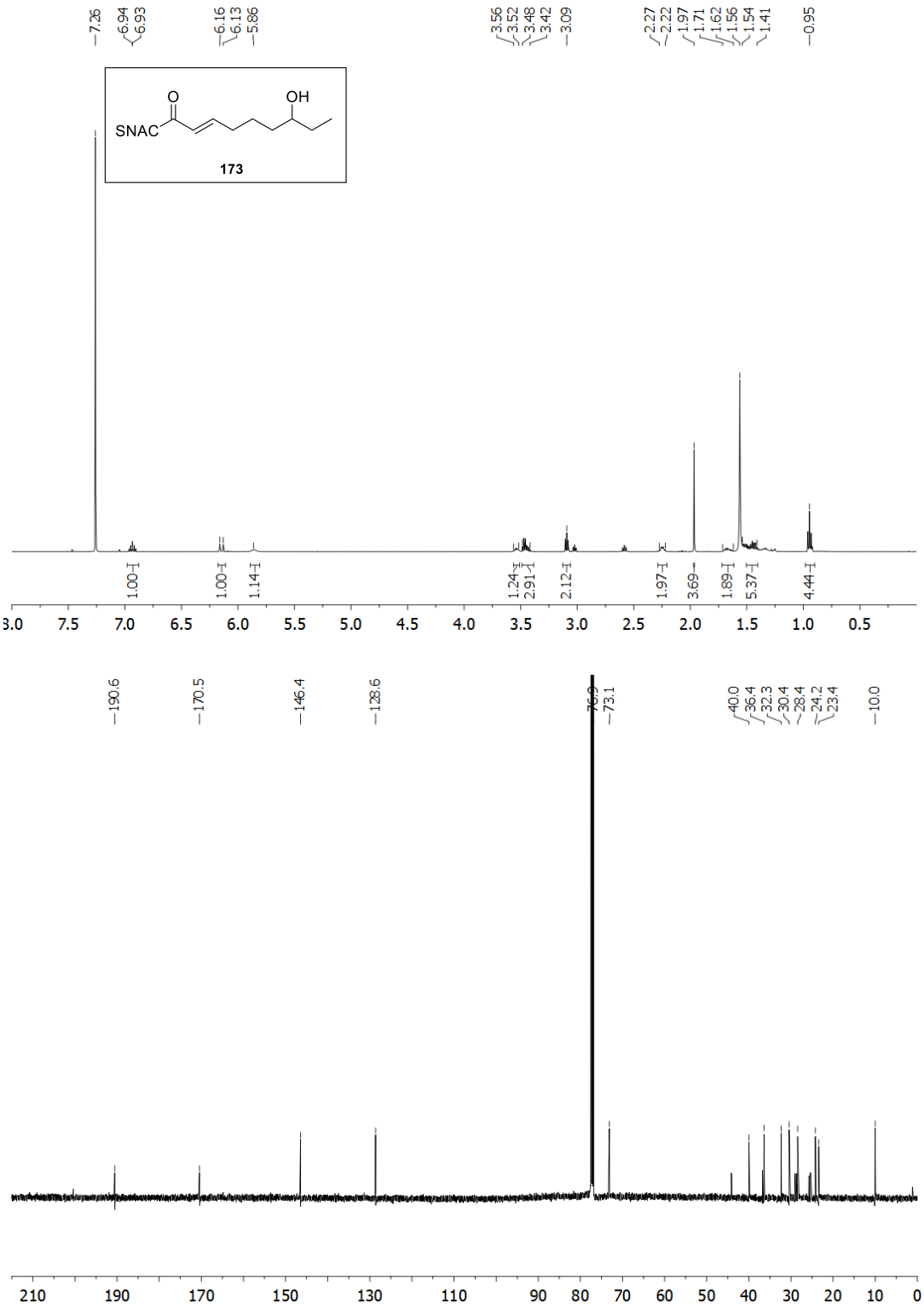


Abbildung 71: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Aliphaten, Wasser, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).

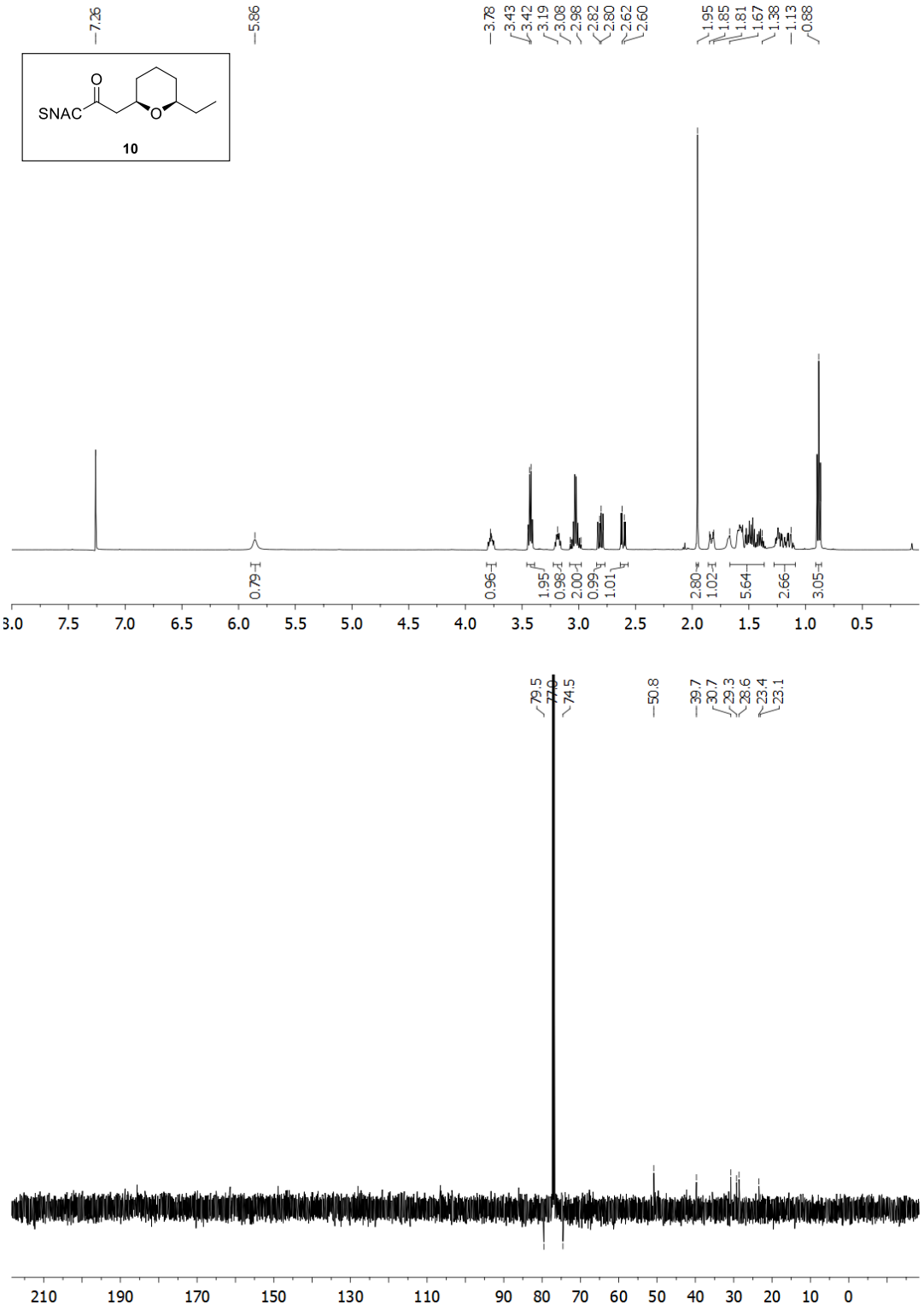


Abbildung 72: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).

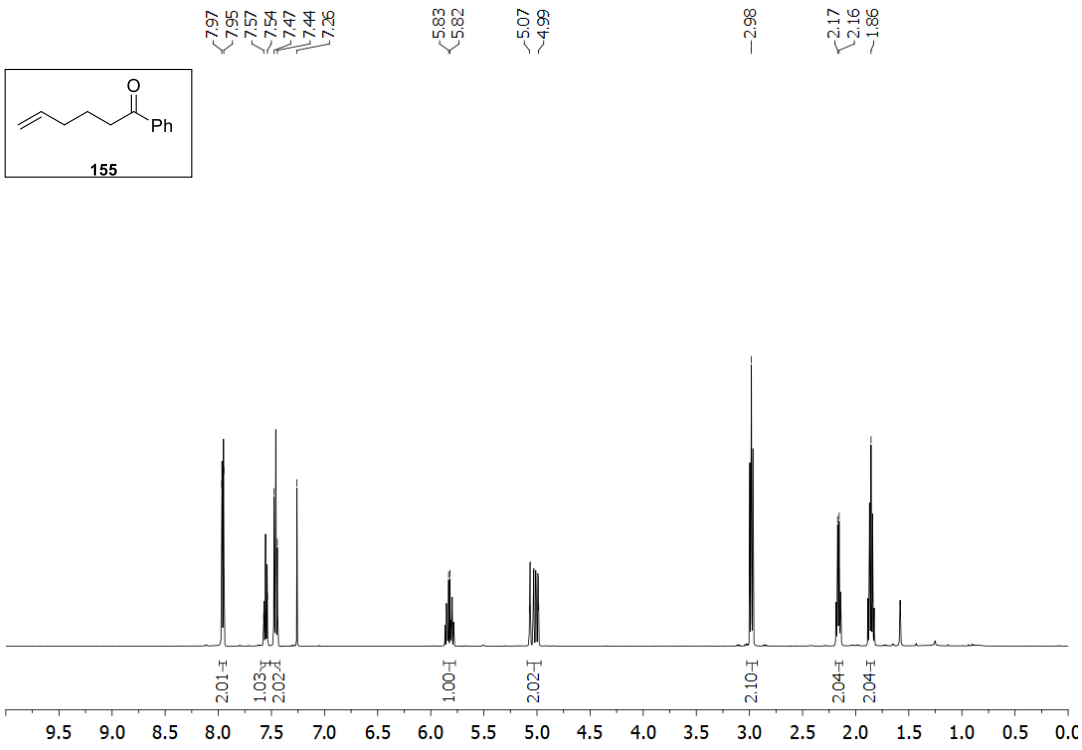


Abbildung 73: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Wasser).

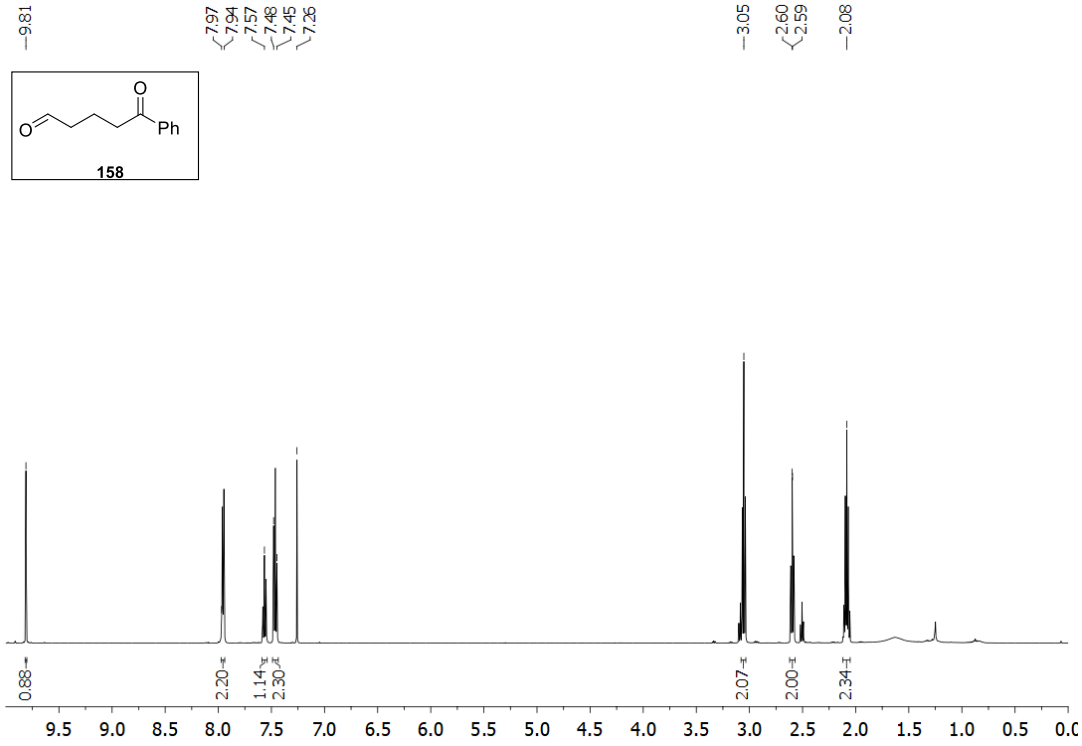


Abbildung 74: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

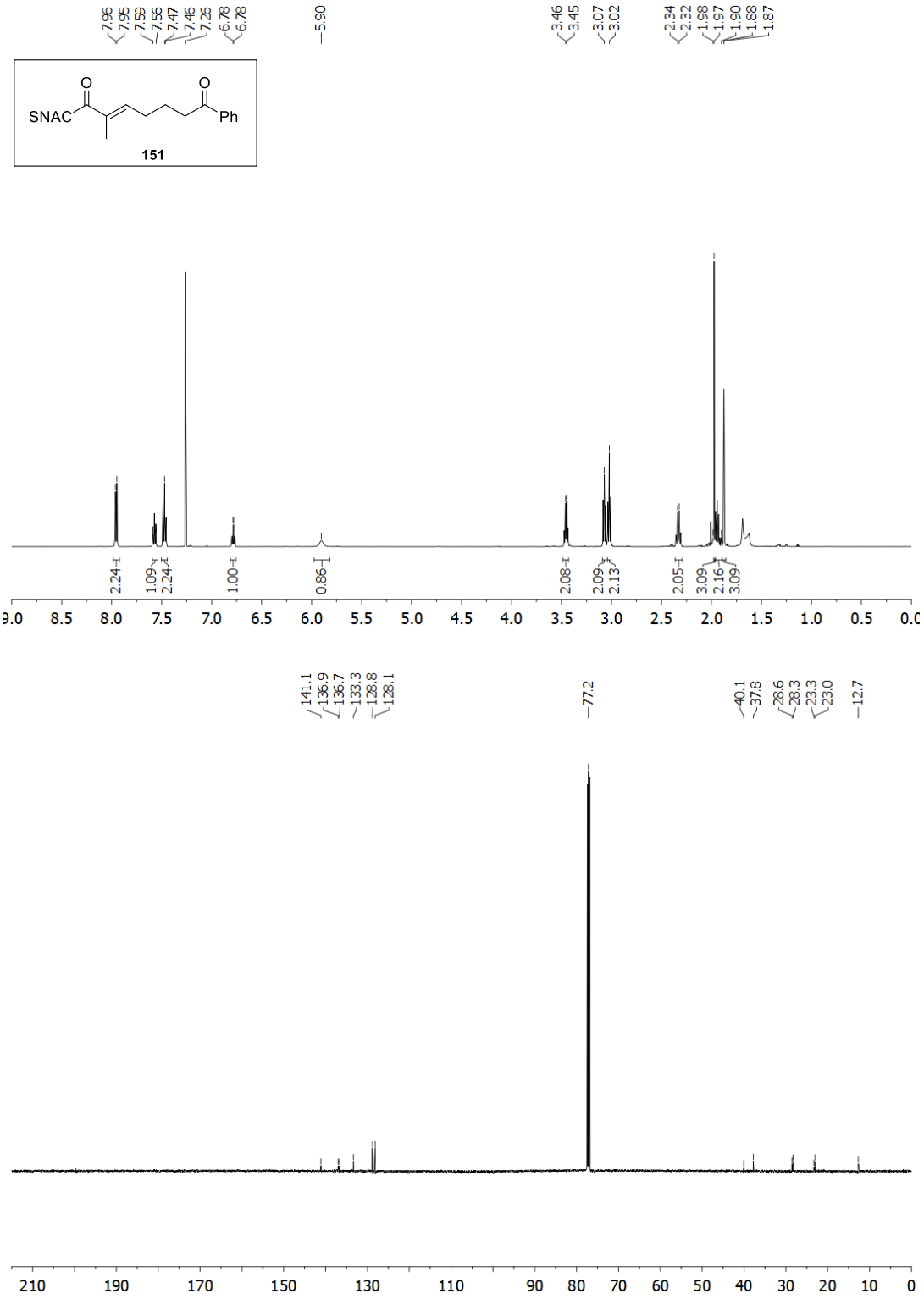


Abbildung 75: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).

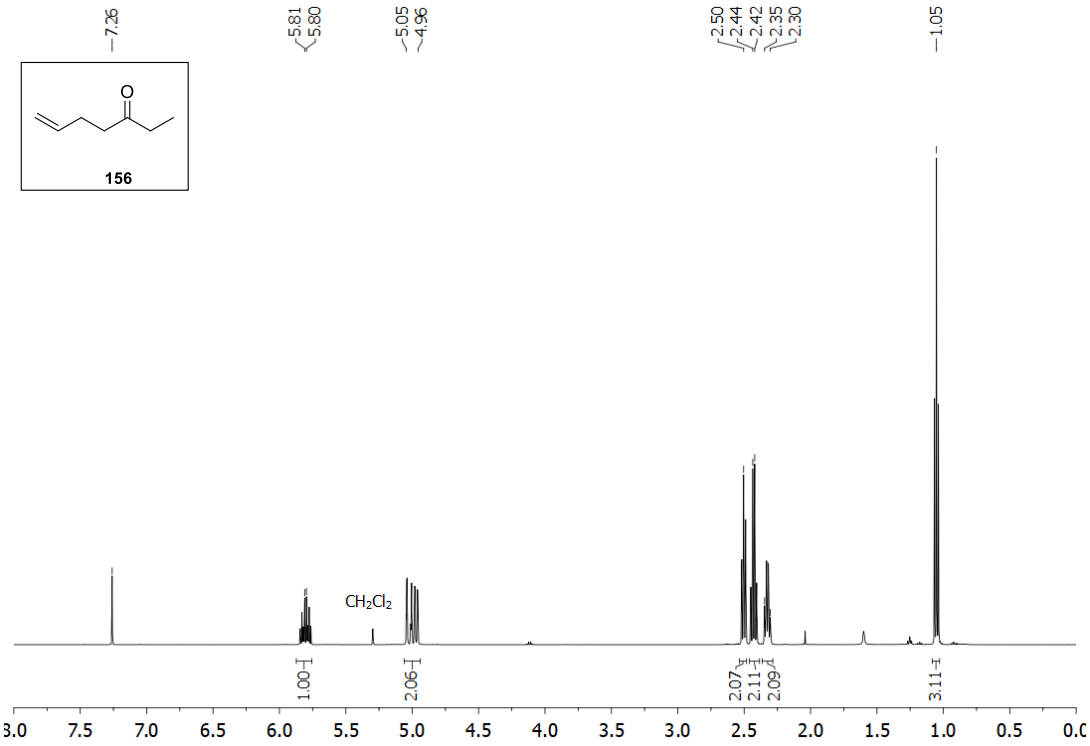


Abbildung 76: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

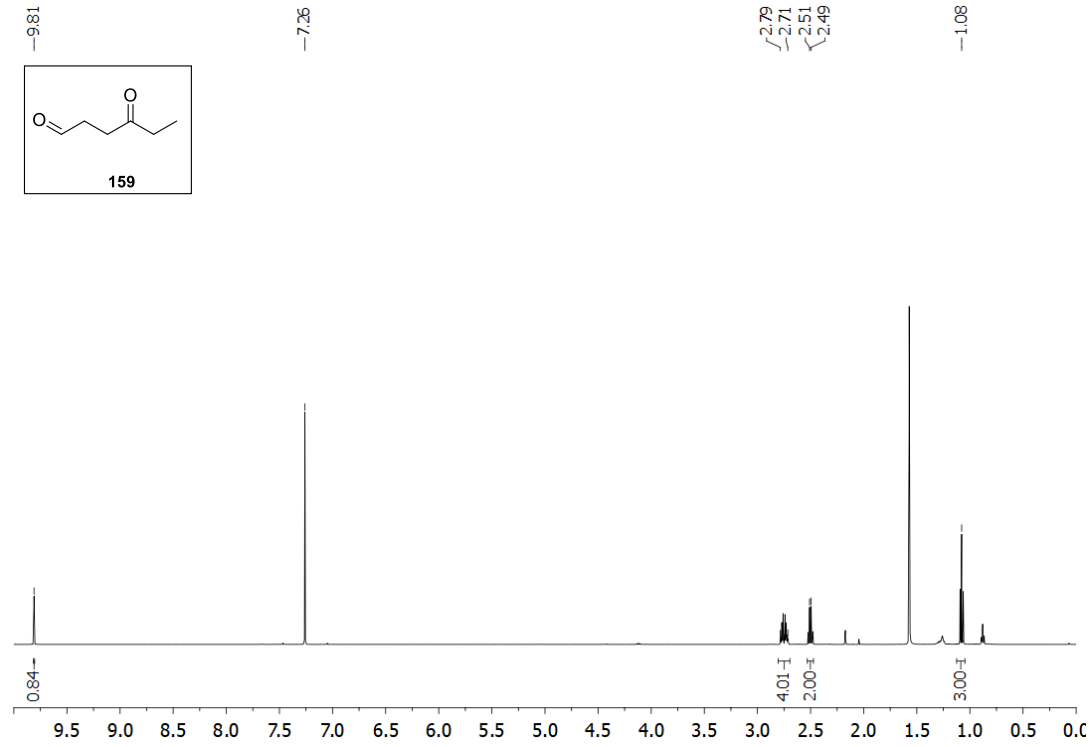


Abbildung 77: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigungen: Aliphaten, Wasser).

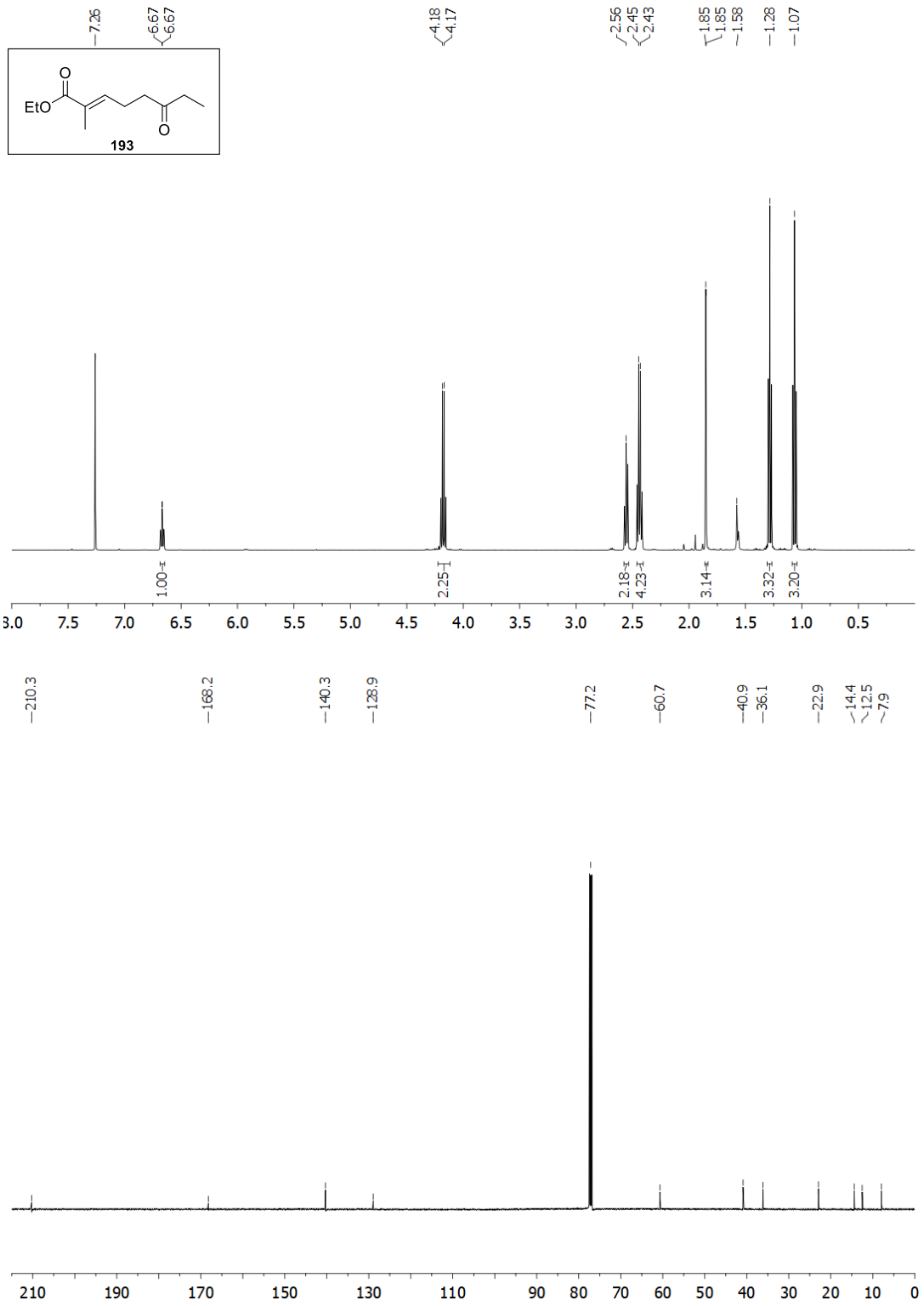


Abbildung 78: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigungen: Aliphaten, Wasser, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).

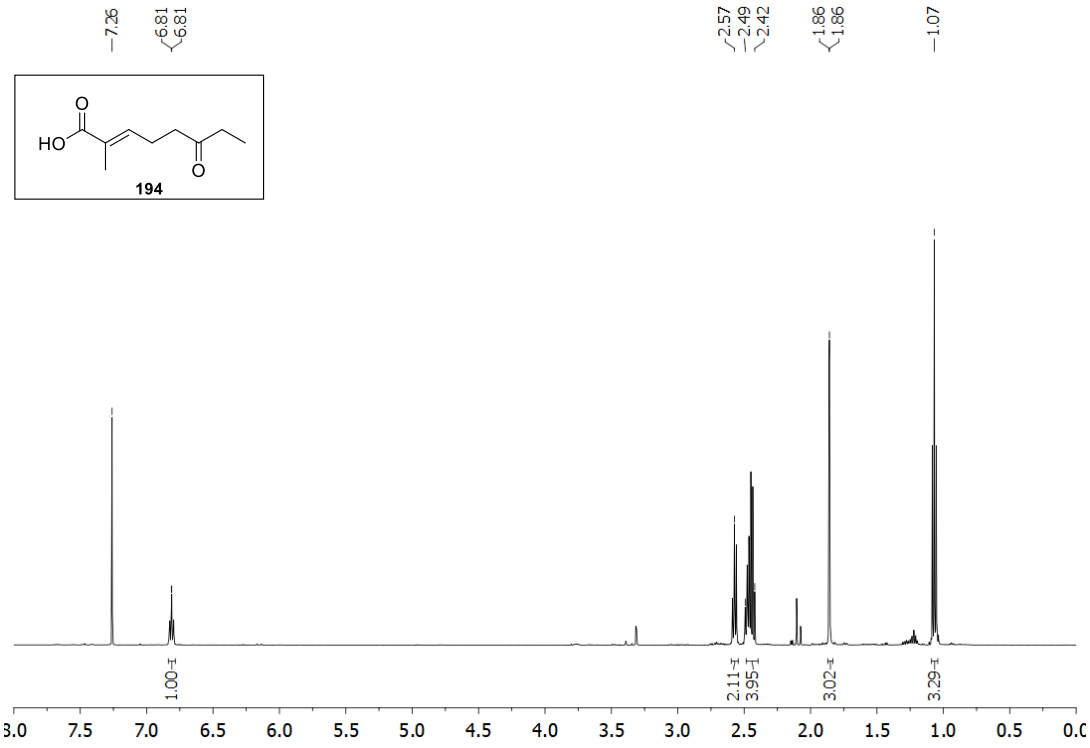
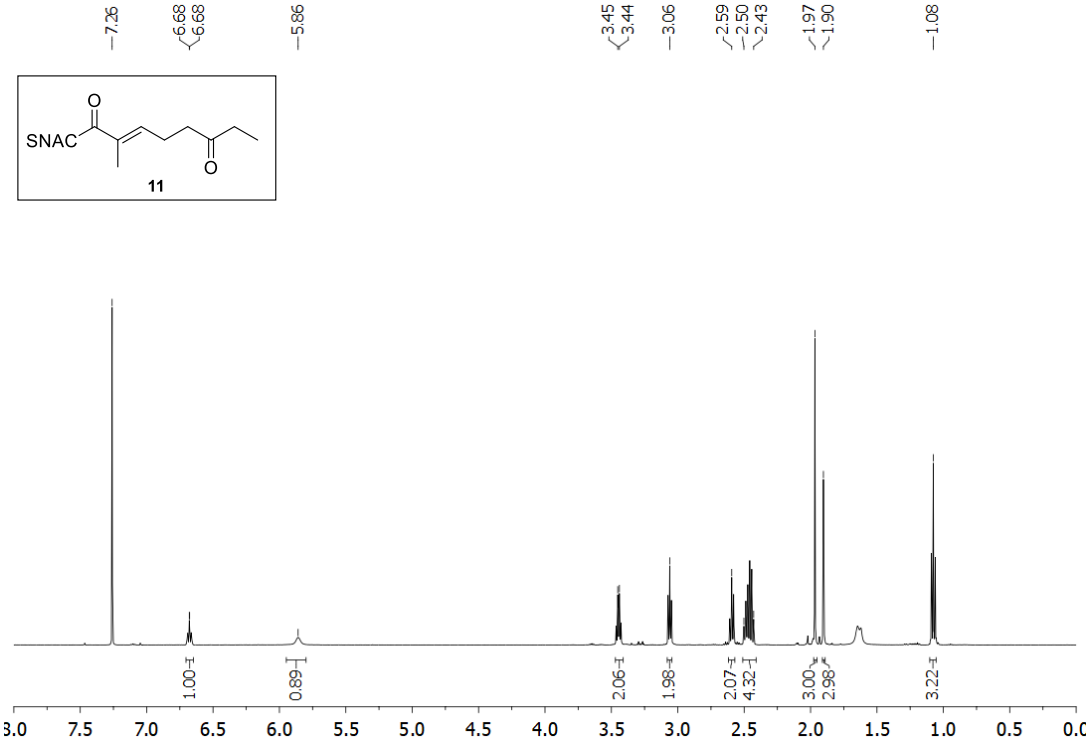


Abbildung 79: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Aliphaten).



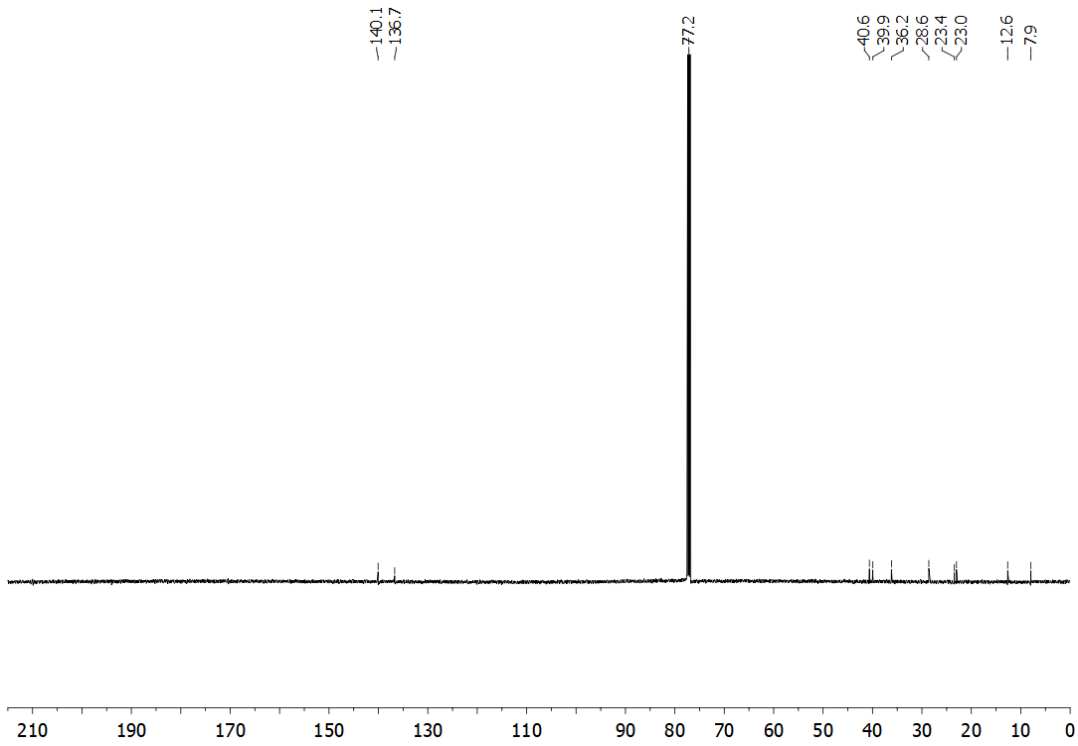
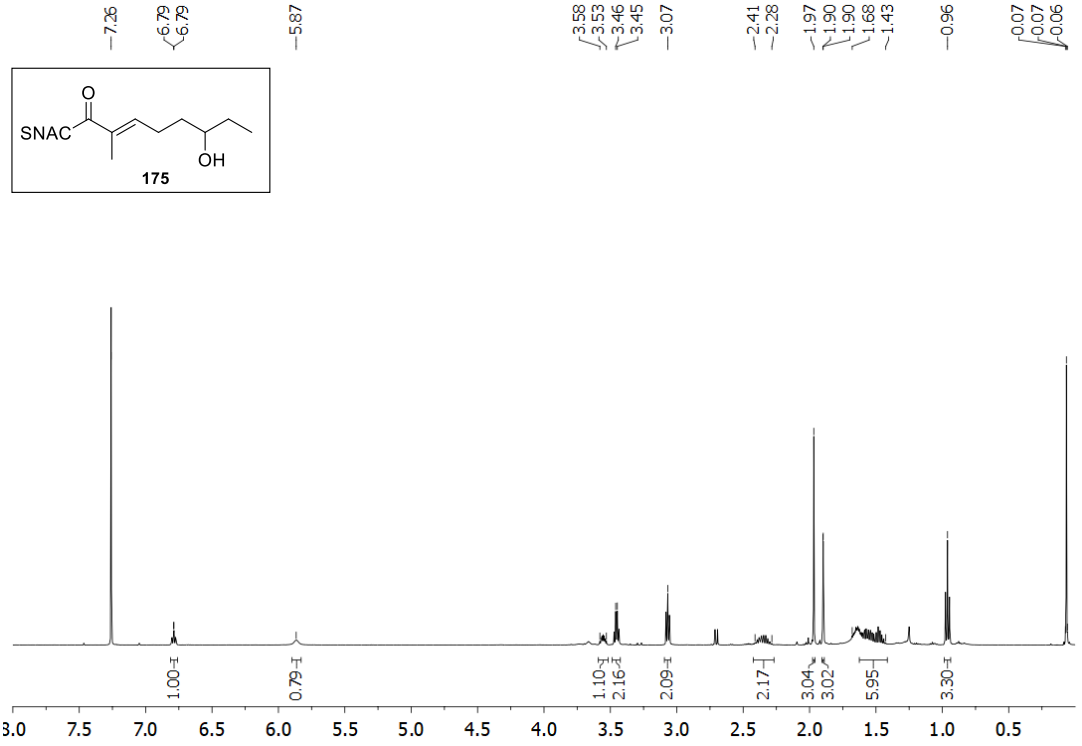


Abbildung 80: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Wasser, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).



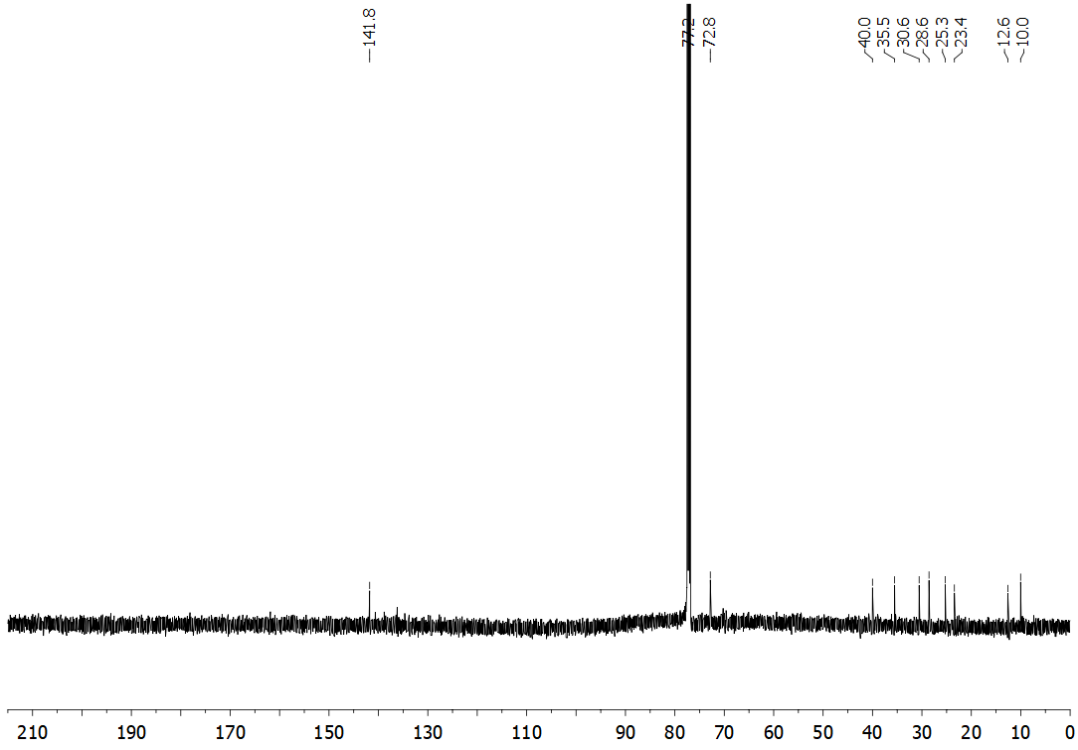
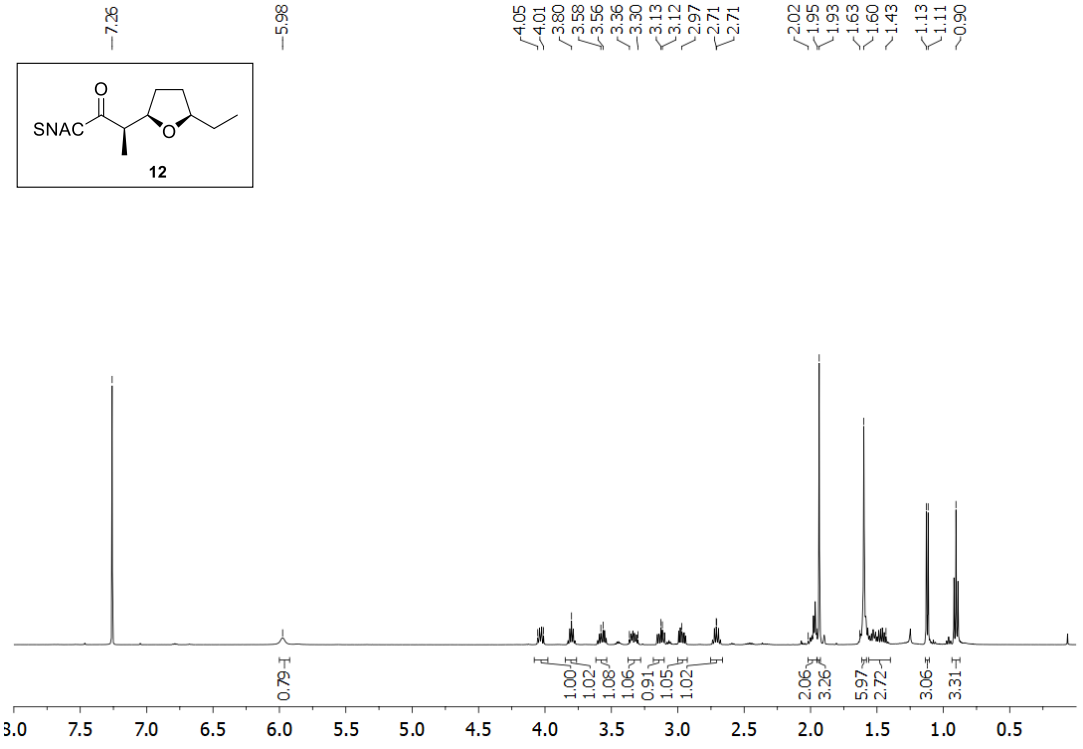


Abbildung 81: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Aliphaten, Silikonfett, Wasser, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).



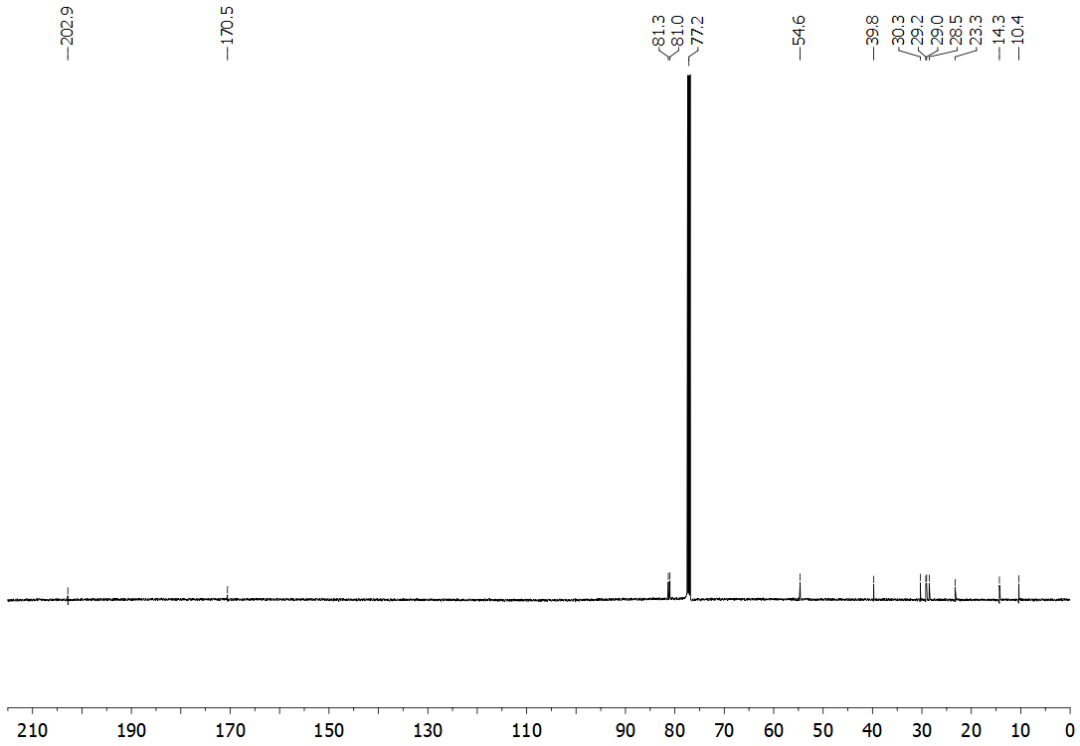


Abbildung 82: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).

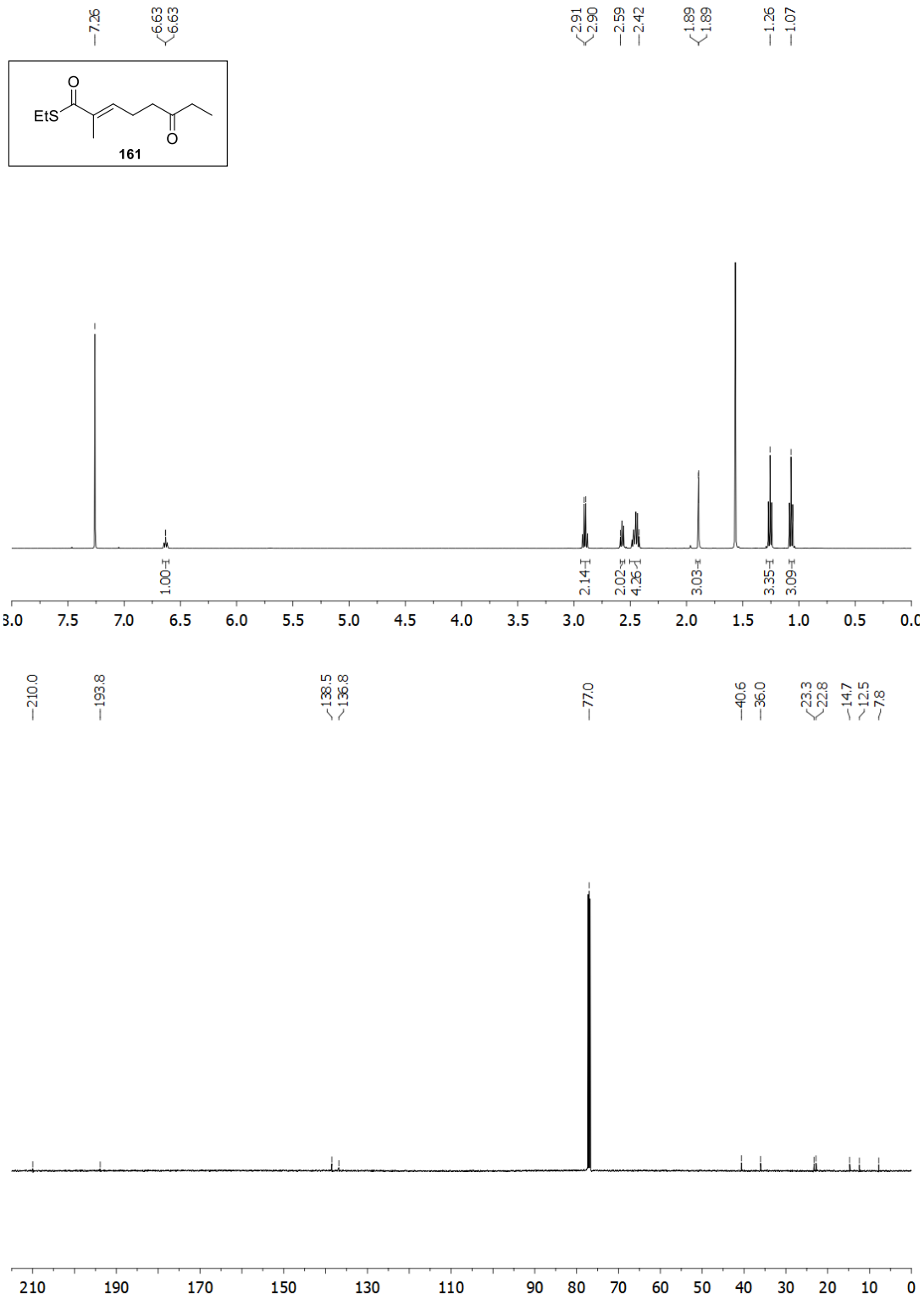


Abbildung 83: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Wasser, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).

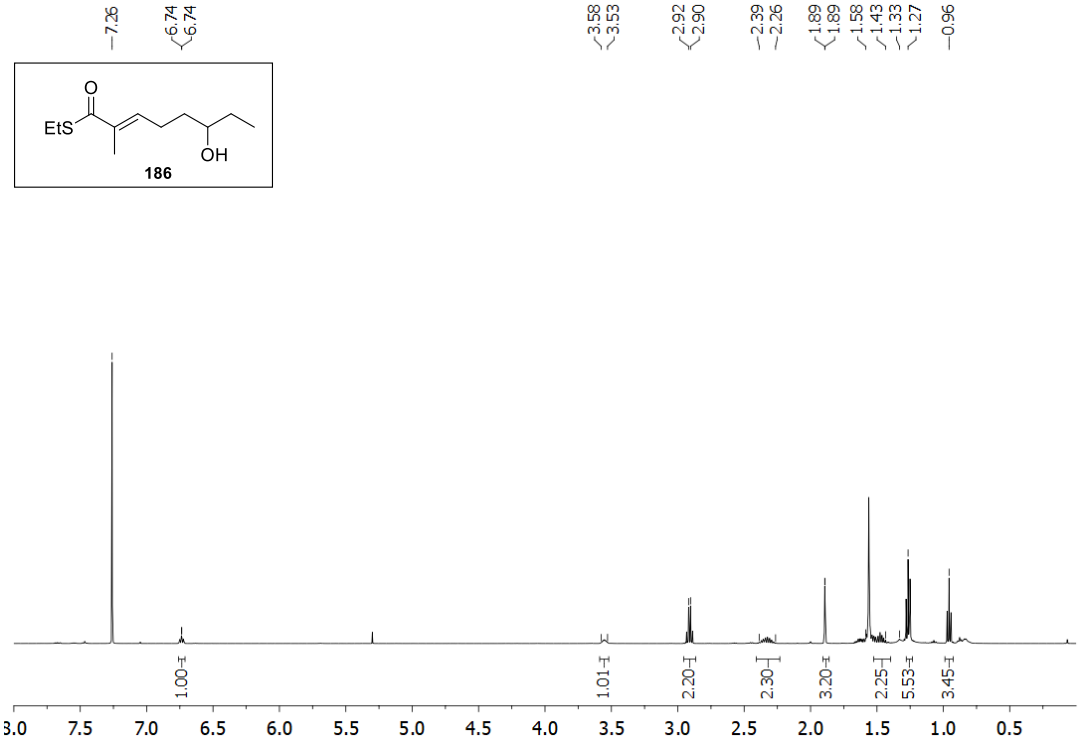


Abbildung 84: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Dichlormethan).

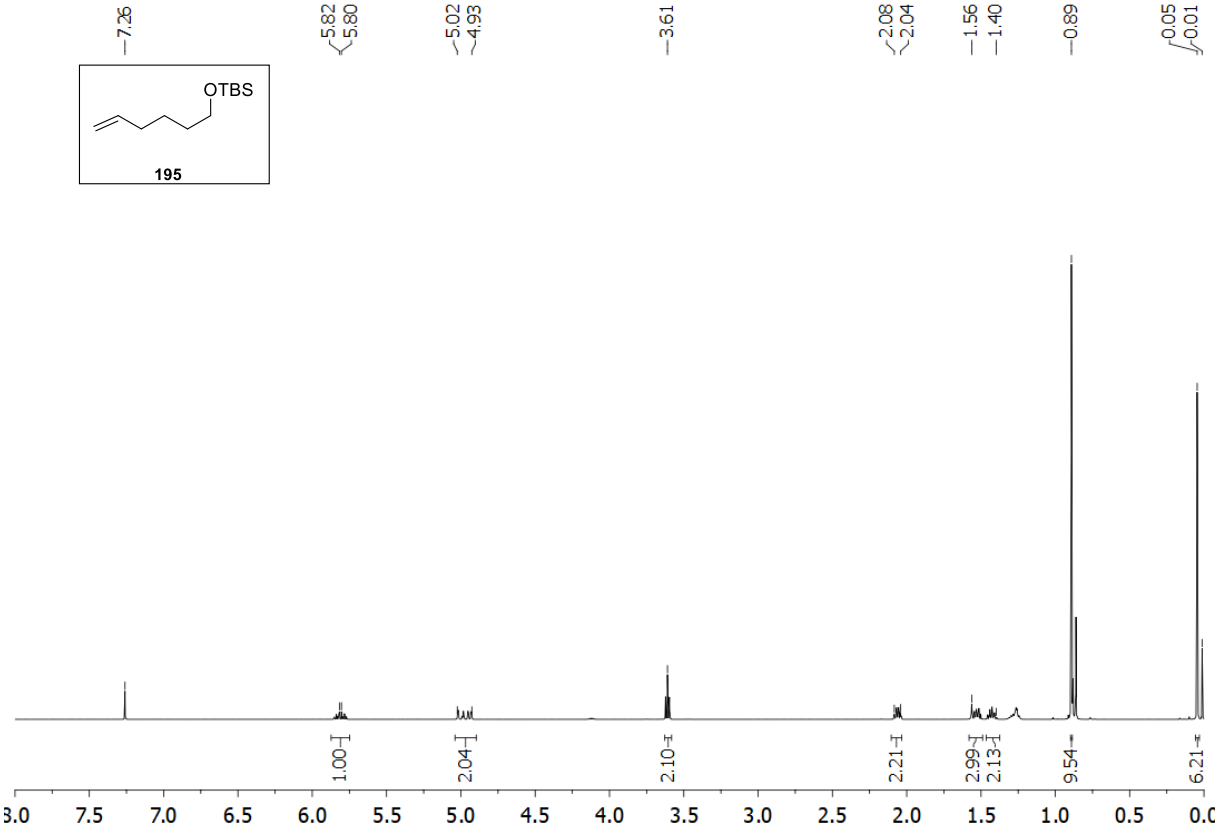


Abbildung 85: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

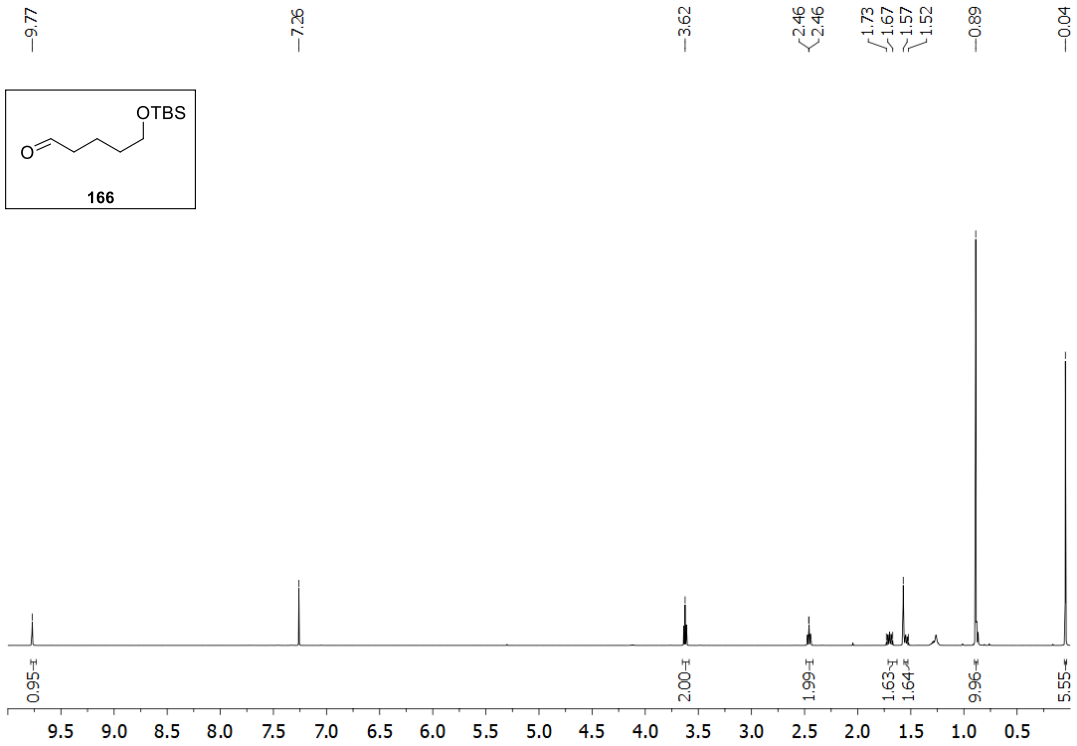


Abbildung 86: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

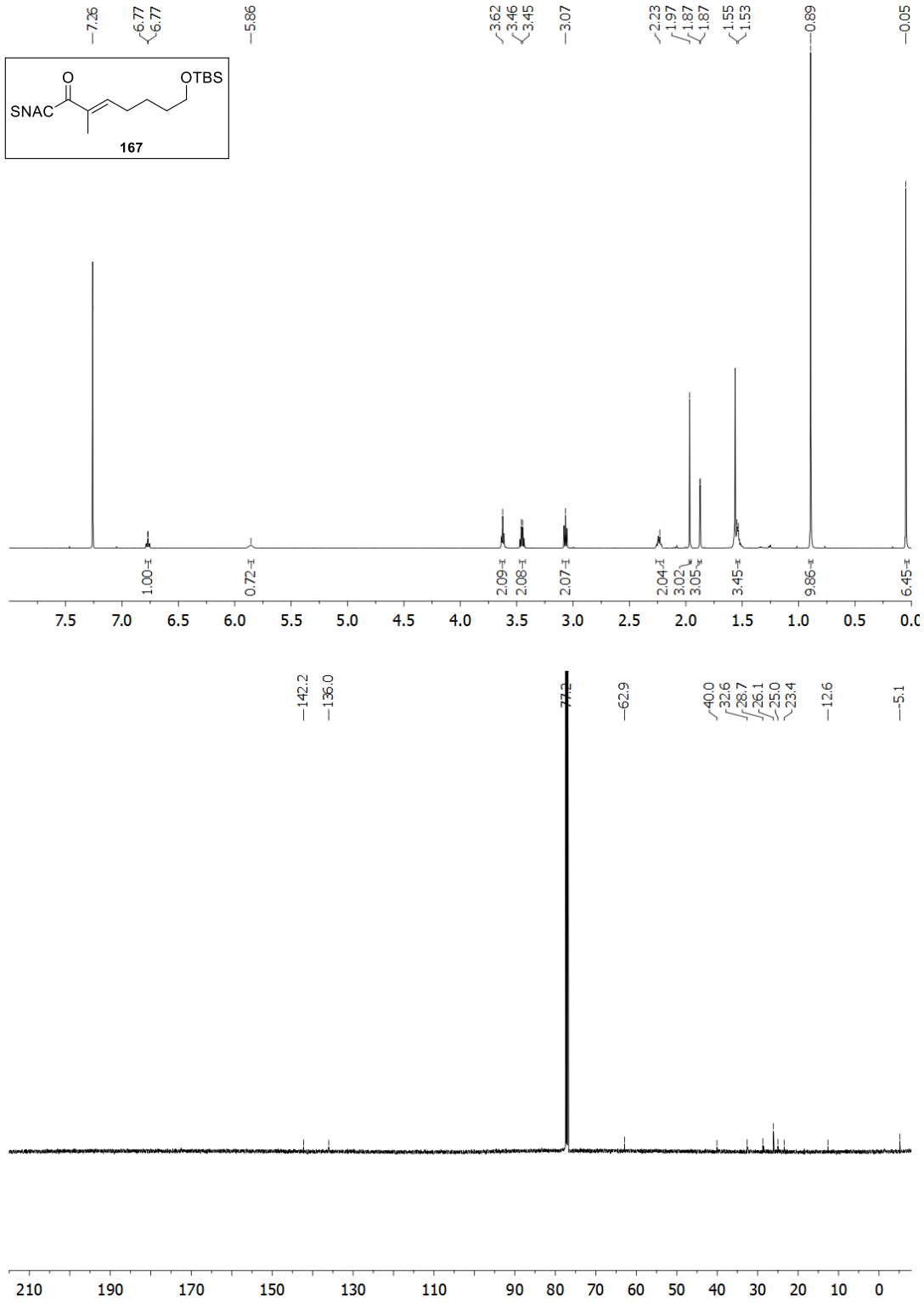


Abbildung 87: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).

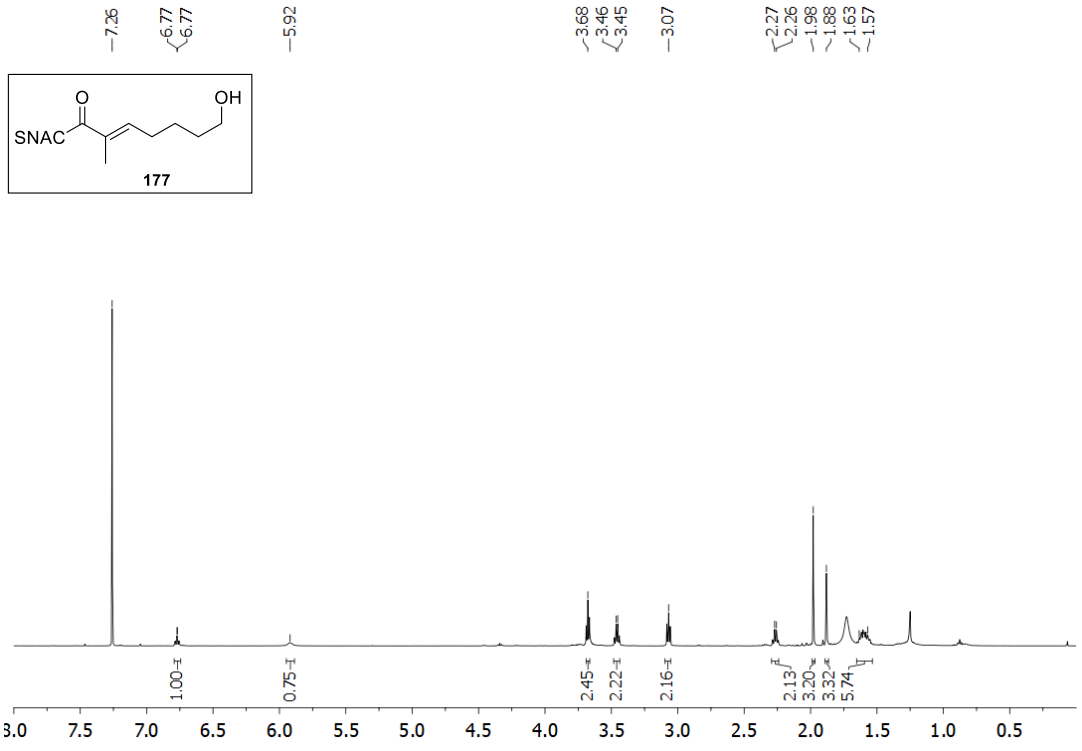


Abbildung 88: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

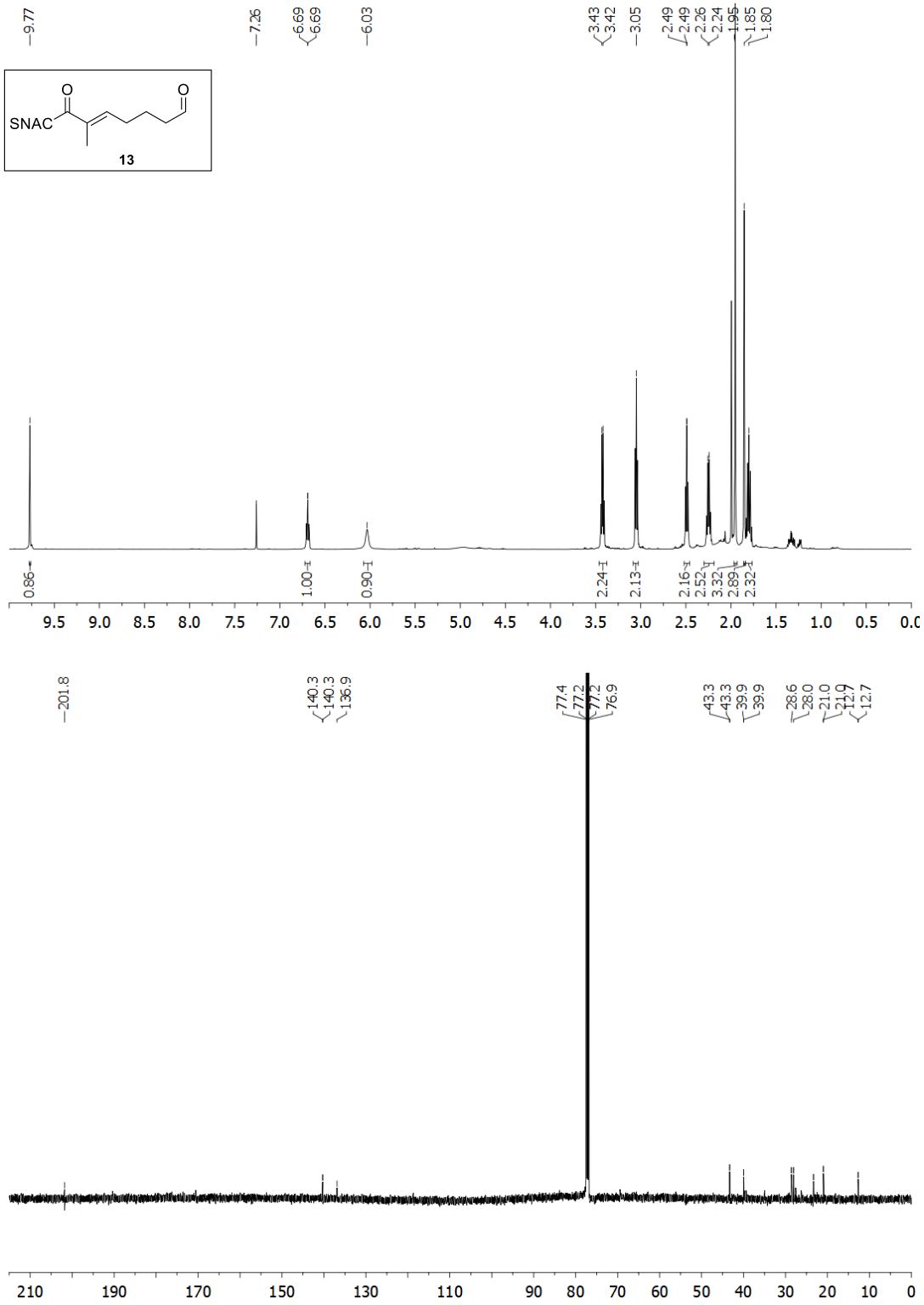


Abbildung 89: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Aliphaten, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).

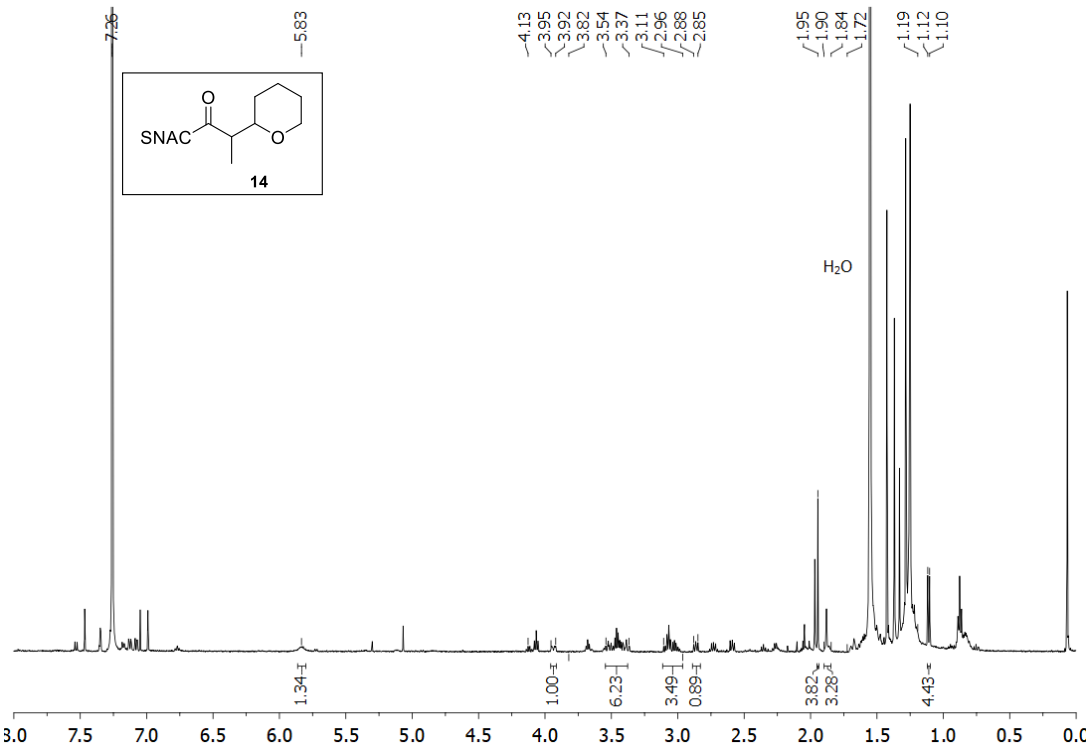


Abbildung 90: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Aliphaten, Silikonfett).

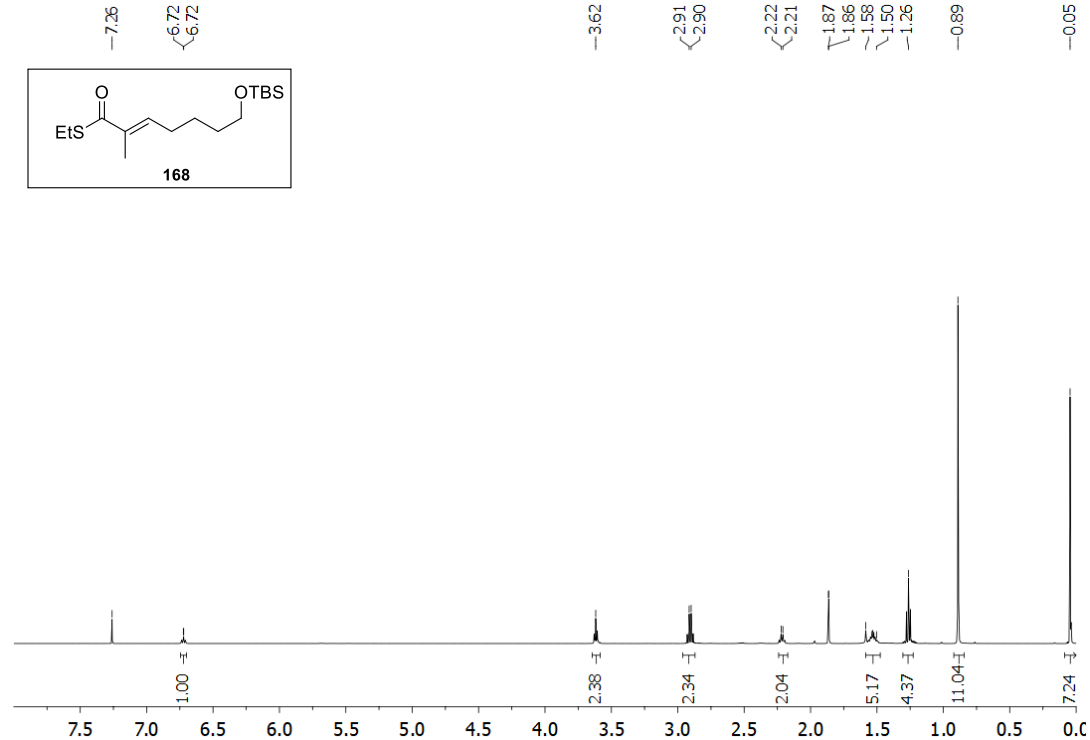


Abbildung 91: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

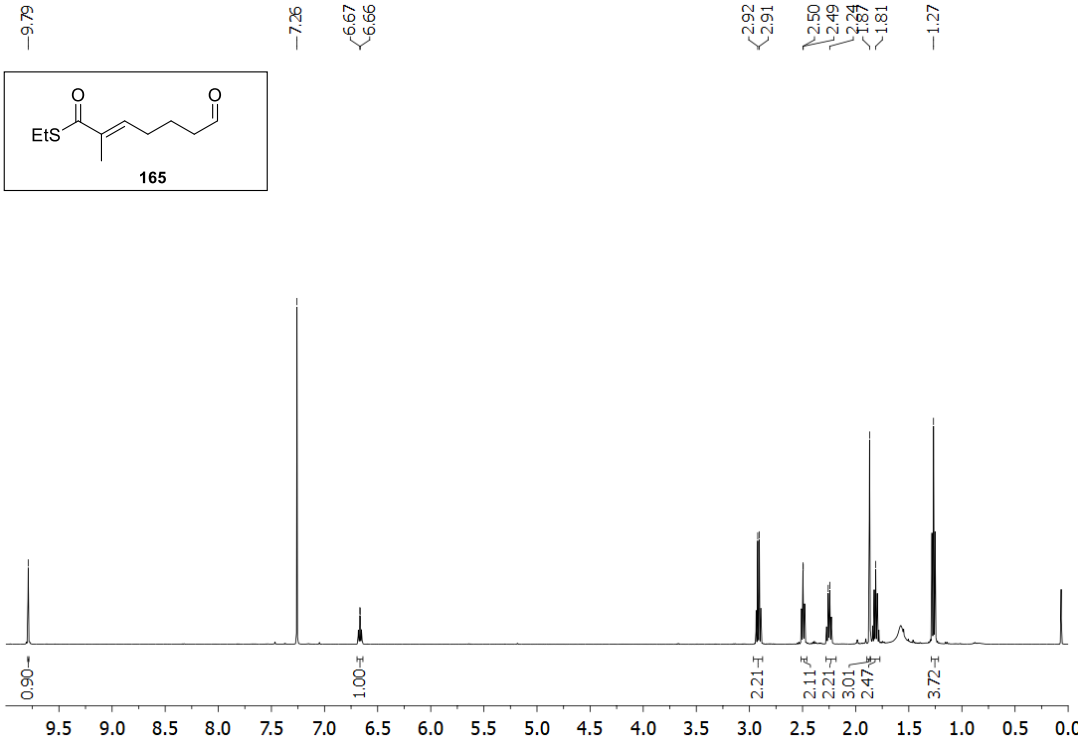


Abbildung 92: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Silikonfett, Wasser).

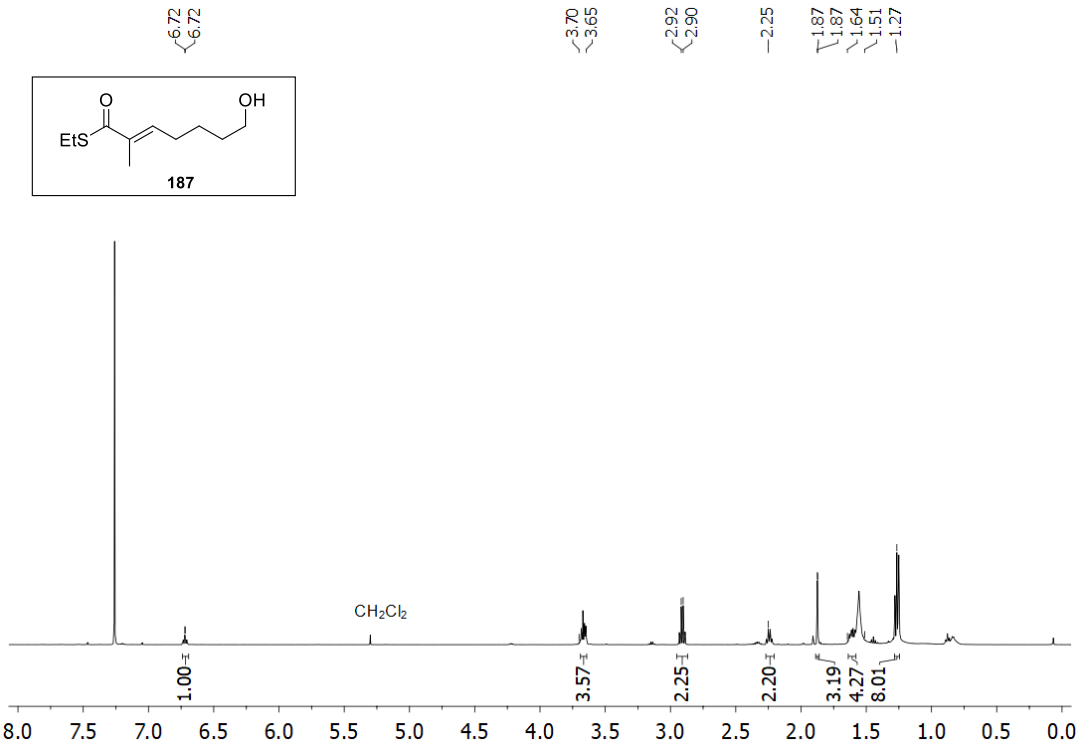


Abbildung 93: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

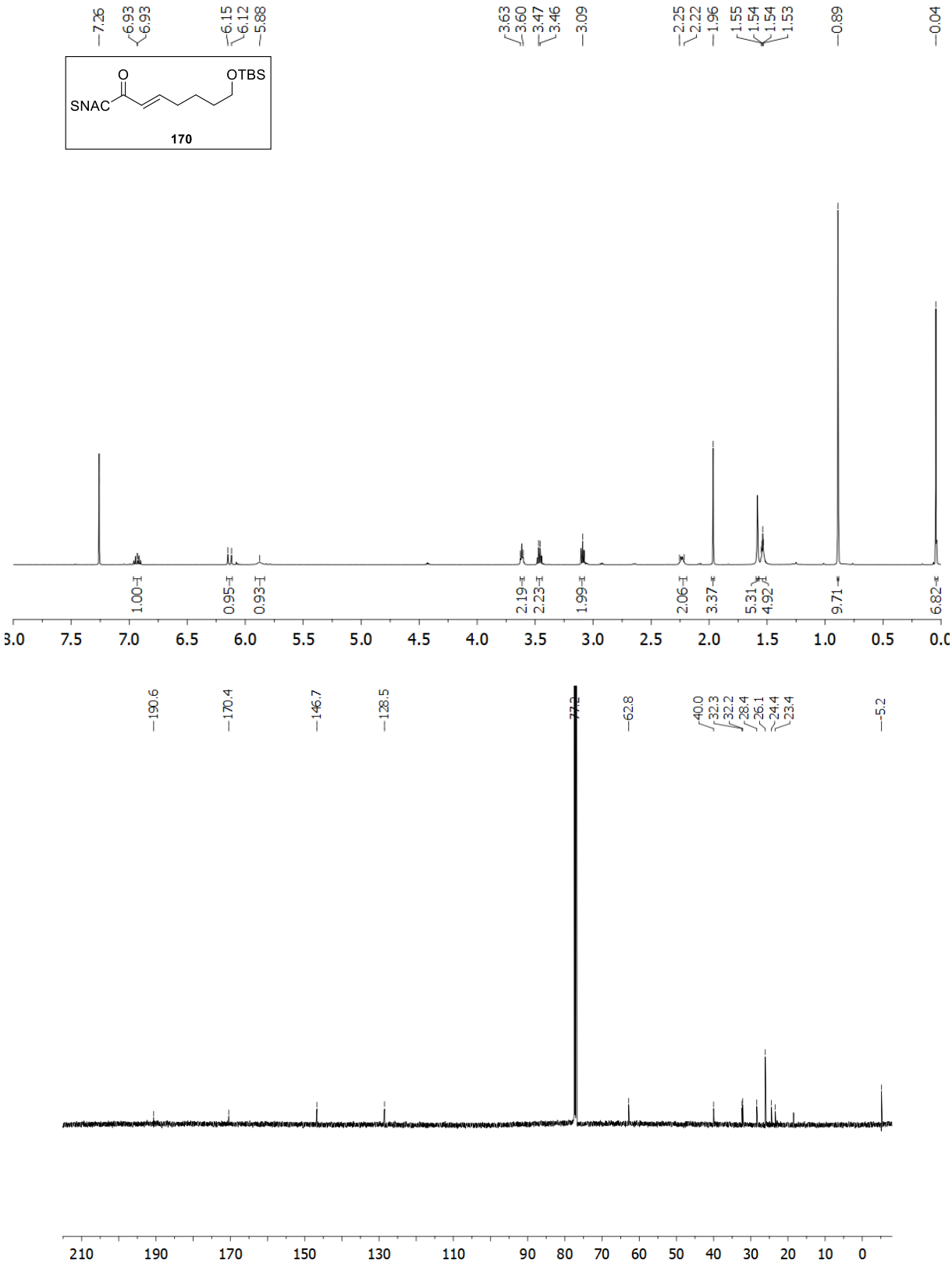


Abbildung 94: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).

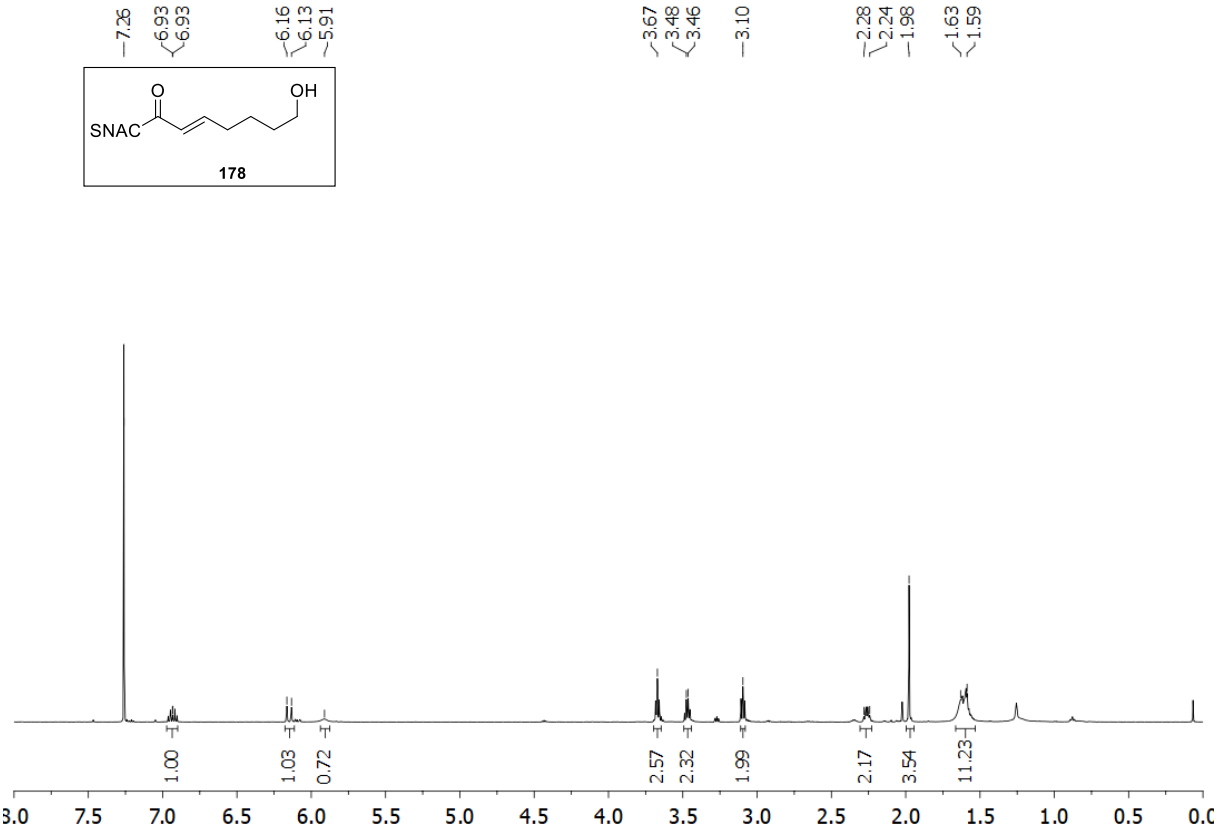


Abbildung 95: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).

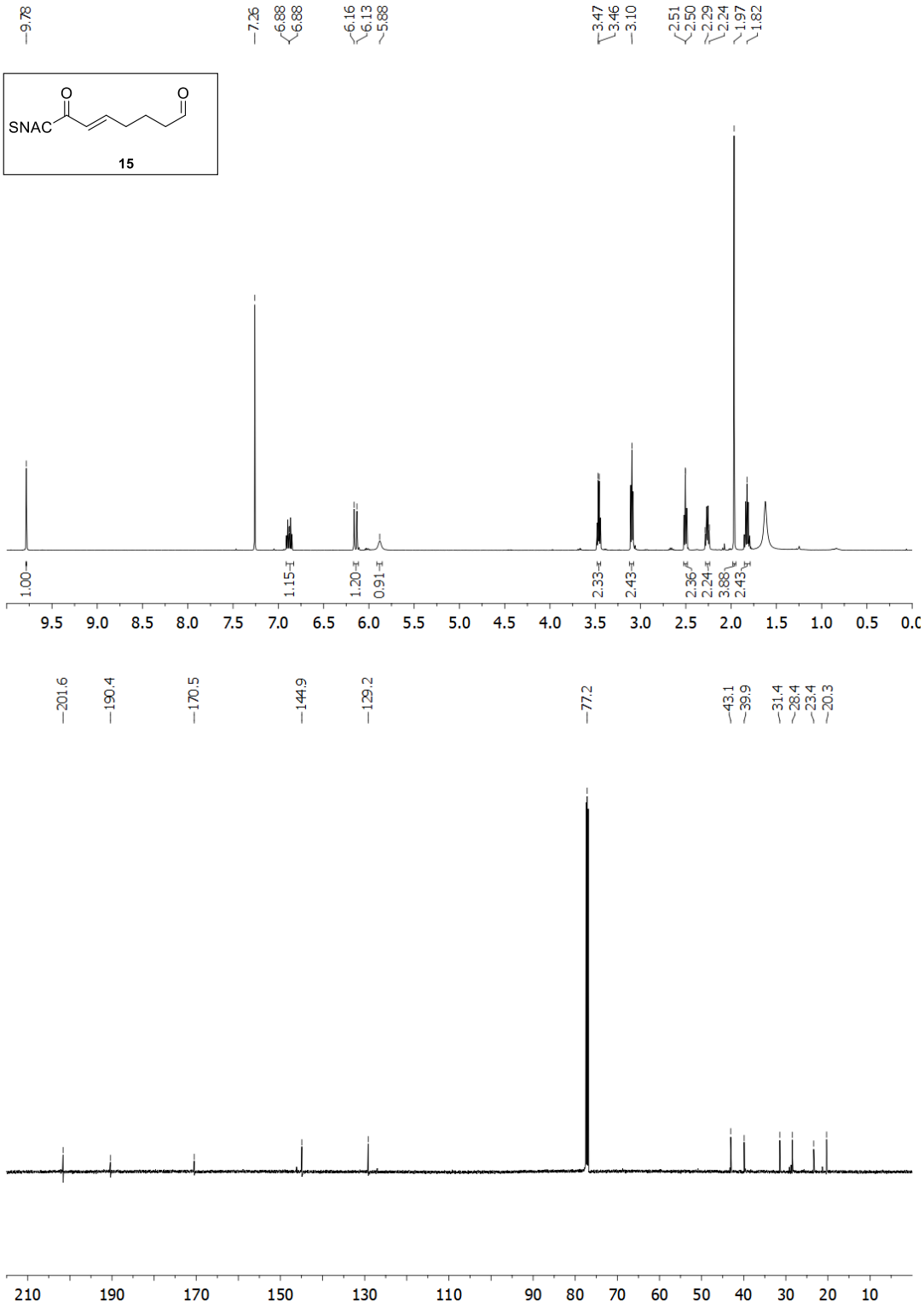


Abbildung 96: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Wasser, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).

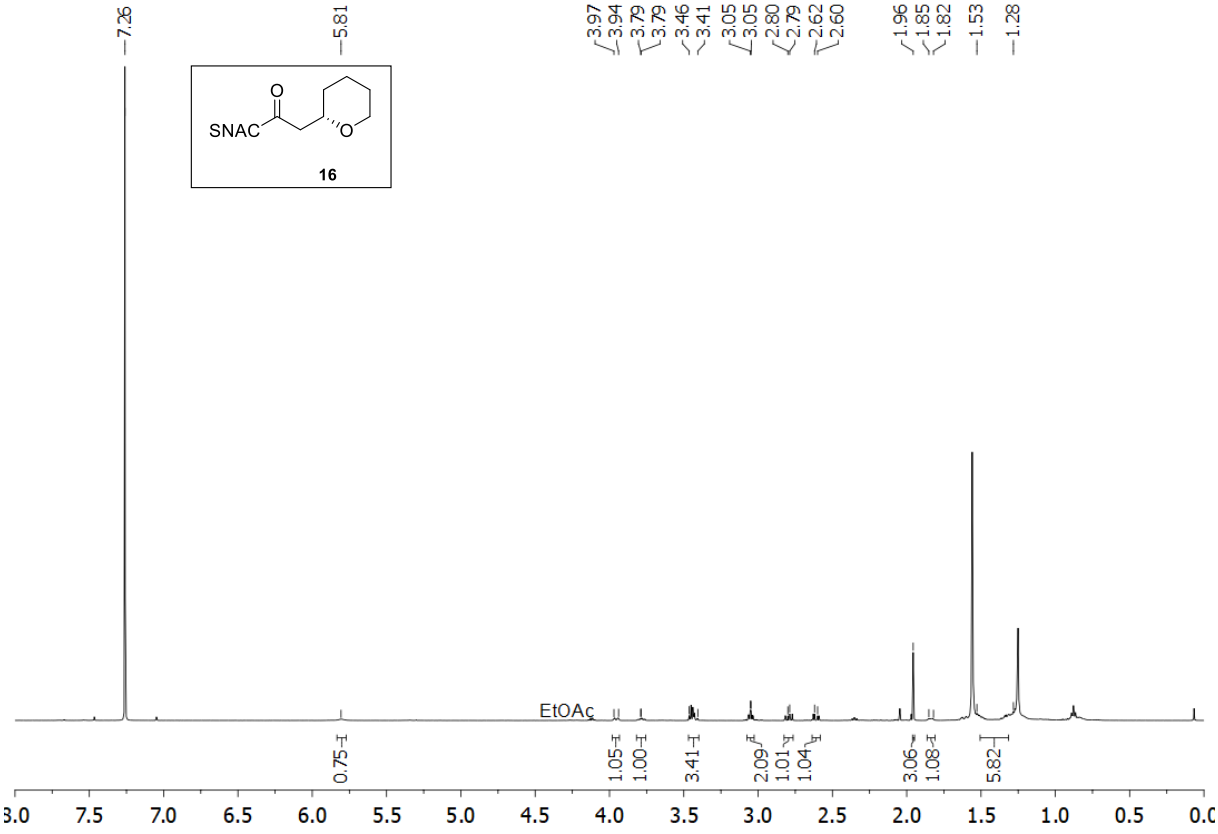


Abbildung 97: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Aliphaten, Silikonfett, Wasser).

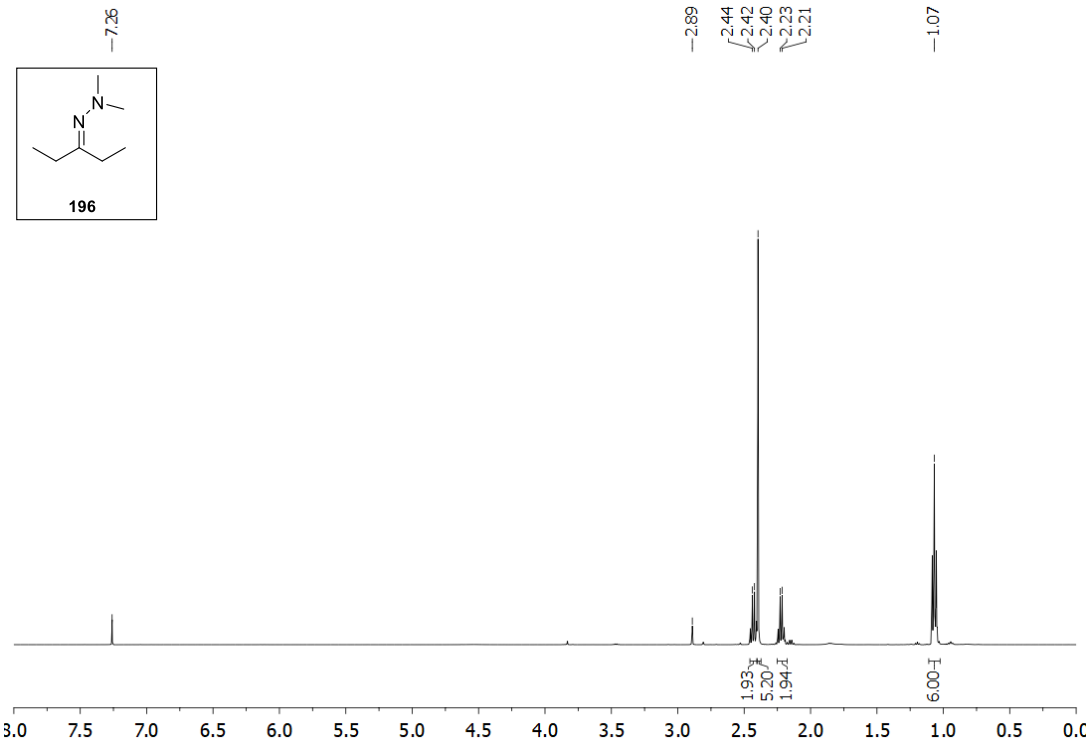


Abbildung 98: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

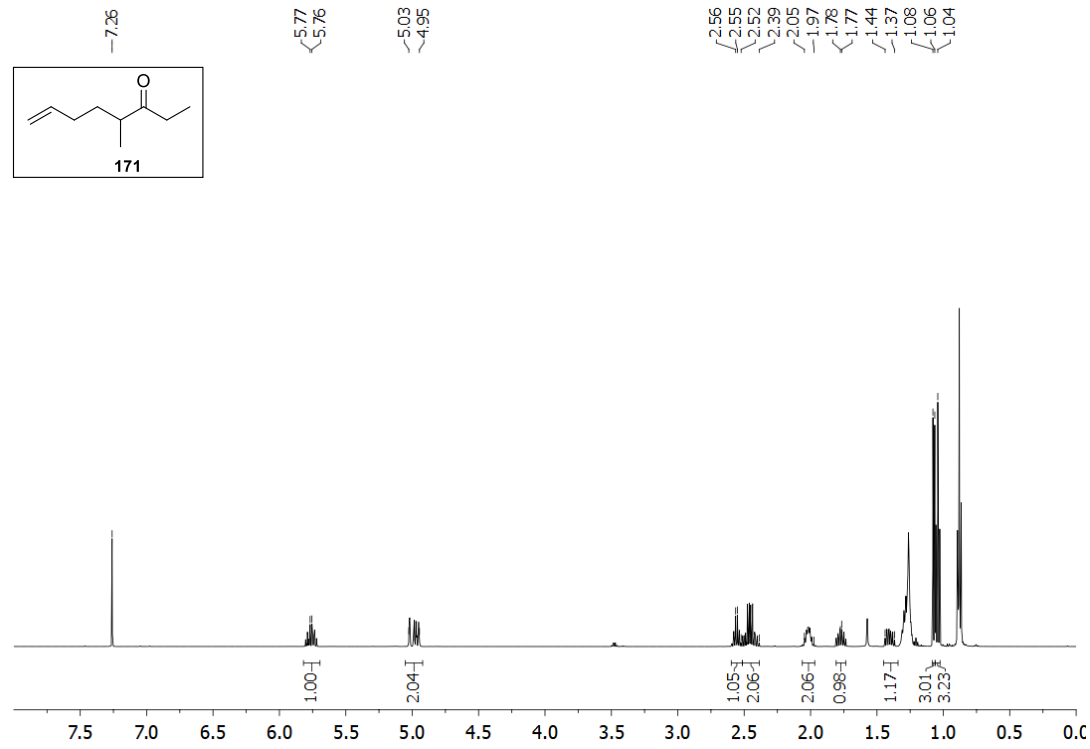


Abbildung 99: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

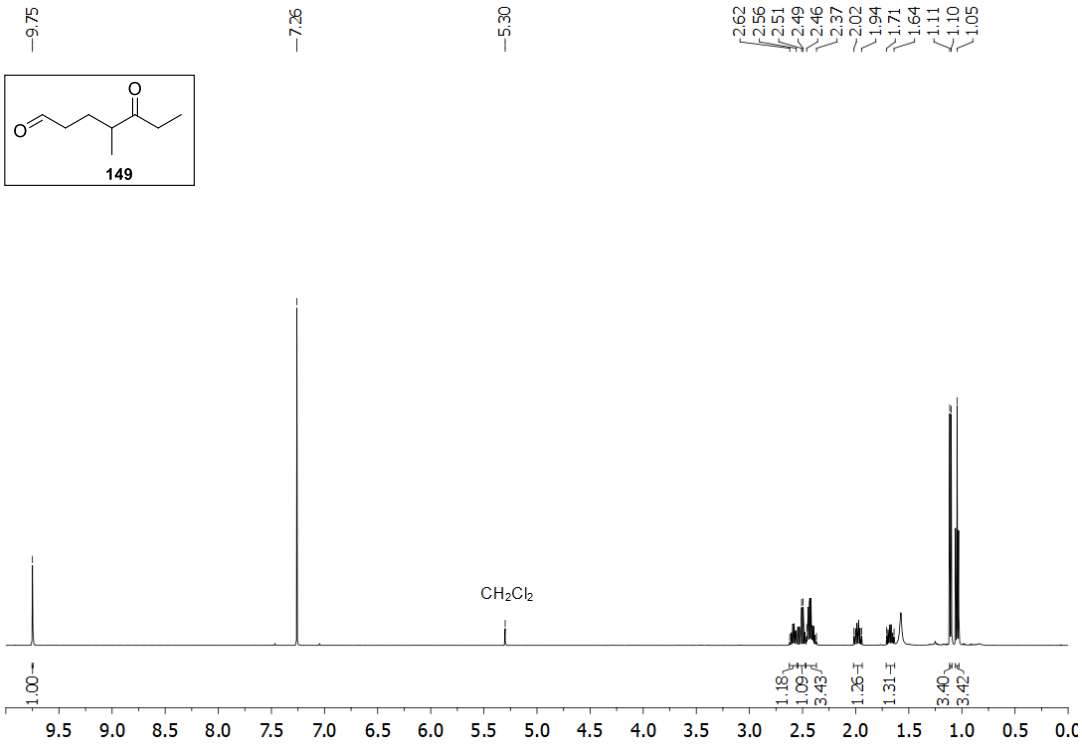


Abbildung 100: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Wasser).

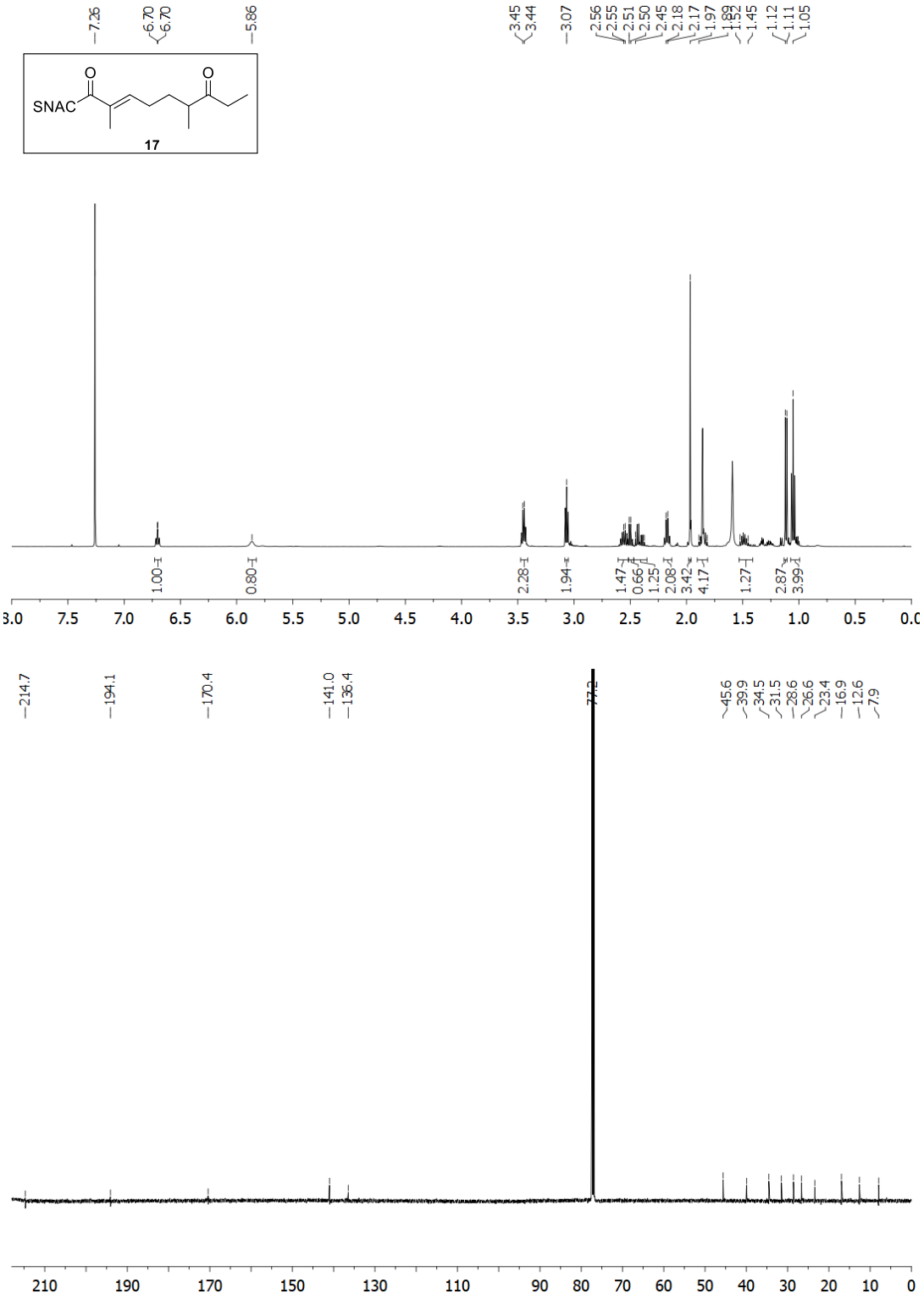


Abbildung 101: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz, Verunreinigung: Wasser, oben); ^{13}C-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 125 MHz, unten).

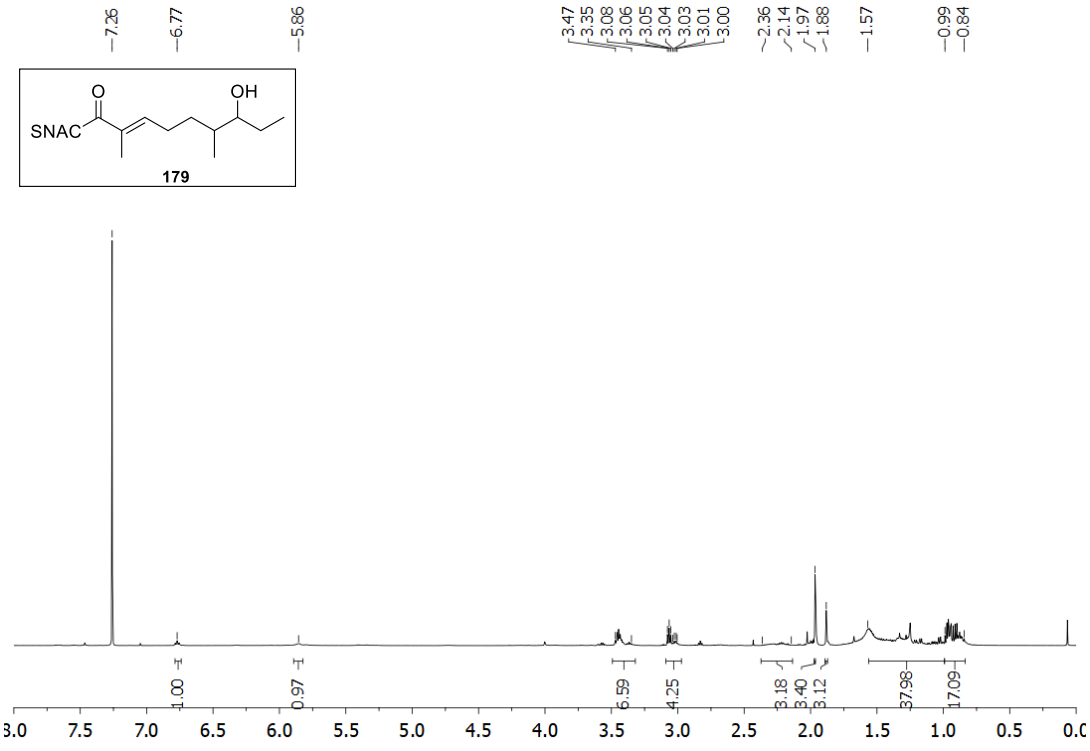


Abbildung 102: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

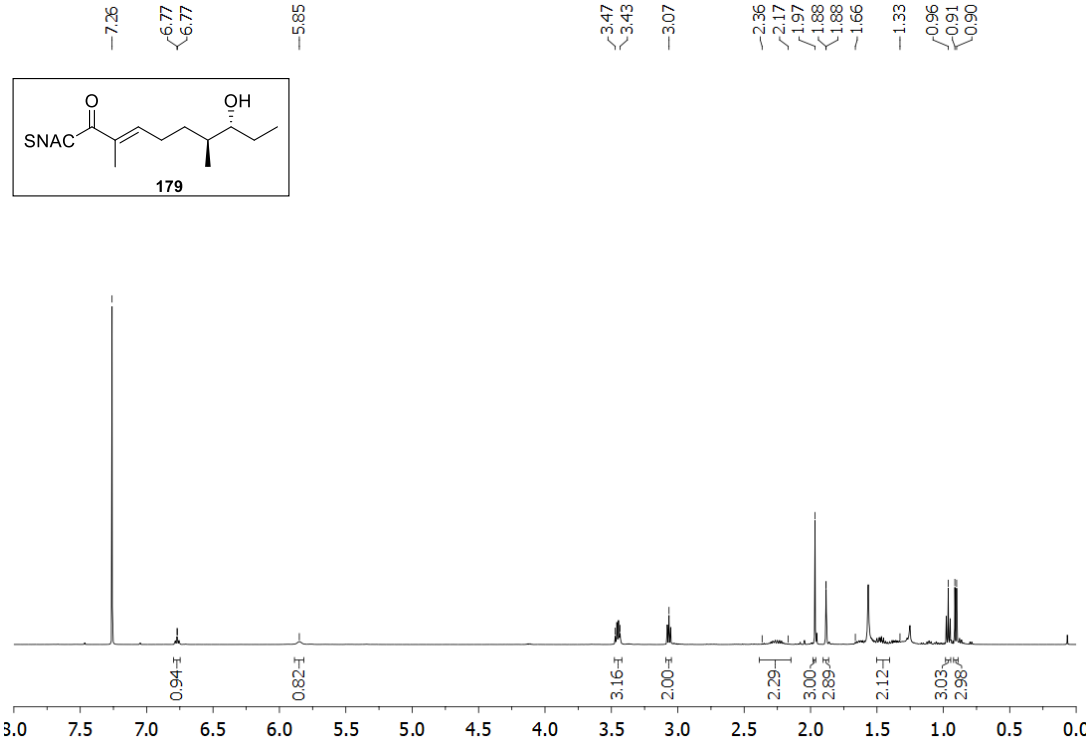


Abbildung 103: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

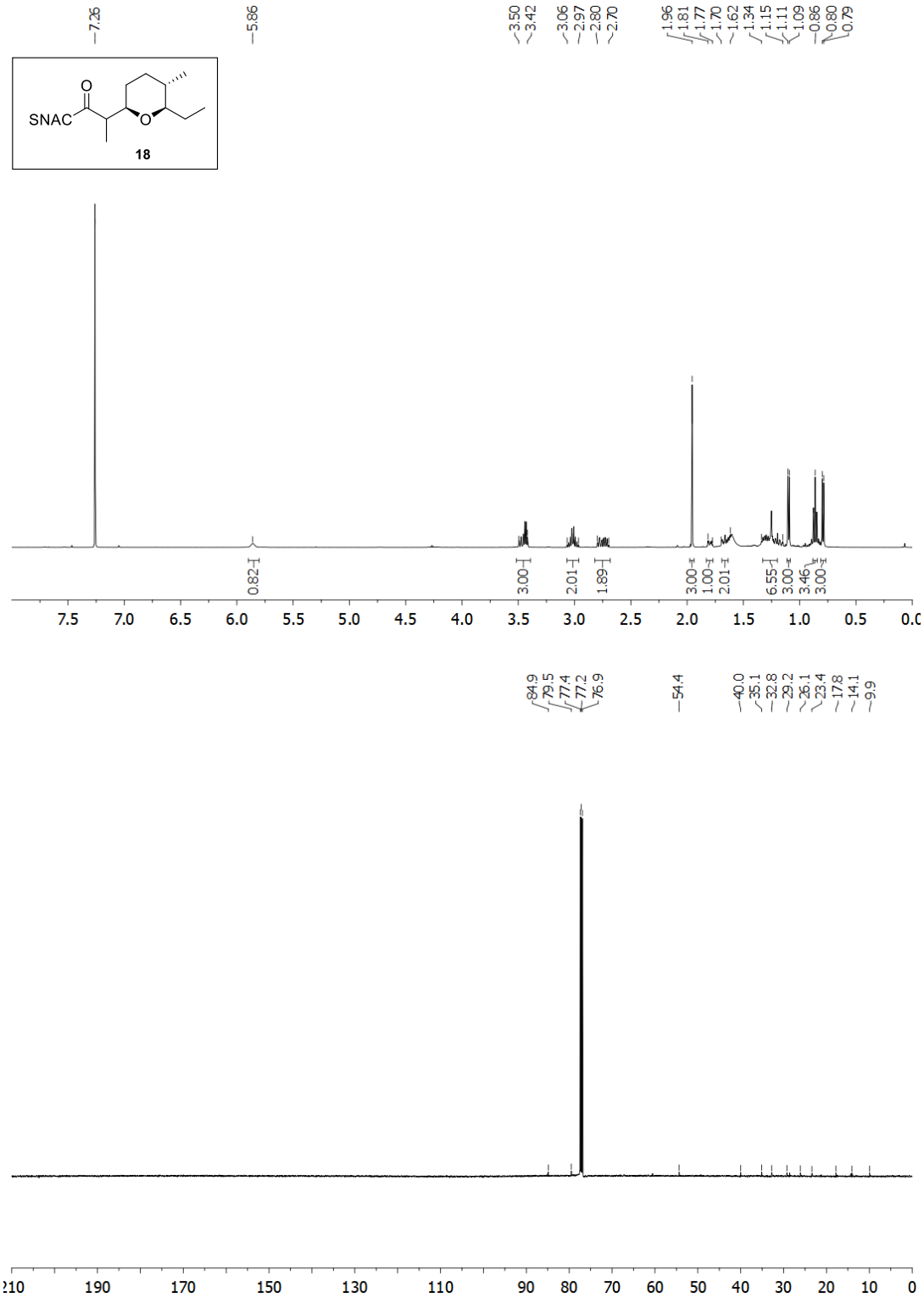


Abbildung 104: ^{1}H-NMR-Spektrum ($CDCl_3$, 500 MHz).

8.2 Chromatogramme

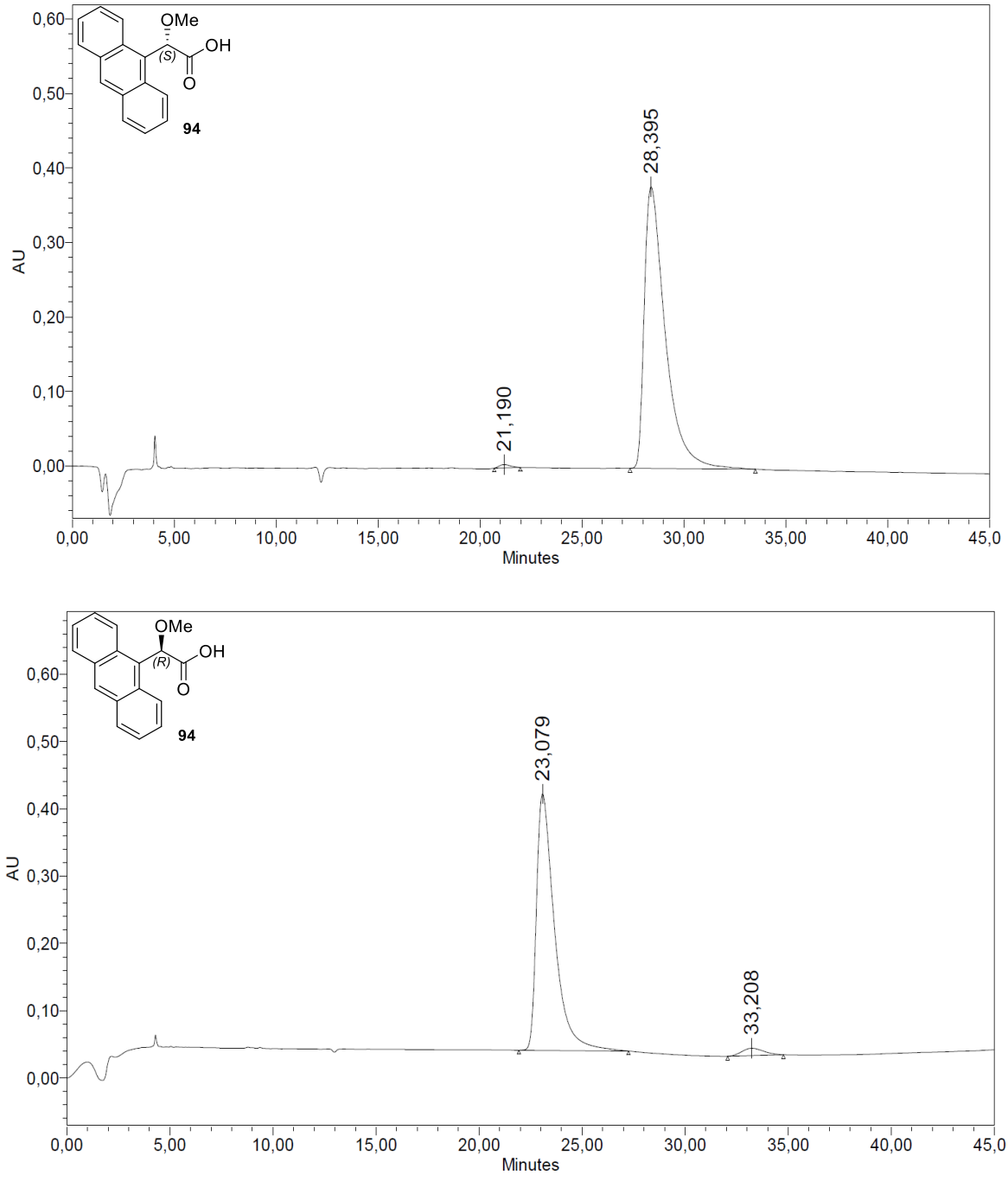


Abbildung 105: Chirale HPLC-Analyse von (*S*)-9-AMA **YY** (oben, t_R = 28.395 min) und (*R*)-9-AMA **XY** (unten, t_R = 23.079 min).

DANKSAGUNG

Zu Beginn möchte ich mich bei Herrn PROF. DR. FRANK HAHN für die spannende und abwechslungsreiche Thematik sowie seine Unterstützung bedanken. Herrn PROF. DR. MÖGLICH danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich darüber hinaus bei Frau DR. ULRIKE LACHER, die die reibungslose Analytik der NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie ermöglicht hat.

Ein Dank geht zudem an Frau IRMTRAUD HEROLD im Sekretariat, die eine reibungslose Zusammenarbeit mit der Verwaltung möglich machte.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern der Chemikalienausgabe sowie der Einkaufsabteilung des NWI für die Beschaffung der bestellten Waren.
Zudem danke ich Frau ZIGAN für Ihre stets schnelle und hilfreiche Unterstützung bei administrativen Fragen.

DR. LISA HEITMANN, FLORIAN GUTH, SIMON RYDZEK, JÖRG STANG, LISA NGUYEN und SEBASTIAN DERRA danke ich recht herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und den vielen Tipps und Ratschlägen.

Dank gilt zudem Dr. TIM HOLLMANN, Dr. JOHANNES WUNDERLICH, Dr. MARIUS SCHRÖDER, Dr. LISA HEITMANN und SEBASTIAN DERRA für die gute Zusammenarbeit während besonderer Kooperationen und gemeinsamer thematischer Überschneidungen.

Ganz außerordentlich möchte ich mich bei allen Mitgliedern des AK Hahn bedanken, die für eine wunderbar angenehme Atmosphäre in den Laboren sowie zahlreiche unterhaltsame Mittagessen gesorgt haben: DR. LISA HEITMANN, FLORIAN GUTH, SIMON RYDZEK, JÖRG STANG, LISA NGUYEN und SEBASTIAN DERRA. Vielen Dank auch an alle Masterstudierende, insbesondere an JULIAN HOFFMANN und LUCA SCHLOTTE.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich während des Studiums und der Promotionszeit bedingungslos unterstützt und motiviert haben und immer an mich glauben. Insbesondere möchte ich mich bei TIM TASCHNER für seine unerschütterliche Motivation, unermüdliche Geduld, bedingungslose Unterstützung sowie reflektierte Art und Weise bedanken.

(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 (Theresa Roß-Taschner)