

*In vitro*-Studien  
isolierter Kettoreduktase-Domänen  
der Polyketidbiosynthese

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

(Dr. rer. nat.)

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

vorgelegt von

**Marius Schröder**

geboren in Berlin

Bayreuth, 2020



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2014 bis Dezember 2016 an der Leibniz Universität Hannover und von Januar 2017 bis Juni 2020 an der Universität Bayreuth am bei 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 eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am:	24.06.2020
Zulassung durch die Promotionskommission:	01.07.2020
Wissenschaftliches Kolloquium:	07.12.2020

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Matthias Breuning

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Frank Hahn	(Gutachter)
Prof. Dr. Rainer Schobert	(Gutachter)
Prof. Dr. Birte Höcker	(Vorsitzende)
Prof. Dr. Seema Agarwal	



~ ~ ~

*„If you have an apple and I have an apple and we exchange these apples  
then you and I will still each have one apple.  
But if you have an idea and I have an idea and we exchange these ideas,  
then each of us will have two ideas.“*

~

*„Wenn Du einen Apfel hast und ich einen Apfel habe und wir diese Äpfel tauschen,  
haben Du und ich immer noch jeweils einen Apfel.  
Aber wenn Du eine Idee hast und ich eine Idee habe und wir diese Ideen austauschen,  
dann wird jeder von uns zwei Ideen haben.“*

~ ~ ~

George Bernard Shaw (1856 – 1950)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Polyketide und Polyketidsynthase-Systeme des Typs I .....	3
1.2 Ketoreduktase-Domänen .....	7
1.3 Polyole Strukturen in Naturstoffen .....	13
<b>2. Zielsetzung.....</b>	<b>15</b>
<b>3. Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>16</b>
3.1 Auswahl der Ketoreduktase-Domänen .....	16
3.2 Molekularbiologische und Proteinbiochemische Arbeiten .....	24
3.3 Synthese von Substraten und Referenzen .....	29
3.4 Studien zur Konfigurationsbestimmung .....	45
3.5 Enzymaktivitätstests und -Kinetiken .....	57
3.6 Relative Enzymkinetiken.....	67
3.7 Enzymaktivitätstests mit Zuordnung der Produktkonfigurationen...	85
<b>4. Zusammenfassung.....</b>	<b>108</b>
<b>5. Summary.....</b>	<b>112</b>
<b>6. Experimenteller Teil .....</b>	<b>116</b>
6.1 Materialien und Geräte .....	116
6.2 Stämme, Plasmide, Gene und rekombinante Proteine.....	119
6.3 Molekularbiologische Arbeiten .....	122

6.4	Proteinbiochemische Arbeiten .....	132
6.5	Enzymaktivitätstests .....	139
6.6	Allgemeine Hinweise zu chemischen Synthesen .....	144
6.7	Synthesen für Malonsäurehalbthioester .....	147
6.8	Synthesen für Carbonsäurebausteine .....	154
6.9	Synthesen für $\beta$ -Ketothiophenolester .....	165
6.10	Synthesen für $\beta$ -Keto-SNAC-thioester .....	178
6.11	Synthesen für $\beta$ -Alkohol-SNAC-thioester .....	189
6.12	Synthesen für VCD-Referenzsubstanzen .....	196
6.13	Identifizierte Nebenprodukte .....	207
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>210</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>224</b>
8.1	Auswahl der Kettoreduktase-Domänen .....	224
8.2	Vektorkarten, Gen- und Aminosäuresequenzen.....	228
8.3	Molekularbiologische und Proteinbiochemische Arbeiten .....	244
8.4	Enzymaktivitätstests und –Kinetiken.....	251
8.5	$^1\text{H}$ NMR- und $^{13}\text{C}$ NMR-Spektren.....	252
8.6	Bestimmung der Produktkonfigurationen.....	309
8.7	Chromatogramme der chiralen HPLC.....	313
	<b>Danksagung .....</b>	<b>340</b>
	<b>(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen .....</b>	<b>344</b>



# Abkürzungsverzeichnis

2TY	„ <i>Two Times Tryptone and Yeast Extract</i> “, „Zweifach Trypton und Hefeextrakt“
<i>amb</i> /Amb	Gen oder Domäne/rekombinantes Enzym mit Ursprung aus der Ambruticin-Biosynthese
<i>amp</i> /Amp	Gen oder Domäne/rekombinantes Enzym mit Ursprung aus der Amphotericin-Biosynthese
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i> , chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Äq	Äquivalent
Ar <sub>1</sub>	<i>ipso</i> -Position im aromatischen Ring
Ar <sub>m</sub>	<i>meta</i> -Position im aromatischen Ring
Ar <sub>o</sub>	<i>ortho</i> -Position im aromatischen Ring
Ar <sub>p</sub>	<i>para</i> -Position im aromatischen Ring
ber.	berechnet
bp	<i>base pair(s)</i> , Basenpaar(e)
CDI	1,1-Carbonyldiimidazol
CS	<i>C</i> -Stopp, Gen oder Enzym mit einem <i>C</i> -terminalen, frühen Stoppcodon
CH	<i>C</i> -His <sub>6</sub> , Gen oder Enzym mit einem <i>C</i> -terminalen His <sub>6</sub> - <i>tag</i>
CP	<i>C</i> -Pro <sub>5</sub> , Gen oder Enzym mit einem <i>C</i> -terminalen Pro <sub>5</sub> - <i>tag</i>
C <sub>q</sub>	quartäres Kohlenstoffatom
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMP	DESS-MARTIN-Periodan

DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>dr</i>	<i>diastereomeric ratio</i> , Diastereomerenverhältnis
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
<i>EcoRI</i>	Nuklease I des <i>E. coli</i> Stamm R
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Essigsäureethylester
<i>er</i>	<i>enantiomeric ratio</i> , Enantiomereinverhältnis
<i>ery/Ery</i>	Gen oder Domäne/rekombinantes Enzym mit Ursprung aus der Erythromycin-Biosynthese
ESI	Elektronensprayionisation
FAS	<i>fatty acyl synthase</i> , Fettsäuresynthase
FD	<i>fast digest</i> , hoch aktiv
_F/fwd	<i>forward</i> , Abk. für Vorwärtsprimer
gef.	gefunden
H	<i>n</i> -Hexan
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i> , Hochauflösende Massenspektrometrie
ins	Insertion
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<i>J</i>	Kopplungskonstante in der NMR- Spektroskopie
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
Da	Dalton
KR	Ketoreduktase
<i>lac</i>	<i>lac</i> Operon ( <i>lactose</i> , Laktose)
LB	<i>lysogeny broth</i> , Nährlösung

m	Multipllett
MCS	multiple cloning site, Polylinker
mol%	Stoffmengenanteil
MPW	Milliporewasser, membranfiltriertes Wasser
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> , Molekulargewichtsausschlussgrenze
<i>myc/Myc</i>	Gen oder Domäne/rekombinantes Enzym mit Ursprung aus der Mycolacton-Biosynthese
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
NdeI	Nuklease I von <i>Neisseria denitrificans</i>
NMR	nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanz
NTA	Nitilotriacetat
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
ORF	<i>open reading frame</i> , Leseraster auf der DNA
ori	<i>origin of replication</i> , Replikationsursprung
PDB ID	<i>protein data bank identification code</i> , Proteindatenbank-identifizierungscode
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PE	Petrolether (40 – 60 °C)
Phyre <sup>2</sup>	<i>Protein Homology/analogy Recognition Engine 2.0</i> , Proteinhomologie/Analogie-Erkennungsprogramm 2.0
PKS	Polyketidsynthase
PMB	<i>para</i> -Methoxybenzyl
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	<i>parts per million</i> , Teile pro Million
q	Quartett
_R/rev	<i>reverse</i> , Abk. für Rückwärtsprimer
<i>rop</i>	Gen des Regulatorproteins Rop ( <i>repressor of primer</i> )
RP	<i>reversed phase</i> , Umkehrphase

R <sub>f</sub>	<i>retarding-front</i> , Retentionsfaktor
s	Singulett
SDM	<i>site-directed mutagenesis</i> , ortsgerichtete Mutagenese
SDR	<i>short-chain dehydratases/reductases</i> , kurzkettige Dehydratasen/Reduktasen, Proteinfamilie
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
Spn	Domäne/rekombinantes Enzym mit Ursprung aus der Spinosyn-Biosynthese
Str <sup>R</sup>	Streptomycin-Resistenz
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin-1,2-bis(dimethylamino)ethan
<i>tert</i>	tertiär
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>tyl</i> /Tyl	Gen oder Domäne/rekombinantes Enzym mit Ursprung aus der Tylacton-Biosynthese
UpM	Umdrehung pro Minute
UPLC	<i>ultra high performance liquid chromatography</i> , Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie
VCD	<i>vibrational circular dichroism</i> , Vibrationscirculardichroismus

## Vorbemerkung

Die Benennung der absoluten Konfigurationen von Stereozentren in linearen Intermediaten von Polyketidsynthesen (PKS) oder isolierten Domänen erfolgte im Rahmen dieser Promotionsarbeit nach der FISCHER-ROSANOFF-Konvention. Daher wurden die räumlichen Orientierungen der Substituenten bezüglich des Polyketidrückgrats in die Kategorien D und L in Anlehnung an die Arbeiten von KITSCHKE und KALESSE eingeordnet.<sup>[1]</sup> Die D/L-Nomenklatur eignet sich sehr gut als Basis für Studien an Polyketidsynthase-Domänen nach mechanistischen Gesichtspunkten, da nur die Orientierung der Substituenten Einfluss auf die Kategorisierung nimmt, nicht aber die Wertigkeit der untergeordneten Substituenten wie bei der (*R*)/(*S*)-Nomenklatur nach der CAHN-INGOLD-PRELOG-Konvention.<sup>[2]</sup>



# 1. Einleitung

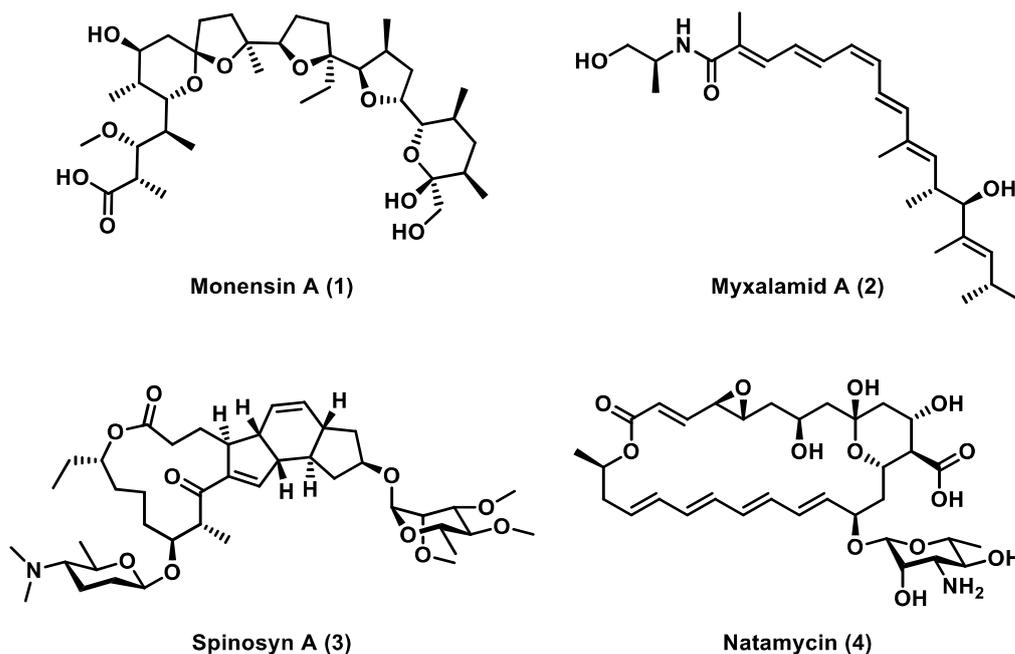
Die Evolution des Lebens begann mit dem Aufbau kombinierter Strukturen aus vorhandenen monomeren Verbindungen. Diese Bausteine von Aminosäuren, Fettsäuren, Kohlenhydraten und Nukleinbasen sind bis heute für alle Lebewesen essentiell.<sup>[3-5]</sup>

Der Primärmetabolismus jeder Zelle generiert aus den zur Verfügung stehenden Ressourcen diese Bestandteile und ermöglicht den Erhalt der lebensnotwendigen Strukturen von Proteinen, Membranen und Nukleinsäuren. Der Zugang zu entsprechenden Quellen an organischen und anorganischen Molekülen wird durch unterschiedliche Strategien ermöglicht. Eine Möglichkeit umfasst die Erzeugung von Substanzen, die dem Organismus einen Vorteil verschaffen oder der Abwehr von Konkurrenz dienen. Die Prozesse zur Bildung dieser Stoffe werden als Sekundärmetabolismus bezeichnet.

Die Gruppe der Sekundärmetabolite umfasst u. a. Alkaloide, Terpene, Polyketide und Glykoside. Mikroorganismen, Pilze, Pflanzen und Tiere produzieren diese Stoffklassen beispielsweise aufgrund deren antibiotischen, antimykotischen, herbiziden oder insektiziden Wirkungen. Die Darstellung dieser Abwehrstoffe benötigt spezielle Biosynthesewege, welche die meist komplexen Verbindungen aufbauen. Der strukturelle Anspruch stellt dabei für die synthetische Herstellung oft eine große Herausforderung dar. Durch die Erforschung der natürlichen Biosynthesewege und einer Verknüpfung synthetischer und biokatalytischer Strategien könnten in Zukunft mehr dieser sekundären Naturstoffe und -derivate für z. B. pharmakologische Anwendungen zugänglich gemacht werden.

Die Polyketide stellen eine Substanzklasse mit breiter pharmakologischer Bedeutung dar. Diese Gruppe von Naturstoffen wird von großen, multifunktionalen Enzymkomplexen produziert, die starke Ähnlichkeit zu den Synthasen der Fettsäurebiosynthese (FAS) zeigen. Die Polyketid-Naturstoffe zeigen eine größere strukturelle Diversität als Fettsäuren und besitzen ein breites Spektrum an pharmakologischen Wirkungen.<sup>[6,7]</sup> So nahmen 2005 Polyketid-basierte Wirkstoffe mit einem Anteil von 20% an den meist verkauften Medikamenten eine überproportionale Stellung ein.<sup>[8,9]</sup>

Die Biosynthese von Polyketiden basiert auf Polyketidsynthasen (PKS), welche mit Hilfe von Coenzym A-vermittelten Malonyleinheiten das Grundgerüsts aufbauen. Die Polyketide erhalten während und nach der Darstellung verschiedene Modifikationen, die die strukturelle Diversität begründen. Die resultierenden Substanzen können antibiotische Polyether wie Monensin A (1) oder Polyene wie Myxalamid A (2) sein. Eine große Polyketidklasse bilden die Makrolide, zu welchen beispielsweise das insektizide Spinosyn A (3) gehört. Kombinationen aus verschiedenen Klassen, wie sich diese z. B. im antimykotischen Natamycin (4) als Makrolid mit Polyen-Strukturen finden lassen, erhöhen darüber hinaus die Vielfalt dieser Naturstoffkategorie (Abbildung 1-1, S. 2).<sup>[10-14]</sup> Die genannten Wirkstoffe werden von Polyketidsynthasen des Typs I produziert. Typ II-Polyketide sind ähnlich stark funktionalisiert und meist aromatisch. Polyketide von Typ III-Systemen sind ebenfalls aromatisch, allerdings geringer funktionalisiert.<sup>[15-17]</sup>



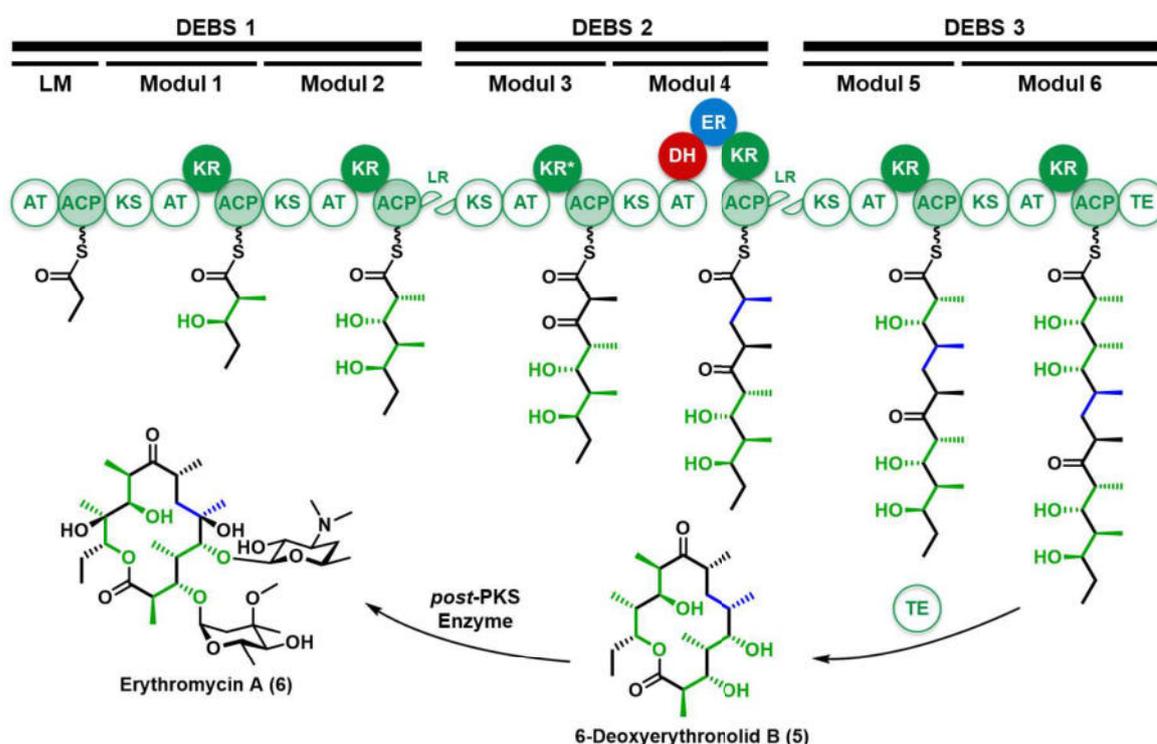
**Abbildung 1-1: Wirkstoffe aus verschiedener Polyketidklassen.**

Monensin A (1, antibiotischer Polyether), Myxalamid A (2, antibiotisches Polyen), Spinosyn A (3, insektizides Makrolid) und Natamycin (4, antimykotisches Makrolid-Polyen).<sup>[10-14]</sup>

Die Polyketid-Biosynthese bietet auf Ebene der Polyketidsynthasen interessante Zugänge zu Derivaten, aber auch die einzelnen katalytischen Domänen und die *post*-PKS agierenden Proteine vermögen als rekombinante Enzyme Modifikationen zu erzeugen. Die biokatalytische Einbindung in Syntheserouten kann dabei zu erhöhten Selektivitäten und umweltfreundlicheren Prozessen führen.<sup>[18,19]</sup>

## 1.1 Polyketide und Polyketidsynthese-Systeme des Typs I

Die genannten Naturstoffe Monensin A (1), Myxalamid A (2), Spinosyn A (3) und Natamycin (4), sowie alle folgenden Polyketide werden von modularen Polyketidsynthese-Systemen des Typs I dargestellt. Die Typ I-Systeme setzen sich meist aus mehrerer Proteinen zusammen, welche über endständige Linkerregionen verbunden sind.<sup>[20]</sup> Die aufzubauende Polyketidkette ist über die prosthetische 4'-Phosphopantetheinylgruppe an die Acylträgerprotein-Domäne (*Acyl Carrier Proteine*, ACP) gebunden. Die ACPs führen die Polyketidkette durch die Module, wobei in kanonischen PKS ausgehend vom Start- bzw. Lademodul jedes weitere Modul einen Elongationsschritt vollführt und verschiedene Modifikationen einfügen kann (Schema 1-1, S. 3). Im letzten Modul der Assemblierungslinie wird die Polyketidkette durch die Thioesterase-Domäne (TE) freigesetzt. Dies kann unter Hydrolyse zu einer freien Carbonsäure (Ambruticin (40), Abbildung 3-1, S. 17) oder Ringchluss (Erythromycin A (6), Schema 1-1, S. 3) geschehen.<sup>[6,21,22]</sup> Nach der Abspaltung kann das Polyketid durch *post*-PKS-agierende Enzyme zusätzlich modifiziert werden.<sup>[23]</sup>



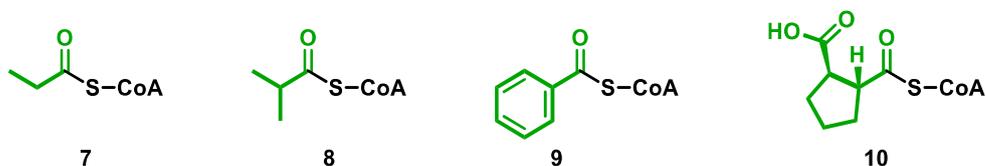
**Schema 1-1: Biosyntheseweg von Erythromycin A (6).**

Die Elongationsmodule aus DEBS 1, DEBS 2 und DEBS 3 bauen schrittweise die Polyketidkette inklusive verschiedener Modifikationen auf. Die Thioesterase-Domäne (TE) des Elongationsmoduls 6 spaltet die Polyketidkette ab und bildet einen Makrozyklus, sodass des 6-Deoxyerythronolid B (5) entsteht. Die anschließenden *post*-PKS-Modifikationen (Oxidation, Glykosylierung) finalisieren die Biosynthese. LM: Lademodul; LR: Linkerregion; KR\*: reduktionsinaktive Ketoreduktase-Domäne des Typs C2.<sup>[6,22]</sup>

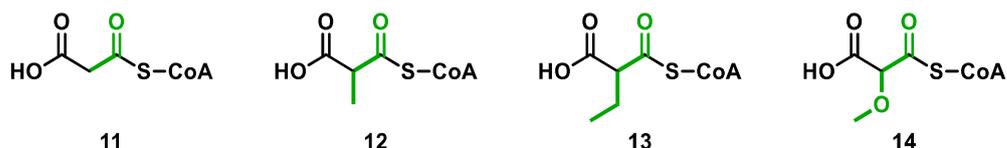
## Biosynthese der Polyketidkette

Die für den Aufbau einer Polyketidkette essentiellen Domänen eines Elongationsmoduls sind die Ketosynthase- (KS), Acyltransferase- (AT) und ACP-Domäne. Das Lademodul jedes PKS-Systems bestimmt die Starteinheit, welche in den darauffolgenden Modulen durch verschiedene C<sub>2</sub>-Einheiten verlängert wird. Die Auswahl der Starteinheit des Lademoduls erfolgt in *cis*-AT-Systemen durch die modulintegrierten AT; gleiches gilt auch für die Verlängerungseinheiten in späteren Modulen. Bei *trans*-AT-Systemen belädt eine separate, *trans*-agierende AT die Module.<sup>[24,25]</sup> In den Biosynthesen von Tylosin (**48**, Abbildung 3-1, S. 17) und Lipomycin werden die aktivierten Starteinheiten Propionyl-(**7**) und *iso*-Butyryl-CoA (**8**) verwendet (Abbildung 1-2 A, S. 4).<sup>[26,27]</sup> Es gibt allerdings auch komplexere Strukturen wie das aromatische Benzyl-CoA (**9**) oder das Cyclopentyl-basierte CoA-Derivat **10**.<sup>[28,29]</sup> Die Elongationseinheiten eines PKS-Systems können in der  $\alpha$ -Position variieren. Das unverzweigte Malonyl-CoA **11** (Abbildung 1-2 B, S. 4) findet sich z. B. in der Amphotericin-Biosynthese (**38**, Abbildung 3-1, S. 17).<sup>[30]</sup> Das  $\alpha$ -methylierte Derivat **12** ist hingegen der einzige Baustein, der bei der Biosynthese von Erythromycin (**6**) verwendet wird. Beispiele für seltenere Elongationsbausteine sind Ethylmalonyl- und Methoxymalonyl-CoA (**13** und **14**).<sup>[6,31]</sup> Die AT bindet unabhängig vom Baustein diesen über ein Serin und überträgt die Verlängerungseinheit auf den Phosphopantethein-Rest der ACP.<sup>[32,33]</sup>

### A



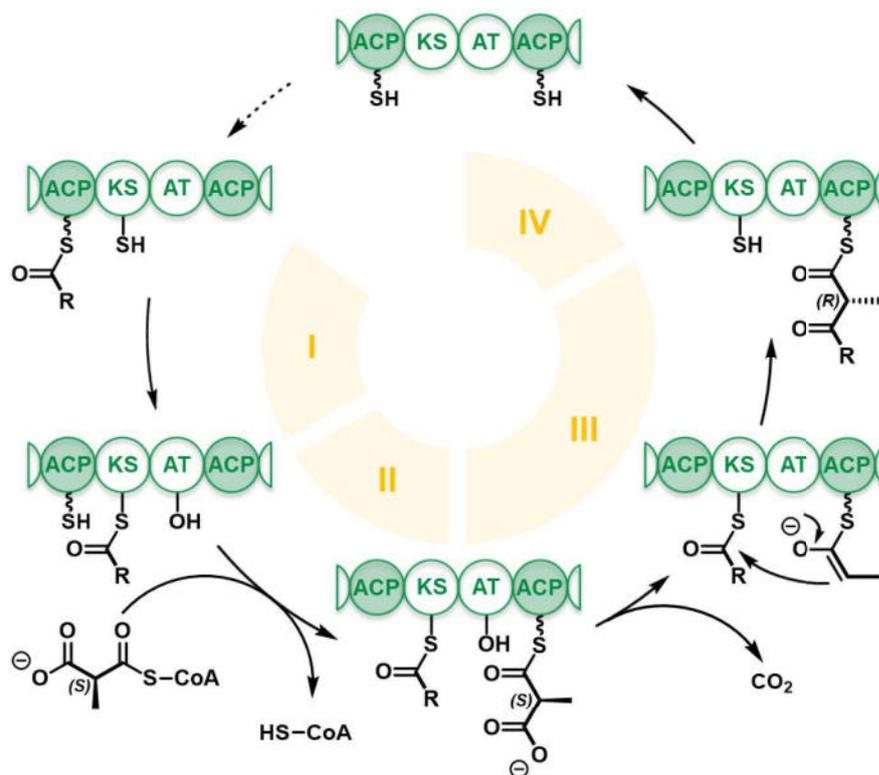
### B



**Abbildung 1-2: Auswahl von Start- und Elongationsbausteinen der Polyketid-Biosynthese.**

A) Propionyl-CoA **7** (Tylosin (**48**)), *iso*-Butyryl-CoA **8** (Lipomycin), Benzyl-CoA **9** (Soraphen (**193**)\*), (1*R*,2*R*)-2-Cyclopentylcarbonsäure-CoA **10** (Borrelinin (**175**)\*). B) Auswahl von Elongationsbausteinen der Polyketid-Biosynthese. Malonyl-CoA **11** (Amphotericin (**38**)), Methylmalonyl-CoA **12** (Erythromycin (**6**)), Ethylmalonyl-CoA **13** (Elaiophyllin (**178**)\*) und Methoxymalonyl-CoA **14** (Concanamycin (**177**)\*). Strukturen in grün bleiben im Naturstoff erhalten.<sup>[6,26–33]</sup> \*Abbildung 8-1, S. 224.

Der Kreislauf der Kettenverlängerung innerhalb eines Moduls beginnt mit der Übernahme der Polyketidkette des vorherigen Moduls durch die KS. Nach dieser ersten Translokation (Schritt I, Schema 1-2, S. 5) verbleibt die Polyketidkette gebunden am Cystein des aktiven Zentrums der KS bis die AT die modulinterne ACP mit dem Elongationsbaustein beladen hat (Schritt II). Während des darauffolgenden Schrittes wird das ACP-gebundene Malonat-Decarboxyliert und der C-C-Bindungsaufbau erfolgt über den nucleophilen Angriff an die Thioester-Funktionalität der KS-gebundenen Polyketidkette mittels decarboxylativer CLAISEN-Kondensation (Schritt III). Mit der Kettenübernahme durch die KS des Folgemoduls wird der Zyklus beendet (Schritt IV). Jedes Elongationsmodul führt einen Elongationsschritt durch; einzelne Module können aber auch iterativ arbeiten. Die iterative Verlängerung ist eigentlich typisch für PKS des Typs II, findet sich aber z. B. auch im fünften Modul der Borrelidin-Biosynthese (**175**). In jedem Durchgang erfolgen dabei ebenfalls Modifikationen durch die zusätzlichen, optionalen Domänen.<sup>[34]</sup>

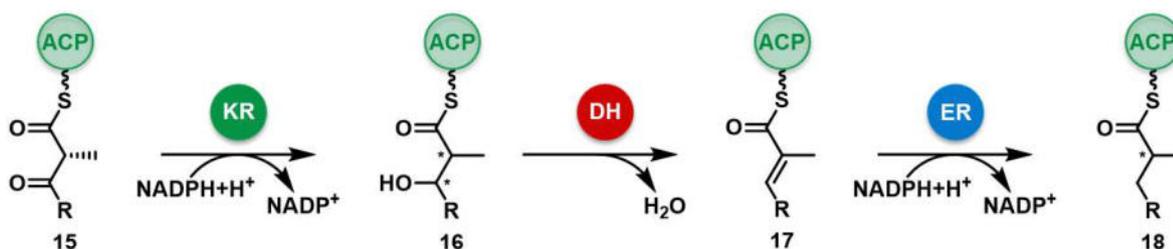


**Schema 1-2: Einzelschritte des Elongationsprozesses der Polyketid-Biosynthese.**

(I) Die Ketosynthase (KS) übernimmt die Polyketidkette des vorherigen Moduls. (II) Die Acyltransferase (AT) belädt das Acylträgerprotein (ACP) des eigenen Moduls mit dem gewählten Elongationsbaustein (hier: Methylmalonat **11**). (III) Die KS decarboxyliert das gebundene Malonat und baut eine neue C-C-Bindung auf (decarboxylativer CLAISEN-Kondensation). (IV) Die KS des folgenden Moduls übernimmt die Polyketidkette. Cystein: -SH; Serin: -OH; Phosphopantethein: ~SH.<sup>[34]</sup>

## Modifikationen der Polyketidkette

Die häufigsten Modifikationen während der Polyketid-Biosynthese erfolgen durch die Domänen der reduktiven Schleife. Zu diesen gehören die Ketoreduktase- (KR), Dehydratase- (DH) und Enoylreduktase-Domäne (ER) (Schema 1-3, S. 6). Die Domänen sind dabei in der genannten Reihenfolge aktiv, wobei die vollständige Domänen-Triade nur optional ist. Die KR reduziert als erste Domäne den zuvor verlängerten und ACP-gebundenen  $\beta$ -Ketothioester **15** unter Verwendung des Cofaktors NADPH. Die Reduktion erfolgt für die  $\beta$ -Position stereoselektiv, wobei zusätzlich die vorläufige Konfiguration der  $\alpha$ -Position selektiv festgelegt werden kann. Die absolute Stereoinformation geht anschließend bei der  $\beta$ -Eliminierung durch die DH verloren und das resultierende Olefin **17** wird im letzten Schritt von der NADPH-abhängigen ER zum gesättigten Alkan **18** reduziert. Die ER agiert dabei ebenfalls stereoselektiv bei einer vorhandenen  $\alpha$ -Substitution.<sup>[35]</sup>



### Schema 1-3: Die drei Schritte einer vollständigen reduktiven Schleife.

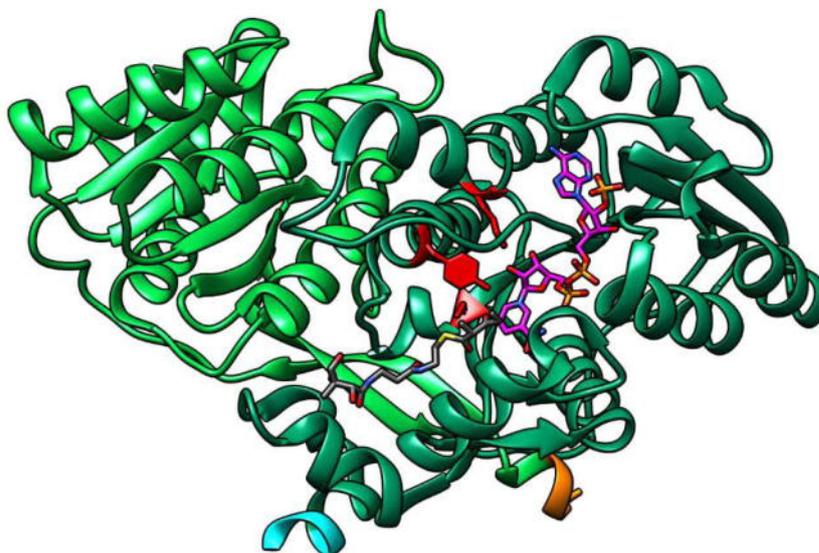
Die Ketoreduktase-Domäne (KR) reduziert den ACP-gebundenen  $\beta$ -Ketothioester **15** zum  $\beta$ -Alkohol **16**. Anschließend erfolgt die  $\beta$ -Eliminierung von Wasser durch die Dehydratase-Domäne (DH) und das entstandene Olefin **17** wird von der Enoylreduktase-Domäne (ER) zum gesättigten Alkan **18** reduziert. Die Reduktionen der KR und ER erfolgen stereoselektiv.

Methyltransferasen stellen eine weitere Gruppe von modifizierenden Domänen dar. Diese können  $\alpha$ -Methylierungen sowohl *cis*- als auch *trans*-agierend einfügen oder nach Abspaltung der Kette von der PKS eine *O*-, *N*- oder *C*-Methylierung durchführen.<sup>[36,37]</sup> Manche PKS-Domänen besitzen auch zusätzliche Aktivitäten. So sind DHs bekannt, die auch als Pyrancyclasen (Ambruticin (**40**)) agieren oder eine Doppelbindungsverschiebung bewirken (Ansamitocin).<sup>[38,39]</sup>

Weitere PKS-Domänen oder *post*-PKS-Enzyme (*Tailoring*-Enzyme) können darüber hinaus Epoxidierungen und andere Oxidationen, sowie Reduktionen, Aminierungen oder Halogenierungen bewirken.<sup>[23,40]</sup>

## 1.2 Ketoreduktase-Domänen

Die Ketoreduktase-Domäne ist die erste Domäne der reduktiven Schleife innerhalb eines PKS-Moduls und besitzt eine zentrale Bedeutung für die Konfiguration des Biosynthese-Produkts. Die KR-Domäne generiert mit hoher Stereoselektivität mindestens ein Chiralitätszentrum. PKS-KRs bestehen aus einer katalytischen und einer stabilisierenden Untereinheit (Abbildung 1-3, S. 7). Diese müssen in der Aminosäuresequenz nicht zwingend in direkter Abfolge liegen, sondern können durch eine vorhandene ER-Domäne getrennt sein.<sup>[41]</sup> Innerhalb eines korrekt gefalteten Moduls bilden beide Teile wieder eine Einheit. Beide Untereinheiten besitzen eine ROSSMANN-Faltung, wobei die Faltung in der stabilisierenden Untereinheit degeneriert vorliegt und nur die katalytische Domäne den Cofaktor Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) binden kann. Aufgrund weiterer Sequenzhomologien werden die KR-Domänen der Familie der kurzkettigen Dehydrogenasen bzw. Reduktasen (*Short Chain Dehydrogenases/Reductases*, SDR) zugeordnet.<sup>[42-45]</sup>

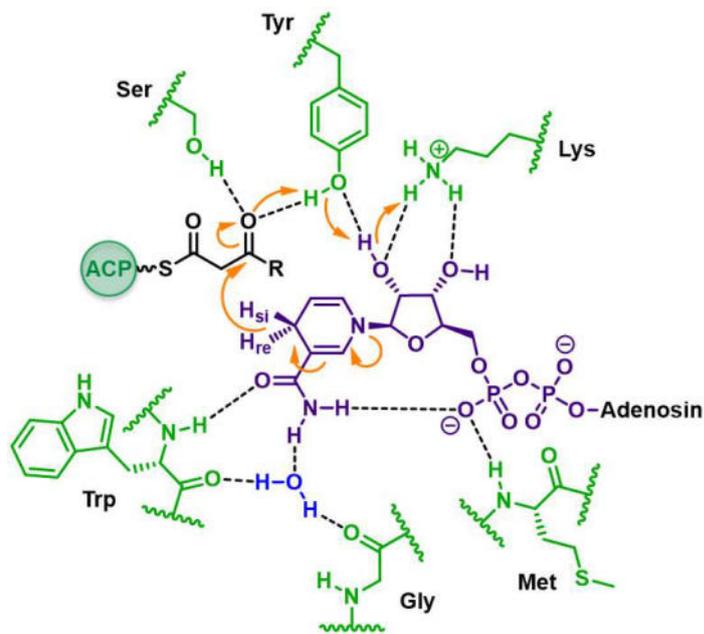


**Abbildung 1-3: Kristallstruktur der Ketoreduktase-Domäne AmpKR2.**

Stabilisierende (hellgrün, linke Hälfte) und katalytische Untereinheit (dunkelgrün, rechte Hälfte). Der Cofaktor NADPH (violett) befindet sich in der aktiven Tasche, und links davon das pantetheinylierte Substrat (grau). Die Aminosäuren Tyrosin, Serin und Lysin des aktiven Zentrums sind rot markiert (PDB: 5XWV).<sup>[46]</sup>

Die Reduktion des Phosphopantethein-gebundenen Substrats erfolgt, sobald die ACP die zuvor verlängerte Polyketidkette in die Interaktionsgrube der KR-Domäne positioniert. In dieser befindet sich bereits der Cofaktor und präsentiert das *si*-Hydrid der Nikotinsäure dem aktiven Zentrum. Das katalytische Zentrum besteht darüber hinaus aus der konservierten Triade der Aminosäuren Tyrosin, Serin und Lysin, wobei Tyrosin und Lysin an der

Bindung des Cofaktors beteiligt sind (Schema 1-4, S. 8). Die Reduktion erfolgt über die Aktivierung des  $\beta$ -Carbonyls mittels Wasserstoffbrückenbindungen vom Tyrosin und Serin zum Carbonylsauerstoff und der Bereitstellung des zum Carbonylkohlenstoff ausgerichteten *si*-Hydrids des Cofaktors.<sup>[43,47]</sup> Die Konfiguration des entstandenen, sekundären Alkohols hängt dabei von der Orientierung des Substrats im katalytischen Zentrum ab. Die Produktkonfiguration spiegelt sich dabei in der Aminosäuresequenz wider, welche die Interaktion mit der ACP und somit die Orientierung des Substrates beeinflusst.

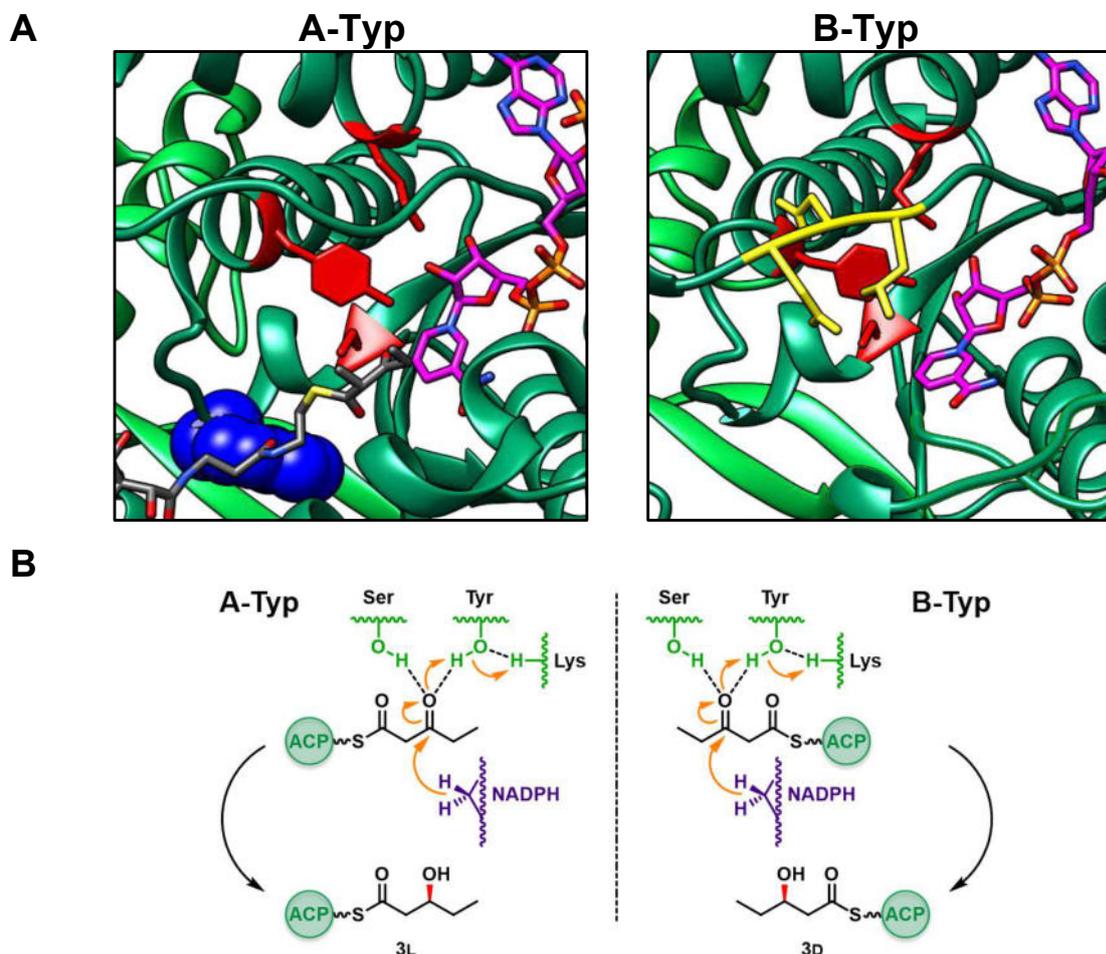


**Schema 1-4: Aktives Zentrum einer Ketoreduktase-Domäne.**

Das ACP-gebundene Substrat (schwarz) wechselwirkt über den Carbonylsauerstoff mit den konservierten Aminosäuren Serin und Tyrosin mittels Wasserstoffbrückenbindungen und das *si*-Hydrid des Cofaktors (violett) kann übertragen werden.<sup>[43,47]</sup>

Die KR-Hauptkategorien werden dabei dem lateinischen Alphabet nach als A- und B-Typ bezeichnet. Die Reduktionsprodukte des A-Typs besitzen einen 3L-konfigurierten Alkohol, da die ACP das Substrat von der Seite in die KR-Domäne führt, die der stabilisierten Untereinheit zugewandt ist. In A-Typ-KRs befindet sich auf dieser Seite der aktiven Tasche ein konserviertes Tryptophan. Dieses Tryptophan ist in den KR-Domänen des B-Typs nicht zu finden. Hingegen besitzen B-Typ-KR in dieser Region ein konserviertes LDD-Motiv, welches auf dieser Seite die Interaktion mit der ACP stört und die aktive Tasche nur aus der Richtung zugänglich ist, die der stabilisierenden Untereinheit abgewandt liegt (Schema 1-5; S. 9). Die Produkte der KR-Domänen des B-Typs besitzen

daher für den  $\beta$ -Alkohol eine D-Konfiguration. Auf dieser Basis ist eine Vorhersage der  $\beta$ -Produktkonfiguration direkt aus der Aminosäuresequenz der Domäne möglich.<sup>[1,43,47,48]</sup>

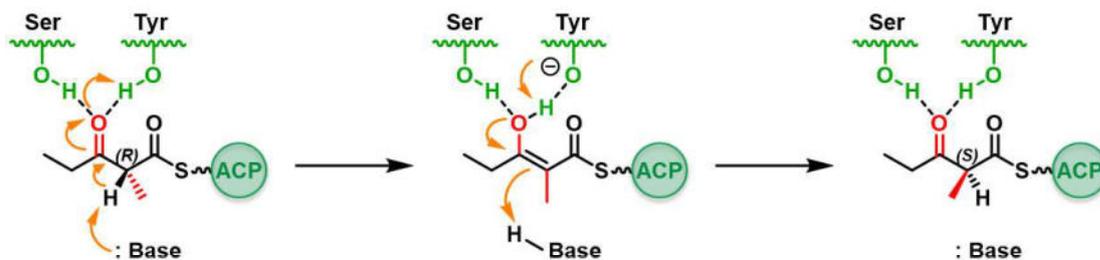


**Schema 1-5: Aktive Zentren der beiden KR-Hauptkategorien.**

A) Vergrößerung der Kristallstrukturen von AmpKR2 (A1-Typ) und EryKR1 (B2-Typ). B) Das Hydrid in KR-Domänen des A-Typ (linke Seite) gelangt von der *re*-Seite an den Carbonylkohlenstoff. Das Reduktionsprodukt ist 3L-konfiguriert. Bei B-Typ-KRs (rechte Seite) erfolgt dies von der *si*-Seite und es wird das 3D-Produkt erhalten.<sup>[43,46,49]</sup>

Die KR-Domänen mit einem  $\alpha$ -unsubstituierten Substrat werden als A0- und B0-Typ bezeichnet. Besitzt das Substrat z. B. eine Methylgruppe in  $\alpha$ -Position, so werden weitere Subtypen eingeteilt. Es ergeben sich je zwei Subtypen für jede Hauptkategorie, welche durch arabische Ziffern unterschieden werden. Die Subtypen A1 und B1 erhalten die 2D-Konfiguration der  $\alpha$ -Position bei, wie diese im Elongationsprodukt vorhanden ist. Die  $\alpha,\beta$ -Konfiguration des A1-Typ ist somit 2D3L und die für den B1-Typ 2D3D. Im Fall der Subtypen A2 und B2 erfolgt vor der Reduktion eine Epimerisierung der  $\alpha$ -Position, welche in einer 2L-Konfiguration im Reduktionsprodukt resultiert (Schema 1-7, S. 10). Ein 2L3L-Motiv wird daher dem A2-Typ und ein 2D3L-Motiv dem B2-Typ zugeschrieben. Die Epimerisierung erfolgt dabei unter anderem über Tyrosin und Serin des aktiven Zentrums

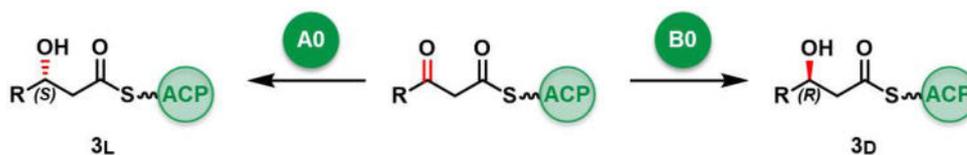
(Schema 1-6, S. 10). Darüber hinaus finden sich bei vielen epimeraseaktiven KR-Domänen in der Nachbarschaft ein Histidin (A2-Typ) oder ein Prolin (B2 Typ) unbekannter Funktion.<sup>[50-52]</sup> Unter Einbezug weiterer Aminosäuren konnten allerdings Korrelationen ermittelt werden, die eine Vorhersage der  $\alpha$ -Produktkonfiguration ermöglichen können.<sup>[1]</sup>



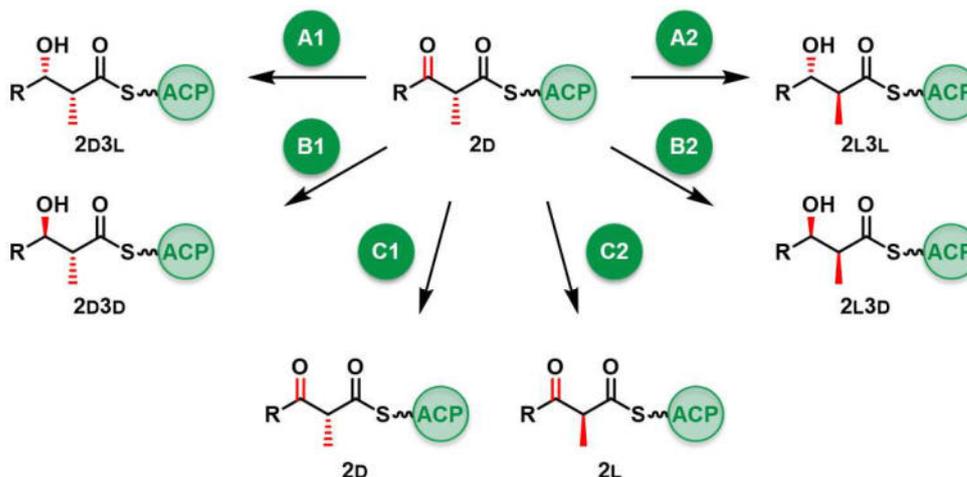
Schema 1-6: Postulierter Ablauf der Epimerisierung in den KR-Domänen des Typs A2, B2 und C2.<sup>[50]</sup>

Der C2-Typ stellt einen weiteren KR-Typ mit Epimeraseaktivität dar. Die bisher nicht genannte Hauptkategorie C umfasst reduktionsinaktive KR-Domänen, die kein NADPH fixieren können. C2-KRs bewirken daher einzig eine Chiralitätsumkehr der  $\alpha$ -Position, wie z. B. im Modul 3 der Erythromycin-Biosynthese (Schema 1-1, S. 3).<sup>[53,54]</sup> KR-Domänen des C1-Typs sind sehr selten und besitzen weder eine reduktive, noch eine epimerisierende Aktivität.<sup>[49,55]</sup> Nichtsdestotrotz findet sich eine solche C1-Domäne im Modul 3 der Elaiophylin-Biosynthese und ermöglicht so einen intramolekularen Ringschluss.<sup>[56]</sup>

A



B



Schema 1-7: Kategorien der Ketoreduktase-Domänen und zugehörige Produktkonfigurationen. A) Reduktionen eines unverzweigten Substrats. B) Reduktionen eines verzweigten Substrats.<sup>[45,49,55]</sup>

## Biokatalytische Verwendung von rekombinanten KR-Domänen

Die Verwendung von rekombinanten PKS-KR-Domänen wurde in zahlreichen Studien untersucht. Hierfür war es von Nutzen, dass KR-Domänen nicht nur ACP-gebundene Substrate akzeptieren, sondern auch Substrate mit einem Pantethein- oder *N*-Acetylcysteamin-Rest (-SNAC), welcher dem *S*-terminalen Ende des Pantetheins entspricht (Abbildung 1-4, S. 11). Die KR-Domänen zeigten auch bei entsprechenden SNAC-Substraten eine hohe Stereoselektivität.<sup>[57-61]</sup>

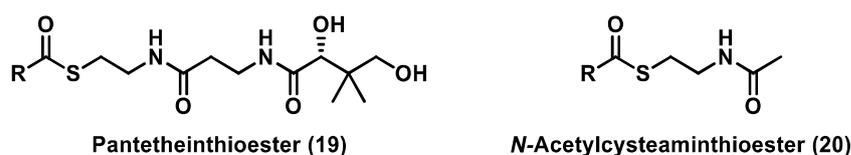
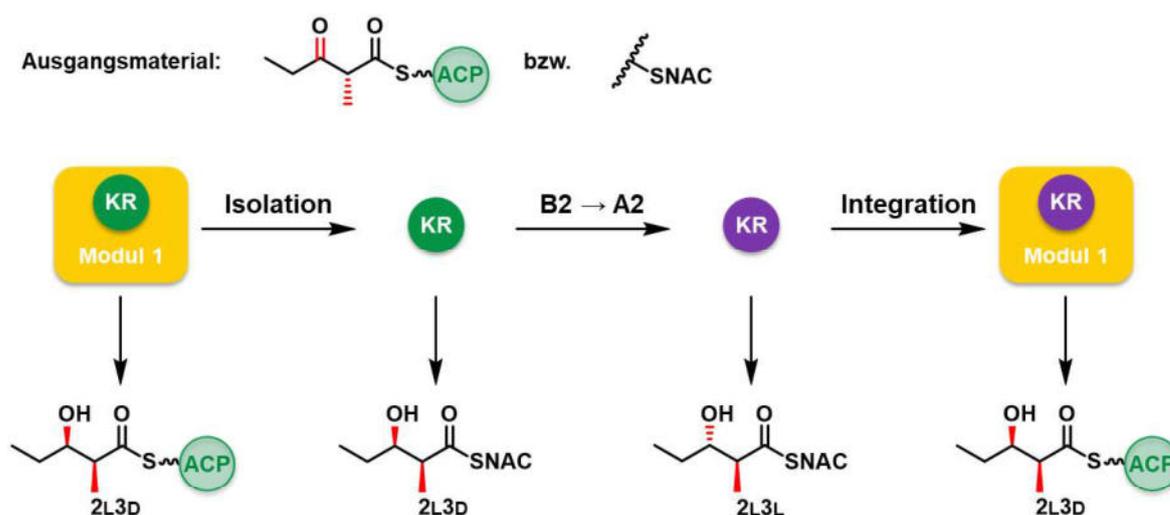


Abbildung 1-4: Struktur eines Pantetheinthioesters (19) und eines *N*-Acetylcysteaminthioesters (20).

Die reduktionsaktiven Kettoreduktase-Domänen können als rekombinante Biokatalysatoren somit den Zugang zu vier  $\alpha$ -methylierten Produktisomeren ermöglichen. Die rationale Unterscheidung auf Grundlage der Aminosäuresequenz hilft bei der Wahl einer geeigneten KR für eine angestrebte Produktkonfiguration.<sup>[45,62]</sup> Allerdings gilt dies vorzugsweise für die rekombinanten, isolierten KR-Domänen, wie LEADLAY *et al.* zeigen konnte. Eingelegte Mutationen, die bei der rekombinanten KR die Bildung eines anderen Isomers bewirkten, erzeugten nicht denselben Effekt beim modulintegrierten Äquivalent (Schema 1-8, S. 11).<sup>[63]</sup>

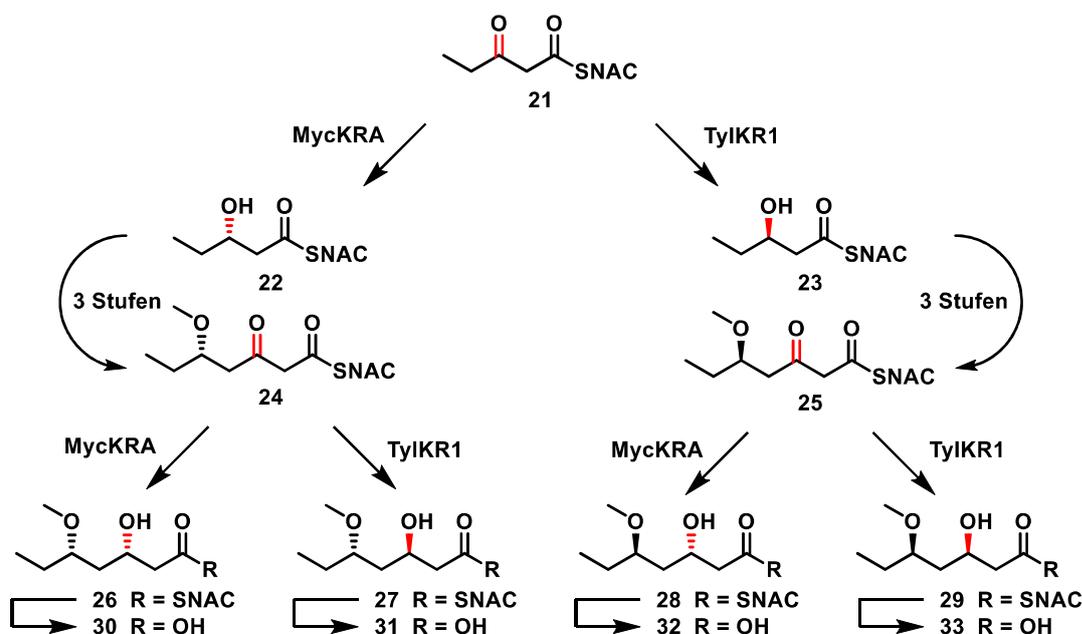


Schema 1-8: Experimente und Ergebnisse der Untersuchungen von LEADLAY *et al.*

Mit EryKR1 in Hinblick auf konservierte Sequenzen, welche den A- und den B-Typ unterscheiden: Die rekombinante EryKR1 (B2-Typ, grün) erzeugte dieselbe Produktkonfiguration wie die modulintegrierte Domäne (2L3D). Die Erzeugung einer A2-Typ-entsprechenden EryKR1-Mutante (violett) führte zur Darstellung des 2L3L-Isomers. Lag die Mutante integriert im ursprüngliche Modul vor, so wurde das 2L3D-Produkt erhalten.<sup>[63]</sup>

Die Einflüsse auf die Konformation der Domäne und damit einhergehend der Produktkonfiguration sind somit vielschichtig und spiegeln die starke Interaktion zwischen den verschiedenen Domänen in PKS-Systemen wider.<sup>[64,65]</sup>

Die hohe Stereoselektivität von rekombinanten KR-Domäne machte sich ZHANG *et al.* zu Nutze und integrierte die Domänen MycKRA (A-Typ) und TyIKR1 (B-Typ) in eine chemoenzymatische Route zur Synthese der Triketide **30** – **33** mit zwei Stereozentren (Schema 1-9, S. 12). Die Ausbeuten über vier synthetische und zwei biokatalytische Stufen liegen bei 1 bis 2%. Gleichzeitig liegen die angestrebten SNAC-Isomere **26** – **29** in jedem Isolat mit einem Anteil von  $\geq 90\%$  vor und unterstreichen damit das Potential der PKS-KRs als stereoselektive Biokatalysatoren.<sup>[66]</sup>

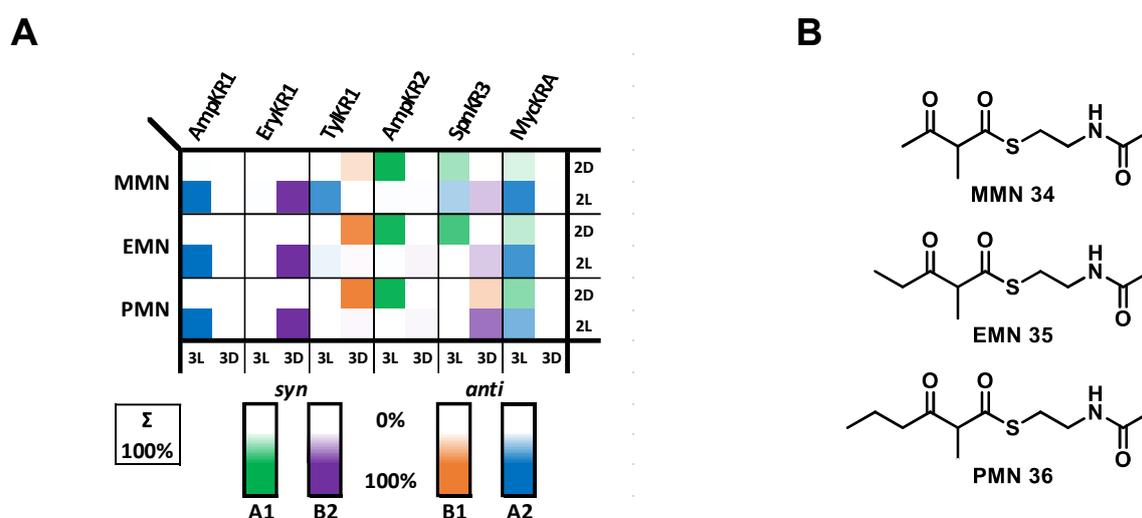


**Schema 1-9: Chemoenzymatische Synthesen der Triketide **30**, **31**, **32** und **33** nach ZHANG *et al.***

Unter Einbezug der KR-Domänen MycKRA (A-Typ) und TyIKR1 (B-Typ) in jeweils zwei Stufen. Ausbeute über sechs Stufen: **30** (2.0%), **31** (1.3%), **32** (1.7%) und **33** (0.9%). Anteil des angestrebten SNAC-Isomers: **26** (91%), **27** (96%), **28** (90%), **29** (96%).<sup>[66]</sup>

Die stereoselektive Reduktion von einfachen SNAC-Substraten durch rekombinante KR-Domänen konnte somit erfolgreich gezeigt werden, auch wenn bisher nicht sämtliche Einflüssebenen innerhalb der Domänen verstanden sind. Um einen tieferen Einblick zu gewinnen, wurden von KEATINGE-CLAY *et al.* Studien durchgeführt, welche den Einfluss von unterschiedlich langen Polyketidstrukturen auf die Stereoselektivität untersuchten. Es konnte gezeigt werden, dass eine Variation der Polyketidkettenlänge des Substrats bei

TylKR1 und SpnKR3 eine Veränderung der Stereoselektivität bewirken (Abbildung 1-5, S. 13). Die Größe des Polyketidrestes kann demnach die Orientierung des Substrats in der aktiven Tasche beeinflussen, wodurch ein Wechsel z. B. von einer 3L- zu einer 3D-Konfiguration des Reduktionsprodukts erfolgen kann.<sup>[57]</sup> Dabei wurde bisher noch nicht beleuchtet, ob auch weitere KR-Domänen eine Verschiebung der Stereoselektivität unterlaufen, wenn diese mit entsprechenden SNAC-Substraten getestet werden, welche größere Polyketidstrukturen oder andere Modifikationen besitzen.



**Abbildung 1-5: Auswahl der von KEATINGE-CLAY *et al.* untersuchten Enzym-Substrat-Kombinationen.**

A) Darstellung der Stereoisomerenanteile im Reduktionsprodukt. B) Strukturen der u. a. einbezogenen SNAC-Substrate MMN 34, EMN 35 und PMN 36.<sup>[57]</sup>

### 1.3 Polyole Strukturen in Naturstoffen

Eine der häufigsten Motive in Polyketid-Naturstoffen sind Diole oder Polyole mit geradem Substitutionsabstand. Die sekundären Alkohole erhöhen die Löslichkeit und sind aufgrund der konfigurationsstabilen  $sp^3$ -Hybridisierung ein Chiralitätselement, welches Auswirkungen auf die Stabilität der Naturstoffkonformation hat. Amphotericin B (**38**) ist vermutlich eines der bekanntesten Vertreter dieser Klasse, da es als gängiges Antimykotikum mit einem breitem Wirkspektrum große pharmakologische Bedeutung hat. Die Polyole Amphidinol 3 (**37**) und (+)-Roxaticin (**39**) (Abbildung 1-6, S. 14) besitzen denselben Wirkmechanismus wie Amphotericin B und bilden in den Membranen ionophore Poren aus mehreren Wirkstoffmolekülen.<sup>[30,67]</sup> Im Fall von Amphotericin B

interagieren die Polyen-Strukturen und der Zucker mit Molekülen der Doppelmembran, während die polyolen Strukturmodule nach innen gewandt eine Öffnung mit polare Umgebung erzeugen, welche zu einem ungehinderten Ionenaustausch führt.<sup>[68]</sup>

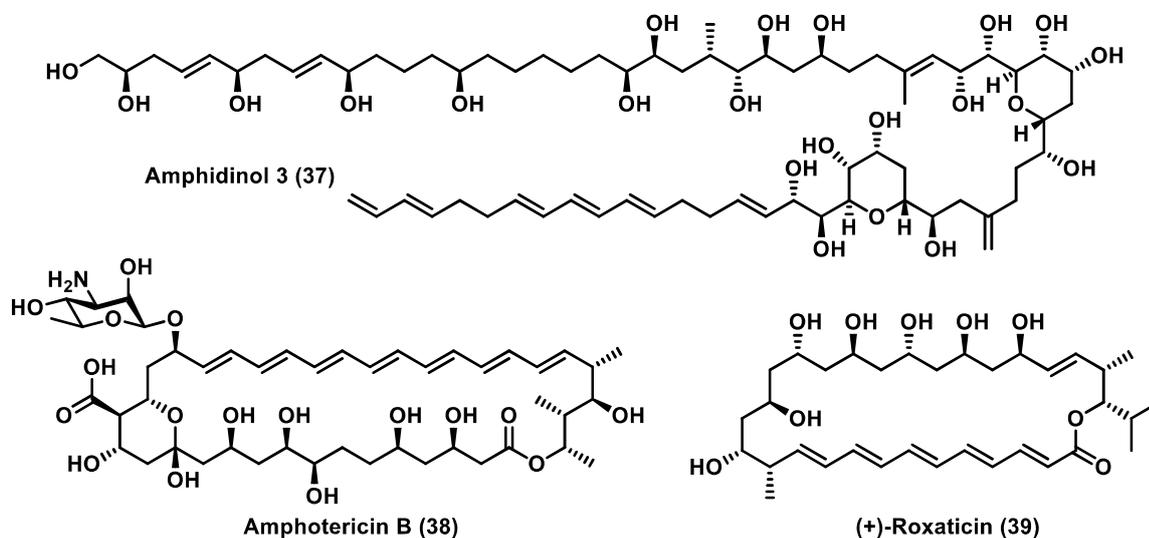


Abbildung 1-6: Polyol-Naturstoffe Amphidinol 3 (37), Amphotericin B (38) und (+)-Roxaticin (39).<sup>[30,67]</sup>

Die stereokontrollierte Darstellung großer polyoler Strukturen ist bis heute eine besondere synthetische Herausforderung.<sup>[69,70]</sup> Auf der einen Seite sind bestimmte Reaktionstypen wie die Aldolreaktion und Allylierungen/Crotylierungen mittlerweile in vielen Varianten erschlossen, wodurch eine gewisse Anzahl synthetischer Methodiken zur Verfügung steht. Auf der anderen Seite macht der immanent hohe Funktionalisierungsgrad von Polyolen oft komplexe Schutzgruppenstrategien notwendig. Zudem nimmt die Stereoselektivität ansonsten gut etablierter Reaktionen oft mit steigender Kettenlänge erkennbar ab. Die Darstellung enantiomerenreiner Verbindungen könnte daher vom Einsatz hoch stereoselektiver Biokatalysatoren mit breiter Substrattoleranz profitieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Substrat-abhängige Stereoselektivität von KR-Domänen eingehender untersucht werden, über welche teilweise bereits berichtet wurde.<sup>[58]</sup> Das angestrebte, bessere Verständnis ist nicht nur für eventuelle biokatalytische Verwendungen von KR-Domänen *in vitro* essentiell, sondern auch für *PKS-Engineering*, mit dem sich modifizierte Polyketidstrukturen *in vivo* herstellen lassen.

## 2. Zielsetzung

Ketoreduktase-Domänen aus Polyketidsynthasen (PKS) sind für einen Großteil der Stereozentren in reduzierten Polyketiden verantwortlich. Dementsprechend sind sie ein primärer Ansatzpunkt im Rahmen des gerichteten Konstruierens von PKS-Systemen und besitzen Potential als biokatalytische Werkzeuge innerhalb moderner Synthesestrategien.

Die angestrebten Studien sollten die substratabhängige Stereoselektivität ausgewählter Ketoreduktase-Domänen bei Reaktion mit verschiedenen natürlichen und nicht-natürlichen Substratsurrogaten untersuchen. Hierfür sollte die Genexpression und Isolierung von mindestens sechs rekombinanten Ketoreduktase-Domänen etabliert werden, die die reduktionsaktiven PKS-Ketoreduktasen abdecken. Parallel dazu sollte nach einer probaten Synthesestrategie für  $\beta$ -Keto- $\alpha$ -methyl-Verbindungen gesucht werden. Diese sollte unter milden Bedingungen ein breites Substratspektrum zugänglich machen. Eine Derivatisierung wurde daher auf einer möglichst späten Synthesestufe angestrebt.

Auf Basis der ersten rekombinanten Ketoreduktase-Domänen und einem einfachen  $\beta$ -Keto- $\alpha$ -methyl-Substrat galt es geeignete Messmethoden zu etablieren. Da die Reaktion von PKS-Ketoreduktasen NADPH-abhängig ist, sollte die zeitliche Verfolgung unkompliziert mittels UV/VIS-Spektroskopie erfolgen und quantifizierbar gemacht werden. Das Ziel bei der anschließenden Analyse der Reduktionsprodukte war die Bestimmung der absoluten Konfigurationen der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Position.

Die Auswertung der Enzymaktivitätstests mit einer hohen Anzahl verschiedener Enzym-Substrat-Kombinationen sollte eine Einschätzung zu den Stereoselektivitäten der eingesetzten Ketoreduktase-Domänen ermöglichen. Der zentrale Fokus lag dabei auf der Stereoselektivität der gewählten Ketoreduktase-Domänen und inwieweit diese vom Substitutionsmuster der verschiedenen Substrate abhängig ist.



## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Auswahl der Ketoreduktase-Domänen

Die Studien zu rekombinanten Ketoreduktase-Domänen aus PKS-Systemen waren angedacht ein breites Spektrum an PKS-KR-Domänen widerzuspiegeln. Die Zusammenstellung sollte die sechs katalytisch-aktiven KR-Typen A0/1/2 und B0/1/2 beinhalten und gleichzeitig KR-Domänen aus frühen und späten PKS-Modulen einbeziehen. Die erste Auswahl wurde auf Grundlage einer ausführlichen Literaturrecherche getroffen und durch *in silico*-Studien spezifiziert.

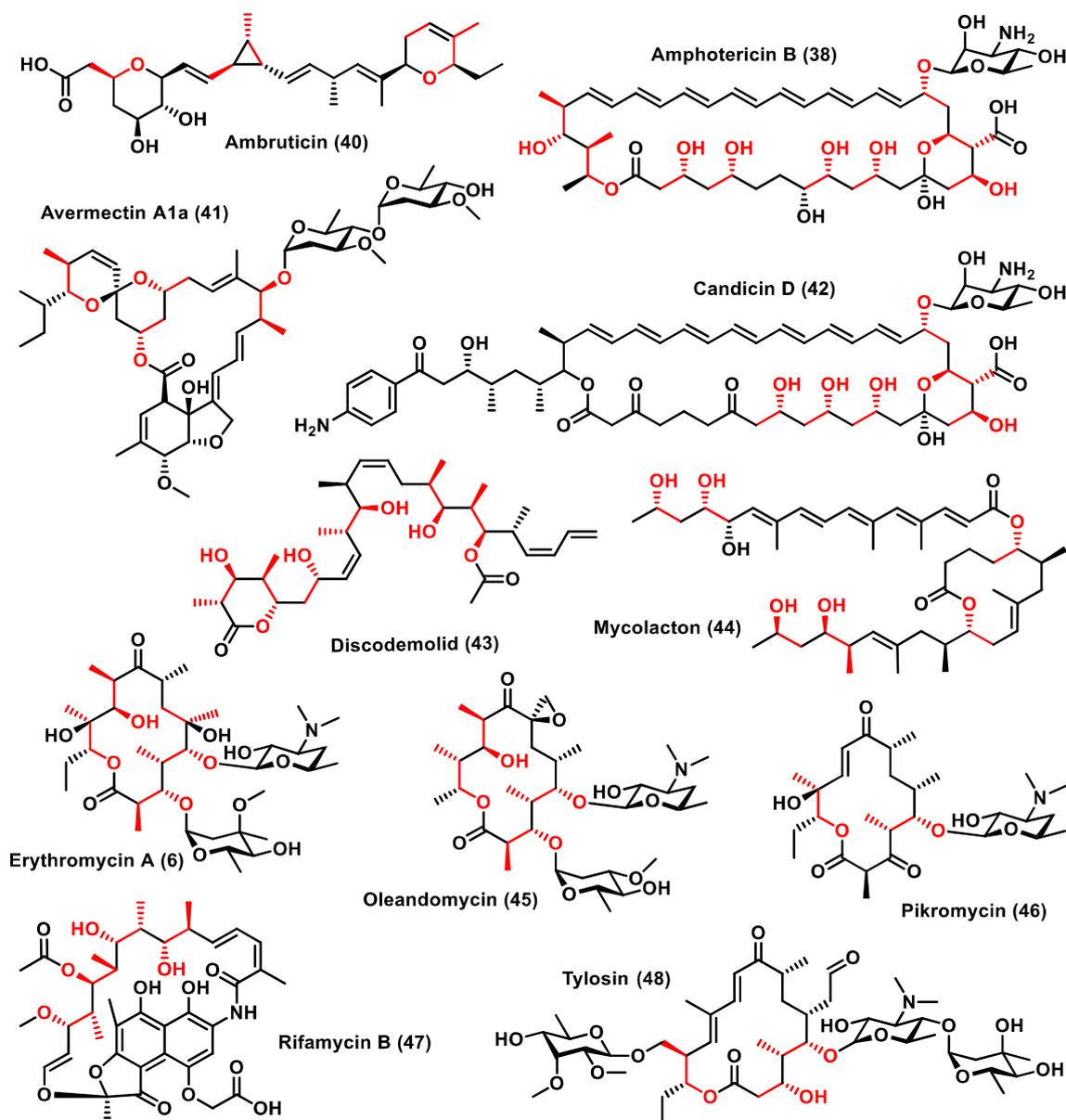
#### 3.1.1 *In papyro*-Studien

Die erste Ebene der KR-Domänenauswahl basierte auf der *in papyro*-Untersuchung von insgesamt 33 bekannten Polyketid-Naturstoffen (Abbildung 3-1, S. 17; Abbildung 8-1, S. 224; Tabelle 8-1, S. 225). Die Literaturrecherche ergab für alle 33 Naturstoffe belegte Konfigurationsangaben, die die Zuordnungen des KR-Typs ermöglichten, insofern einzig die Ketoreduktase innerhalb eines Moduls aktiv war. Für zwei der einbezogenen Naturstoffe, Oligomycin A und Discodermolid, ließen sich keine Daten zu den dazugehörigen Genclustern finden.<sup>[71-73]</sup> Die Informationen über die Gencluster wurden benötigt um die darauf aufbauenden *in silico*-Studien zu ermöglichen.

Die 33 untersuchten Naturstoffe werden durch eine ebenso große Anzahl von Biosynthesewegen in verschiedenen Organismen erzeugt. Mycolacton (**44**) stellt dabei eine Besonderheit dar, da dieser Naturstoff sich aus zwei unabhängigen Polyketidketten zusammensetzt, sodass insgesamt 34 PKS-Systeme durchleuchtet wurden.<sup>[60]</sup> Die folgenden Angaben beziehen sich einzig auf die genannte Stichprobe an Biosynthesewegen.

Die niedrigste Modulanzahl mit sechs Modulen besaßen die den Makrolidantibiotika Erythromycin, Oleandomycin und Pikromycin zugehörigen PKS-Systeme; die höchste mit 21 Modulen wurde in der Candicidin-Biosynthese gefunden.<sup>[6,22,74-79]</sup> Über die gesamten 343 Module hinweg enthielten 317 eine KR-Domäne. Die Mehrzahl der Module enthielt darüber hinaus Domänen der reduktiven Schleife. Mit der weiteren Prozessierung geht die

Stereoinformation aus der Reduktion durch die KR-Domäne verloren und eine Zuordnung des KR-Typs über die Naturstoffkonfigurationen ist nicht möglich. Den verbliebenen 153 KR-Domänen konnte der KR-Typ zugewiesen werden (Tabelle 3-1, S. 18).



**Abbildung 3-1: Strukturformeln von elf der 33 der *in papyro* untersuchten Polyketid-Naturstoffe.**

Farbiger Hervorhebung aller Konfigurationsmotive, die durch eine KR-Domäne erzeugt und im vollständig prozessierten Naturstoff erhalten bleiben. Die Strukturen der 22 weiteren Naturstoffe befinden sich in Kapitel 8.1.1, Abbildung 8-1 (S. 224).

Die reduktiv-aktiven KR-Hauptkategorien A und B waren dabei in 73 bzw. 71 Modulen vertreten. Die reduktiv-inaktive Kategorie C fand sich neunmal, wobei fünf dieser KR-Domänen eine Epimerase-Aktivität (C2-Typ) zeigten.<sup>[6,22,56,71,76-80]</sup> Die KR-Domänen vom Typ A spalteten sich in die Subtypen mit 34  $\alpha$ -unverzweigten (A0-Typ) und 39  $\alpha$ -verzweigten Reduktionsprodukten (A1- und A2-Typ), wobei in 14 Modulen eine Epimerase-

Aktivität (A2-Typ) zu finden war. Für die B-Typ KR-Domänen fanden sich 51 Module mit  $\alpha$ -unverzweigten Produkten (B0-Typ) und 20 mit  $\alpha$ -verzweigten Produkten (B1- und B2-Typ), sieben davon inklusive Epimerase-Aktivität (B2-Typ). Die  $\alpha$ -unsubstituierten Zwischenprodukte wurden nach der KR-Reduktion in 18 Fällen nachträglich durch Methyltransferase-Domänen methyliert.<sup>[21,81-87]</sup> Neben den Methylverzweigungen fanden sich neun Beispiele für Ethylverzweigungen, die von dem in diesen Modulen verwendeten Elongationsbaustein Ethylmalonsäure stammten.<sup>[10,26,56,71,72,80,88,89]</sup> In den Biosynthesen von Ambruticin, Borrelidin und Lankacidin C zeigten sich je ein iterativ agierendes Modul, das eine KR-Domäne beinhaltete, deren Kategorie aber nicht zugewiesen werden konnte.<sup>[21,29,85]</sup> Eine Übersicht für alle 33 Naturstoffe unter Angaben der jeweiligen Biosynthese- und KR-Spezifikationen befindet sich in Tabelle 8-1 (S. 225).

**Tabelle 3-1: Anzahl und Typus der KR-Domänen mit bekannter Produktkonfigurationen.**

<b>A0</b> <b>(3L)</b>	<b>B0</b> <b>(3D)</b>	<b>A1</b> <b>(2D3L)</b>	<b>B1</b> <b>(2D3D)</b>	<b>A2</b> <b>(2L3L)</b>	<b>B2</b> <b>(2L3D)</b>	<b>C1</b> <b>(2D)</b>	<b>C2</b> <b>(2L)</b>
34	51	25	13	14	7	4	5

Stichprobe von 33 Naturstoffen

Zunächst wurden die Biosynthesewege auf Basis des jeweiligen Repertoires an KR-Domänen weiter eingegrenzt und mit der verfügbaren Literatur bevorzugt solche ausgewählt, die bereits Grundlage anderer Studien waren. Die Anzahl dezimierte sich dadurch auf sieben Naturstoffe: Ambruticin (**40**), Amphotericin (**38**), Avermectin (**41**), Erythromycin (**6**), Mycolacton (**44**), Tylosin (**48**) und Rifamycin (**47**) (Abbildung 3-1, S. 17). Mit Blick auf die angestrebten Untersuchungen eines Sets von reduktionsaktiven KR-Domänen wurde eine Auswahl getroffen, die alle sechs Kategorien abdeckte. Frühe wie auch späte Module wurden dabei berücksichtigt. Erste und zweite Module eines Biosynthesewegs galten dabei als frühe Module; solche mit den Ziffern fünf bis acht als späte Module. Für jede Kombination wurde eine KR-Domäne ausgewählt. Dies führte zur finalen Auswahl von elf Domänen (Tabelle 3-2, S. 19).<sup>[6,21,22,26,30,60,90,91]</sup>

Die KR-Domänen AmpKR1 (A2), AmpKR2 (A1), TylKR1 (B1) und EryKR1 (B2) deckten das Spektrum aus frühen Modulen ab. Aus späteren Modulen stammten die KR-Domänen EryKR6 (A1), RifKR7 (A2), AmbKR6 (B0), AveKR7 (B1) und RifKR6 (B2).<sup>[6,21,22,26,30,90,91]</sup> Die

KRs aus der Mycolacton-Biosynthese MycKRA (A0) und MycKRB (B2) stellen im Vergleich zu den anderen KR-Domänen zwei Ausnahmen dar. Diese sind mehrfach in beiden PKS-Systemen integriert, wobei innerhalb der Varianten der jeweiligen KR-Domänen eine Aminosäure-Identität von 98 – 100% besteht. Beiden MycKR-Domänen prozessieren sowohl Substrate in frühen wie auch in späten Modulen. Die MycKRB reduziert Polyketide mit und ohne  $\alpha$ -Methylierung.<sup>[60,92]</sup>

**Tabelle 3-2: KR-Domänenauswahl nach Abschluss der *in papyro*-Studien mit Einordnung des KR-Typs und der Position innerhalb der PKS-Biosynthese.**<sup>[6,21,22,26,30,60,90,91]</sup>

	<b>A0</b> <b>3L</b>	<b>A1</b> <b>2D3L</b>	<b>A2</b> <b>2L3L</b>	<b>B0</b> <b>3D</b>	<b>B1</b> <b>2D3D</b>	<b>B2</b> <b>2L3D</b>
<b>frühes Modul</b>	MycKRA <sup>a</sup>	AmpKR2	AmpKR1	-	TylKR1	EryKR1 MycKRB <sup>a</sup>
<b>spätes Modul</b>	MycKRA <sup>a</sup>	EryKR6	RifKR7	AmbKR6	AveKR7	RifKR6 MycKRB <sup>a</sup>

<sup>a</sup> MycKRA und MycKRB sind in mehreren PKS-Modulen der Mycolacton-Biosynthese vorhanden.

### 3.1.2 *In silico*-Studien

Polyketidsynthase-Systeme sind Multidomänen-Enzyme, sodass bei Studien zu einzelnen Domänen zunächst die entsprechenden Domänengrenzen ermittelt werden müssen. Die Domänengrenzen müssen so gewählt werden, dass die resultierenden, rekombinanten Einzeldomänen keine benachbarten Domänen enthalten und gleichzeitig alle für die Domänenstabilität relevanten Abschnitte beinhalten. PKS-Systeme besitzen zwischen den Einzeldomänen Linkerbereiche, die bei der Auswahl der Domänengrenzen Entscheidungsfreiheiten lassen. Die Linkerareale verbinden allerdings nicht nur die Einzeldomänen, sondern beeinflussen auch deren Interaktionen miteinander.<sup>[41]</sup>

Ausgangspunkt waren für die Bestimmung der Domänengrenzen waren die DNA-Sequenzdaten der entsprechenden Naturstoff-Gencluster (Tabelle 3-3). Die Regionen der KR-Domänen AmpKR1, AmbKR6, AveKR7, EryKR6, MycKRA, MycKRB, RifKR6, RifKR7 und TylKR1 in der jeweiligen PKS wurden in einem ersten Schritt mit der „*PKS/NRPS Analysis Website*“ definiert und zu benachbarten Domänen in Beziehung gesetzt.<sup>[93]</sup> Diese

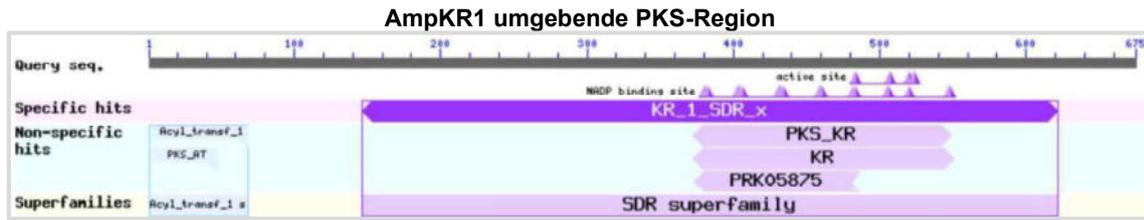
Peptidregion wurde daraufhin mittels der NCBI-Datenbank und der Suche nach konservierten Domänen weiter eingegrenzt.<sup>[94,95]</sup> Für die untersuchten Peptidfragmenten ergab der Sequenzabgleich Übereinstimmungen mit der SDR-Proteinfamilie mit einem Sequenzbereich von  $450 \pm 36$  Aminosäuren (AS). Einzige Ausnahme war mit einem Homologiebereich von 363 AS AveKR7. Allen Domänen gemeinsam und typisch für die SDR-Proteinfamilie war ein NAD(P)H-bindender Region von  $175 \pm 6$  AS.<sup>[96]</sup>

**Tabelle 3-3: Zugrundeliegende Gencluster zur Definierung der KR-Domänen mit Angabe des Naturstoffs, der Gencluster Kennnummer und einem natürlichen Naturstoff-Produzenten.**

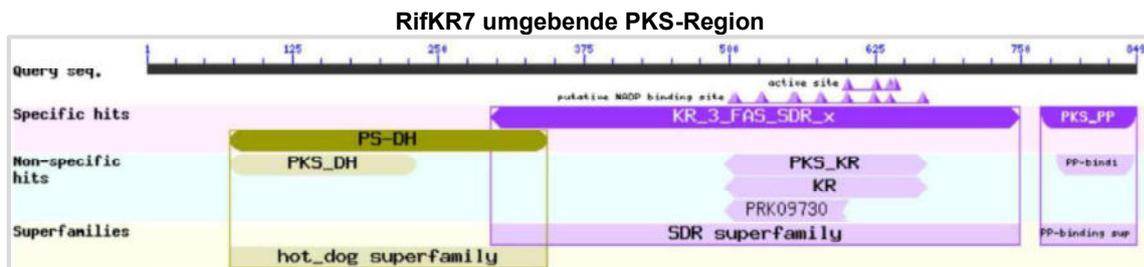
KR-Domäne	Naturstoff	Gencluster Kennnummer	Spezies
AmpKR1 AmpKR2	Amphotericin (38)	AF357202.1 <sup>[30]</sup>	<i>Streptomyces nodosus</i>
AmbKR6	Ambruticin (40)	DQ897667.1 <sup>[21]</sup>	<i>Sorangium cellulosum</i>
AveKR7	Avermectin (41)	AB032367.1 <sup>[90]</sup>	<i>Streptomyces avermitilis</i>
EryKR1 EryKR6	Erythromycin (6)	AM420293.1 <sup>[97]</sup>	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>
MycKRA MycKRB	Mycolacton (44)	DJ057550.1 <sup>[98]</sup>	<i>Mycobacterium ulcerans</i>
RifKR6 RifKR7	Rifamycin (47)	AF040570.3 <sup>[99]</sup>	<i>Amycolatopsis mediterranei</i>
TylKR1	Tylosin (48)	U78289.1 <sup>[100]</sup>	<i>Streptomyces fradiae</i>

Das PKS-System für die Rifamycin-Biosynthese fiel durch besonders kurze Linkerregionen auf. RifKR6 wurde nur durch neun Aminosäuren von der vorgelagerten DH-Domäne getrennt. RifKR7 besaß sogar eine Überlagerung mit der entsprechend vorgelagerten DH-Domäne von 49 AS (Abbildung 3-2, S. 21). Für die weiteren Schritte wurden die Domänengrenzen mit den Homologiebereichen der SDR-Proteinfamilie gleichgesetzt und jeweils fünf Aminosäuren der vor- und der nachgelagerten Linkerregion mit einbezogen. Die Domänengrenzen für AmpKR2 und EryKR1 wurden in Vorarbeiten von F. HEMMERLING unter Einbezug der durch KEATINGE-CLAY verwendeten Bereiche festgelegt.<sup>[57,101]</sup>

**A**



**B**



**Abbildung 3-2: Exemplarische graphische Darstellung der Homologie-Datenbanksuchen.**  
Gezeigt für AmpKR1 und RifKR7.<sup>[94,95]</sup> PKS-PP: vorhergesagte ACP-Domäne.

Der Bestimmung der KR-Domänengrenzen folgte ein Aminosäure-Sequenzvergleich innerhalb der gewählten Domänen mit CLUSTAL OMEGA (Ausschnitt: Abbildung 3-3, S. 21; Gesamt: Abbildung 8-2, S. 226).<sup>[102,103]</sup> Die Sequenzidentität betrug zwischen den KR-Domänen 25 – 40 % (Phylogenetische Analyse: Abbildung 8-3, S. 227). Die für die NADPH-Bindung nötigen Aminosäuren waren in allen Sequenzen zu finden.

AS-Nr.	431	452	477	482	490
1 MycKRA (A0)	428   ... FHLAGRH-QPTLL ...	LAPK VHG ...	FVMFS SVAGI ...	GGKSQGA YAAA ...	YAAA ...
2 EryKR6 (A1)	VHTAGVP-ESRPL ...	CAAK VTG ...	FVLFSS GAGV ...	GSANLGA YSAA ...	YSAA ...
3 AmpKR2 (A1)	FHSAGVAHDDAPV ...	MRAK LTA ...	FVLFSS GAAV ...	GSGGQPG YAAA ...	YAAA ...
4 AmpKR1 (A2)	VHTAAVI-ELAAL ...	VHAK VTG ...	FVLFSS TAGM ...	GSGVHAA YVAG ...	YVAG ...
5 RifKR7 (A2)	VHTAGVF-DAGVT ...	FAPK VDA ...	FIVVSS ASSI ...	MGAGSGG YAAA ...	YAAA ...
6 AmbKR6 (B0)	VHTAGVL- DD SVV ...	LRPK VDG ...	FVLFSS AAGTLG SPGQAN YAAA ...	SPGQAN YAAA ...	YAAA ...
7 MycKRB (B0/2)	VHTAAVL- AD TPV ...	LAPK IDA ...	FIMFSS MAGMIG SPGQGN YAAA ...	SPGQGN YAAA ...	YAAA ...
8 TylKR1 (B1)	FHTAGIL- DD DAVI ...	RGAK VCG ...	FVLFSS VTGTWGN NAGQGA YAAA ...	NAGQGA YAAA ...	YAAA ...
9 AveKR7 (B1)	VHAAGVL- DD ATI ...	FAAK VDA ...	FVLFSS AAGILG SAGQGN YAAA ...	SAGQGN YAAA ...	YAAA ...
10 EryKR1 (B2)	FHAAATL- DD GTV ...	SRAK VLC ...	FVLFSS FASAFGAP GLGG YAPG ...	GLGG YAPG ...	YAPG ...
11 RifKR6 (B2)	VHTAGVF- ED GVI ...	YAAK VTA ...	FVVVSS VAGVMGGGG QGP YAAA ...	QGP YAAA ...	YAAA ...

**Abbildung 3-3: Ausschnitt des Aminosäure-Sequenzvergleichs der elf ausgewählten KR-Domänen.**  
Weiß/Schwarz: Kofaktor NADPH bindende AS. Rot/Schwarz: AS des aktiven Zentrums. Gelb/Grau: A-Typ konservierte Tryptophan (W) und B-Typ konservierte LDD-Motiv. Der komplette Sequenzvergleich befindet sich in Abbildung 8-2 (S. 226).<sup>[102,103]</sup>

Dies gilt ebenfalls für die drei konservierten Aminosäuren Tyrosin-490, Serin-477 und Lysin-452, die das aktive Zentrum der Ketoreduktasen bilden. Innerhalb der Gruppe der A-Typ KR-Domänen wurde das konservierte Tryptophan-482 identifiziert. Alle B-Typ KR-Domänen besaßen das konservierte LDD-Motiv bzw. ein LDD-ähnliches Motiv (LAD bzw.

FED), welches zur veränderten ACP-Interaktion und somit Substratorientierung innerhalb des aktiven Zentrums führt.<sup>[47]</sup> Die zuvor getroffene Zuordnungen der KR-Hauptkategorien konnten mit der Sequenzuntersuchung erfolgreich bestätigt werden.

### ***In silico*-Proteinstruktur-Homologiestudien**

Die bisher aufgezeigte *in silico*-Studie bezog sich einzig auf die Primärstruktur der ausgewählten Domänen. Um zu zeigen, dass sich die dort gefundenen Homologien auch auf die Sekundär- und Tertiärstruktur übertragen lassen, wurde unter Verwendung von Phyre<sup>2</sup> der vorhergesagte strukturelle Aufbau untersucht.<sup>[104]</sup> Phyre<sup>2</sup> greift auf vorhandene Kristall- und NMR-Strukturen von Proteinen und -domänen zurück, die eine hohe Primärstrukturhomologie zur erfragten Sequenz besitzen. Die Datenbank umfasst eine Vielzahl von SDR-Proteinen und im speziellen auch Strukturen von sieben Typ I-PKS-KR-Domänen (PDB ID): EryKR1 (2FR0), TylKR1 (2Z5L), PlmKR1 (4HXY), AmpKR2 (3MJV, mit Substrat 5XWV), SpnKR2 (3SLK), PikKR3 (3QP9), AmpKR11 (4L4X). Alle genannten Domänenstrukturen sind mit NADPH kokristallisiert worden. Alle KR-Domänen wurden über Phyre<sup>2</sup> entsprechend der Strukturhomologiesuche unterzogen, insofern nicht bereits eine Kristallstruktur vorhanden war (Abbildung 3-4, S. 23).

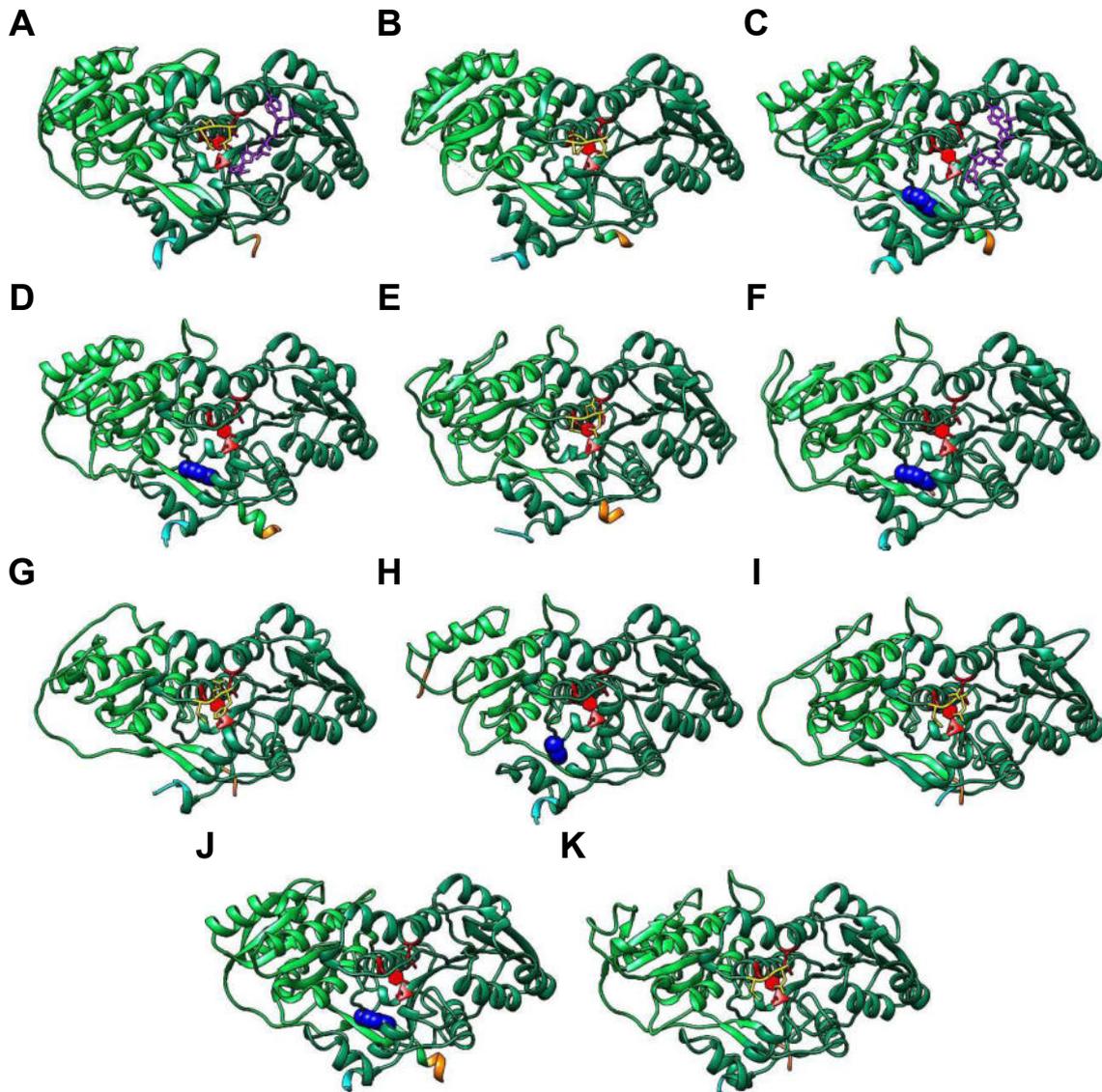
**Tabelle 3-4: KR-Domänenauswahl nach Abschluss der *in silico*-Studien mit Einordnung des KR-Typs und der Position innerhalb der PKS-Biosynthese.**<sup>[6,21,22,26,30,60,90,91]</sup>

	<b>A0</b> <b>3L</b>	<b>A1</b> <b>2D3L</b>	<b>A2</b> <b>2L3L</b>	<b>B0</b> <b>3D</b>	<b>B1</b> <b>2D3D</b>	<b>B2</b> <b>2L3D</b>
<b>frühes Modul</b>	MycKRA <sup>a</sup>	AmpKR2	AmpKR1	-	TylKR1	EryKR1 MycKRB <sup>a</sup>
<b>spätes Modul</b>	MycKRA <sup>a</sup>	EryKR6	-	AmbKR6	-	MycKRB <sup>a</sup>

<sup>a</sup> MycKRA und MycKRB sind in mehreren PKS-Modulen der Mycolacton-Biosynthese vorhanden.

Die literaturbekannten Kristallstrukturen von EryKR1, TylKR1 und AmpKR2 zeigten die typische zweiteilige Domänenstruktur aus stabilisierender und katalytischer Hälfte. Phyre<sup>2</sup> konnte die Aminosäuresequenzen von AmpKR1, AmbKR6, AveKR7, EryKR6, MycKRA und MycKRB auf Grundlage übereinstimmender Sekundärstrukturen in die beschriebene Tertiärstruktur modellieren. Allerdings konnten mit dieser Methode keine

ausreichende Strukturvorhersage für RifKR6 und RifKR7 getroffen werden. In beiden Vorhersageversuchen zeigten sich Zuordnungsprobleme innerhalb der stabilisierenden Domänenhälfte.



**Abbildung 3-4: Literaturbekannte Kristallstrukturen und modellierte Strukturen der KR-Domänen.** EryKR1 (A, 2FR0), TylKR1 (B, 2Z5L), AmpKR2 (C, 3MJV) und mittels Phyre<sup>2</sup> modelliert AmpKR1 (D), AmbKR6 (E), EryKR6 (F), RifKR6 (G), RifKR7 (H), AveKR7 (I), MycKRA (J) und MycKRB (K). Hellgrün: stabilisierende Domänenhälfte; Dunkelgrün: katalytische Domänenhälfte; Rot: aktives Zentrum mit Tyrosin, Serin und Lysin; Violett: NADPH; Blau: konserviertes Tryptophan des A-Typs; Gelb: konservierte LDD-ähnliche Motive des B-Typs; Orange: N-Terminus der Modellierung; Cyan: C-Terminus der Modellierung.<sup>[104]</sup>

Im Fall von RifKR7 war es dem Programm nicht möglich 92 AS des N-Terminus zu modellieren; für RifKR6 war dies für entsprechende 62 AS nicht möglich. Obwohl RifKR6 und RifKR7 bereits in Untersuchungen von CANE *et al.* einbezogen worden waren, wurde sich gegen den Einbezug dieser beiden Domänen in die vorliegende Studie entschieden.<sup>[52]</sup> AveKR7 wurde zurückgestellt, um diese Domäne in späteren Studien einzubeziehen.

### 3.2 Molekularbiologische und Proteinbiochemische Arbeiten

Die identifizierten Gene der ausgewählten KR-Domänen wurden mit Ausnahme von *ambKR6* als synthetische Gene in pUC57- oder pMK-Vektoren geordnet. Alle Klonierungsarbeiten erfolgten auf Basis entsprechender Primer oder den bereits integrierten Restriktionsschnittstellen, die die Gene flankierten (5'-*NdeI*, 3'-*EcoRI*). Der Zielvektor war in allen Fällen pET28a(+) und die Konstrukte wurden im ORF (*open reading frame*, Leseraster) mit der 5'-His<sub>6</sub>-Sequenz (*N*-His<sub>6</sub>) integriert. Die pET28a(+)-Konstrukte der Gene *ambKR6*, *ampKR2*, *eryKR6*, *mycKRA* und *mycKRB* wurden am 3'-Ende direkt vor der *EcoRI*-Schnittstelle durch ein Stoppcodon (TAA oder TAG) terminiert. Die bestellten Konstrukte von *ampKR1*, *eryKR1* und *tylKR1* enthielten kein Stoppcodon und kodierten für einen C-terminalen Pro<sub>5</sub>-tag (*C*-Pro<sub>5</sub>). Es sollte daher parallel mittels Mutagenese ein Stoppcodon eingefügt bzw. eine Leserasterverschiebung bewirkt werden, die in einem C-terminalen His<sub>6</sub>-tag (*C*-His<sub>6</sub>) resultieren sollte (Liste aller Vektoren in Tabelle 6-4, S. 119; Vektorkarten ab S. 229).

Die ersten pET28a(+)-Konstrukte von *ambKR6*, *ampKR1* und *tylKR1* wurden im Rahmen der Masterarbeit von Timm ENSFELDER erzeugt. Die Klonierungsarbeiten für *ambKR6* erfolgten ausgehend vom Vektor pMC\_ambE\_2 mittels entsprechender Primer. Bei Expressionstests mit pET28a(+)\_ambKR6 konnte allerdings kein Translationsprodukt nachgewiesen werden, sodass die rekombinante Domäne AmbKR6 nicht für Enzymaktivitätstests zur Verfügung stand. Die Genexpressionstests der *ampKR1*- und des *tylKR1*-Konstrukts unter ENSFELDER verliefen positiv, wobei nur für das zweitgenannte Konstrukt die rekombinante Domäne löslich erhalten werden konnte.<sup>[105]</sup>

Im Folgenden sind abweichende Methoden und Ergebnisse der Vektorenanpassung durch ortsgerichtete Mutagenese (Kapitel 3.2.1, S. 25) und die Gewinnung von löslichem Protein durch Rückfaltung erläutert (Kapitel 3.2.2, S. 27). Die in diesen Kapiteln nicht erwähnten rekombinanten KR-Domänen wurden nach erfolgreicher Genexpression in *E. coli* BL21(DE3) und erfolgreicher Isolierung bei -80 °C gelagert. Die Identifizierung aller isolierten KR-Domänen erfolgte mittels Tandem-Massenspektrometrie (Kapitel 3.2.3, S. 28).

---

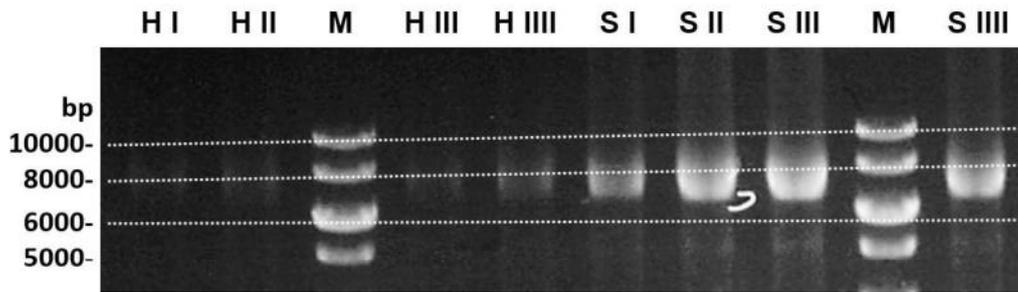
### 3.2.1 SDM für ampKR1, eryKR1 und tylKR1

Die ortsgerichtete Mutagenese (SDM, *site-directed mutagenesis*) wurde genutzt um Nukleotid-Insertionen von zwei und drei Basenpaaren bei den erzeugten pET28a(+)-Konstrukten von *ampKR1*, *eryKR1* und *tylKR1* durchzuführen. Die Insertion der beiden Base GC vor der *EcoRI*-Schnittstelle verschob das Leseraster der nachfolgenden DNA-Sequenz derart, dass die Sequenz eine 3'-His<sub>6</sub>-Sequenz enthielt. Durch die Insertion der drei Basen TAA an der selber Stelle wurde ein Stoppcodon eingefügt, welches die Transkription an dieser Stelle beendete (Tabelle 3-5, S. 26).

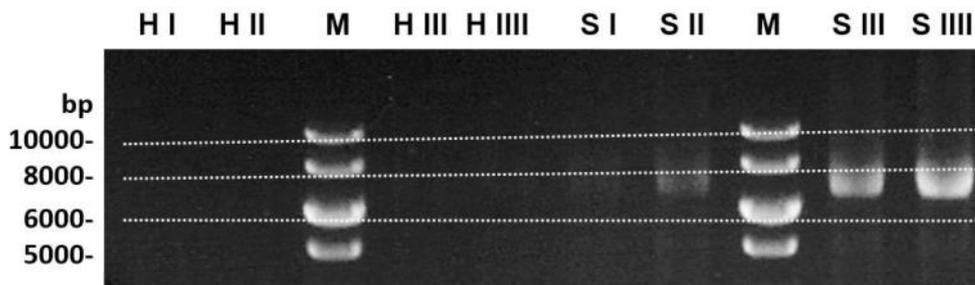
Die verwendeten komplementären Primer wurden zusammen mit dem jeweiligen Templat-Vektor in eine SDM-PCR eingesetzt und die Vektoren vollständig amplifiziert. Die in *E. coli* TOP10 amplifizierten Templat-Vektoren wurden anschließend mit dem auf methylierte DNA sensitiven Restriktionsenzym *DpnI* abgebaut. Die Überprüfung der SDM-PCR-Produkte zeigte nur ein lineares Amplifikat mit entsprechender Größe (Abbildung 3-5, S. 26). Im Fall der SDM-PCR mit Leserasterverschiebung ausgehend von pET28a(+)*\_ampKR1\_CP* wurde unabhängig von der verwendeten Temperatur kein Amplifikat in detektierbaren Konzentrationen nachgewiesen (Abbildung 3-6, S. 26).

Die Transformationen in *E. coli* TOP10 erfolgten mit je einem PCR-Ansatz, der detektierbares SDM-Produkt enthielt und eine einzelne Bande vorlag. Die PCR-Ansätze mit dem Ziel pET28a(+)*\_ampKR1\_CH* zu erhalten, wurden ebenfalls in je einer Transformation verwendet. Die Auswahl an resultierenden Bakterienkolonien für alle angestrebten Konstrukte enthielt in allen Kombinationen mindestens einmal die angestrebte Mutation. Die Gensequenzen sind mit den bestätigenden Daten der DNA-Sequenzierungen im Kapitel 8.2 (S. 228) aufgeführt.

Alle *eryKR1*- und *tylKR1*-Konstrukte wurden in *E. coli* BL21(DE3) der Genexpression unterzogen und erfolgreich mittels Affinitätschromatographie isoliert.



**Abbildung 3-5: Ausschnitt des 1%-igen Agarosegels der SDM-PCR-Amplifikate mit pET28a(+)*\_eryKR1\_CP*.** M: Marker; H: pET28a(+)*\_eryKR1\_CH*, 6790+32 bp; S: pET28a(+)*\_eryKR1*, 6791+33 bp; Annealingtemperatur I: 45 °C; II: 50 °C; III: 55 °C; IIII: 60 °C. Gesamtes Gel: Abbildung 8-12 (S. 244). SDM-PCR-Amplifikate ausgehend von pET28a(+)*\_tylKR1\_CP*: Abbildung 8-14 (S. 245).



**Abbildung 3-6: Ausschnitt des 1%-igen Agarosegels d. SDM-PCR-Amplifikate mit pET28a(+)*\_ampKR1\_CP*.** M: Marker; H: pET28a(+)*\_ampKR1\_CH*, 6793+28 bp; S: pET28a(+)*\_ampKR1*, 6794+29 bp; Annealingtemperatur I: 45 °C; II: 50 °C; III: 55 °C; IIII: 60 °C. Gesamtes Gel: Abbildung 8-13 (S. 245).

**Tabelle 3-5: Ausschnitt der 3'-DNA- und N-terminalen AS-Sequenzen der erhaltenen pET28a(+)-Konstrukte.**

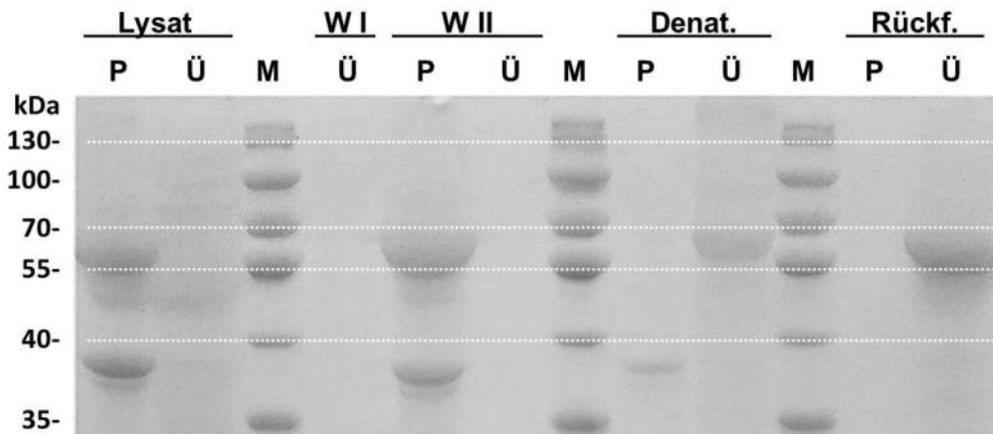
Konstrukt	3'-Gensequenz		C-Terminus des Expressionsprodukts
		→	
<i>eryKR1</i>	5'-...CAGGCAGCTGCAGAACCTCGI	TAAGAATTC-3'	...QAAA <u>EPR</u>
<i>eryKR1_CH</i>	5'-...CAGGCAGCTGCAGAACCTCGI	GCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGC	CGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA-3'
		→	...QAAA <u>EPR</u> ANSSSVDKLAAALEHHHHHH
<i>eryKR1_CP</i>	5'-...CAGGCAGCTGCAGAACCTCGI	GAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGC	GCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGAGATCCGGCTGCTAA-3'
		→	...QAAA <u>EP</u> REFELRRQACGRTRAPPPPLRSGC

Gezeigt am Beispiel von *eryKR1*. I/R: letztes gemeinsames Nukleotid bzw. letzte gemeinsame AS. GAATTC: *EcoRI*-Schnittstelle. Vollständige DNA- und AS-Sequenzen für *eryKR1*/EryKR1 unter Kapitel 8.2.4 (S. 234). Vollständige DNA- und AS-Sequenzen für *ampKR1*/AmpKR1 unter Kapitel 8.2.2 (S. 230). Vollständige DNA- und AS-Sequenzen für *tylKR1*/TylKR1 unter Kapitel 8.2.8 (S. 241). Grau: Insertionen.

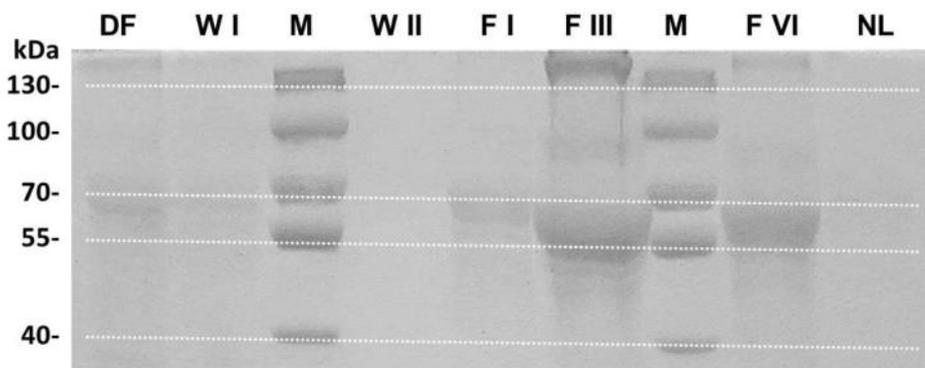
### 3.2.2 Proteinrückfaltung von AmpKR1

Die Genexpression des mittels SDM-PCR erzeugten pET28a(+)*\_ampKR1* ergab unverändert zum pET28a(+)*\_ampKR1\_CP* ein nicht lösliches Translationsprodukt. Daraufhin wurde versucht durch Proteinfaltung und -rückfaltung die rekombinante Domäne AmpKR1 in löslicher Form zu erhalten.

Die AmpKR1-enhaltende unlösliche Proteinfraction (Abbildung 3-7, S. 27, Lysat P) wurde pelletiert, mehrfach gewaschen und der Denaturierung mittels Harnstoff unterzogen. Das AmpKR1-Peptid konnte danach in der löslichen Phase nachgewiesen werden (Denat. Ü), wohingegen andere Peptide in der unlöslichen Fraction verblieben. Während der anschließenden Rückfaltung durch Senkung der Harnstoffkonzentration mittels Dialyse blieb AmpKR1 in Lösung (Rückf. Ü) und konnte nach der Reinigung mittels Affinitätschromatographie erfolgreich isoliert werden (Abbildung 3-8, S. 27, F I bis F VI).



**Abbildung 3-7: Ausschnitt eines SDS-Gels für die Denaturierung und Rückfaltung.** Gezeigt für die rekombinanten Domäne AmpKR1 (54 kDa). M: Marker; W: Waschschrift; Denat.: Denaturierung; Rückf.: Rückfaltung; P: Pellet (nicht löslich); Ü: Überstand (löslich). SDS-Gel in Gesamtgröße unter Kapitel 8.3.2, Abbildung 8-15 (S. 246).



**Abbildung 3-8: Ausschnitt eines SDS-Gels der Proteinreinigung.** Mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie der rückgefalteten, rekombinanten Domäne AmpKR1 (54 kDa). M: Marker; DF: Durchfluss; W: Waschschrift; F: Proteinfraction; NL: Nachlauf. SDS-Gel in Gesamtgröße unter Kapitel 8.3.2, Abbildung 8-16 (S. 246).

### 3.2.3 LCMS/MS-Proteinidentifizierung

Die löslich vorliegenden KR-Domänen wurden zur Identifizierung ausgehend einer SDS-Gelprobe einer Restriktion durch Trypsin unterzogen und die resultierenden Peptidfragmente auf Gesamtmasse und Fragmentierungsmuster mittels Tandem-Massenspektrometrie (LCMS/MS) analysiert.

Alle KR-Domänen erreichten mindestens eine Peptid-Sequenzabdeckung von über 55% mit gleichzeitigem Nachweis von mindestens 20 für die jeweilige Domäne spezifischen Peptiden. Auf dieser Grundlage erreichten sämtliche Zuordnungen eine signifikant hohe Kennziffer (Score >500) und konnten somit eindeutig und erfolgreich nachgewiesen werden. Die identifizierten Peptide sind in Kapitel 8.3.3 (ab S. 248) in entsprechenden Sequenzübersichten hervorgehoben.<sup>[106]</sup>

**Tabelle 3-6: Zusammenfassung der LCMS/MS-Proteinidentifikation der rekombinanten KR-Domänen.**

Domäne	Protein Score	AS-Sequenz-abdeckung	Anzahl der MS/MS-Spektren	Anzahl der spezifischen Peptide
AmpKR1	1024	68%	426	34
AmpKR2	1158	62%	480	33
EryKR1	1137	69%	471	38
EryKR1-H	1189	76%	544*	40
EryKR1-P	1197	77%	501*	41
EryKR6	1170	62%	262	30
MycKRA	1089	63%	283	41
MycKRB	1173	56%	133	20
TyIKR1	1025	83%	486	47
TyIKR1-H	1064	87%	498*	51
TyIKR1-P	941	83%	502*	49

\*inklusive Peptidspektren des C-terminalen His<sub>6</sub>- bzw. Pro<sub>5</sub>-tags. Identifizierten Peptide: Kapitel 8.3.3 ab S. 248.

Die LCMS/MS-Proteinidentifizierung bestätigte die erfolgreiche Genexpression und Isolierung der korrekten Proteindomänen. Insgesamt standen sieben rekombinante KR-Domänen mit insgesamt elf Sequenzderivaten für die Enzymaktivitätstests zur Verfügung.

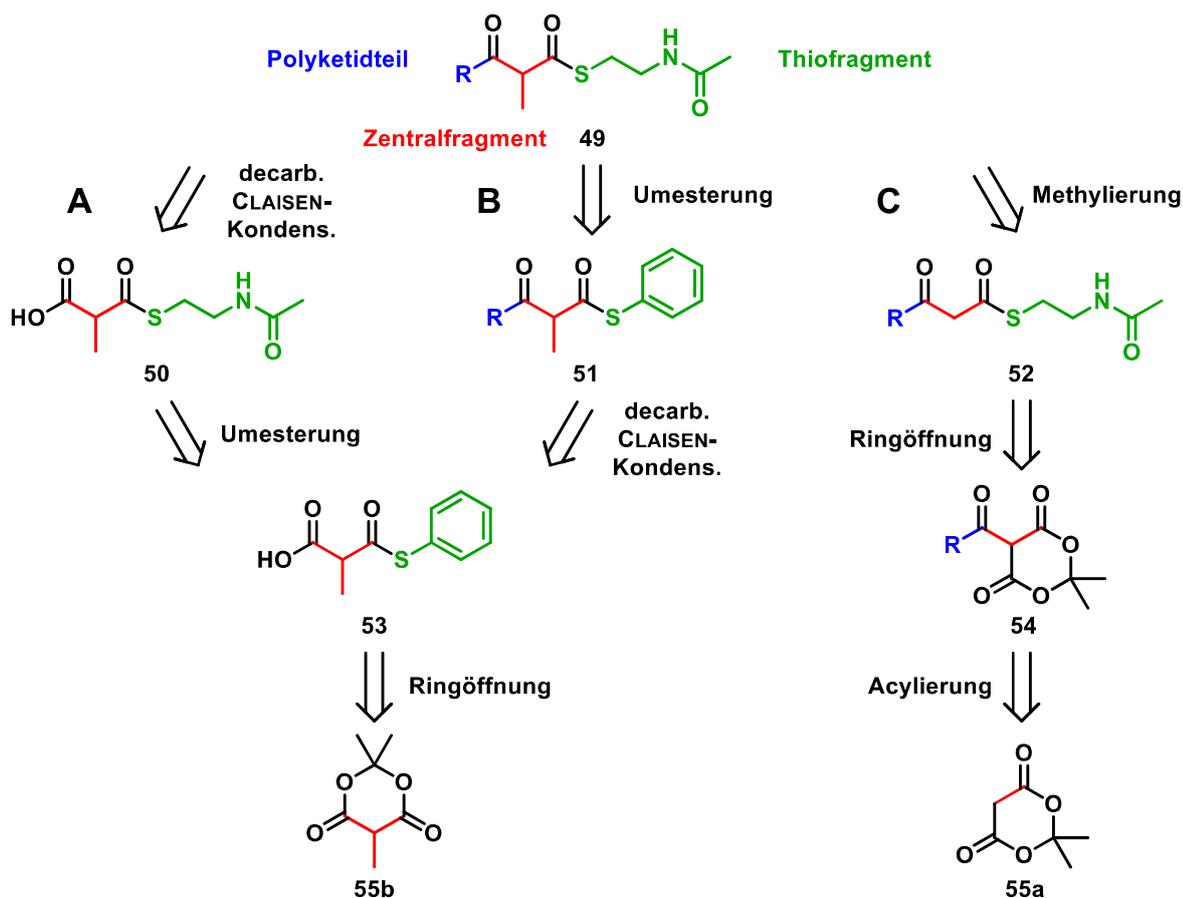
Die nächsten Kapitel gehen auf die Synthese und Überlegungen für die Darstellung der für die Enzymaktivitätstest benötigten  $\beta$ -Keto- $\alpha$ -methyl-Substrate ein.

### 3.3 Synthese von Substraten und Referenzen

#### 3.3.1 Synthesestrategien für $\alpha$ -methylierte $\beta$ -Ketothioester

Die Darstellung der für die Untersuchungen der KR-Domänen benötigten  $\alpha$ -methylierten  $\beta$ -Keto(SNAC)thioester-Substrate **49** war über verschiedene Strategien zugänglich. Das angestrebte Ziel war die einfache Zugänglichkeit einer großen Anzahl von Derivaten unter gleichzeitig milden Reaktionsbedingungen.

Im Rahmen der Masterarbeit von H. GEISE wurden vier Syntheserouten untersucht.<sup>[107]</sup> Die zentralen Reaktionsschritte dieser Routen waren eine gekreuzte CLAISEN-artige C-C-Bindungsbildung nach ZHOU *et al.*, die Acylierung von Meldrumsäure (**55a**) mit folgender Thiolyse nach KEATINGE-CLAY *et al.* und zwei Varianten basierend auf der decarboxylativen CLAISEN-Kondensation nach MASAMUNE *et al.* (Schema 3-1, S. 29).<sup>[57,108,109]</sup>

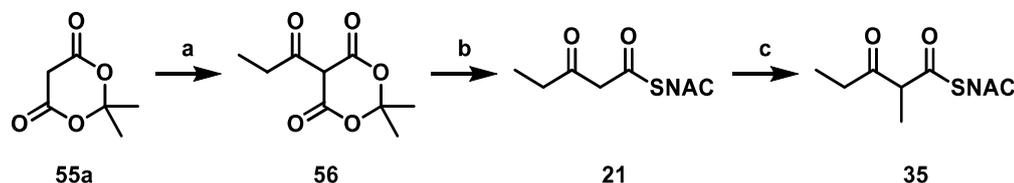


**Schema 3-1: Auswahl der untersuchten Syntheserouten.**

A) *klassische* MASAMUNE-Route A und B) *flexiblere* MASAMUNE-Route B mit jeweils der decarboxylativen CLAISEN-Kondensation als zentralem Reaktionsschritt, C) KEATINGE-CLAY-Route C mit Acylierung von Meldrumsäure (**55a**).  
Oben: Strukturelle Bereiche der synthetisierten  $\beta$ -Keto- $\alpha$ -methyl-(*N*-acetylcysteamin)thioester.

Die ZHOU-Route erzeugte während der CLAISEN-artigen Reaktion in großem Maße nicht-gekreuzte Nebenprodukte und wurde aufgrund der zu geringen Produktausbeute und fehlender Selektivität nicht weiter verfolgt. Die verbliebenen drei Syntheserouten **A**, **B** und **C** sind in Schema 3-1 (S. 29) gezeigt und werden im Folgenden detaillierter betrachtet.

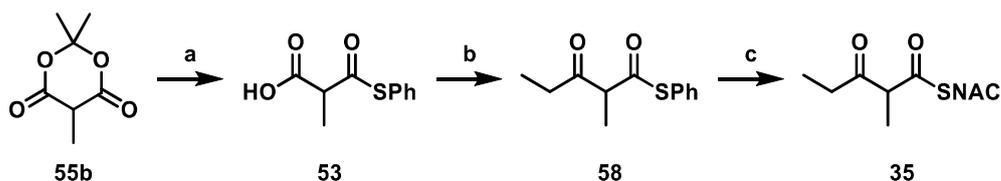
Die KEATINGE-CLAY-Route (Route **C**) beinhaltet als ersten Schritt die Acylierung von Meldrumsäure (**55a**), gefolgt von der Ringöffnung mit *N*-Acetylcysteamin (**58**, HSNAC) unter CO<sub>2</sub>-Freisetzung zum  $\beta$ -Ketothioester **52** und zuletzt die Methylierung der  $\alpha$ -Position. Die Synthese von SNAC-2-Methyl-3-oxopentanthioat (**35**) ergab über drei Stufen eine Ausbeute von 65%.<sup>[107]</sup> Da das erste Acylfragment als EDC-aktivierte Carbonsäure im ersten Schritt der KEATINGE-CLAY-Route eingeführt wird, müssten separat für jedes methylierte Derivat alle drei Reaktionen durchgeführt werden. Darüber hinaus besteht bei der letzten Stufe dieser Route die Möglichkeit einer doppelten  $\alpha$ -Alkylierung, sodass eventuell ein Produktgemisch entsteht.<sup>[110]</sup> Diese beiden Nachteile wurden in den Routen mit decarboxylativer CLAISEN-Kondensation aufgegriffen und erfolgreich vermieden.



**Schema 3-2: Syntheseroute C nach KEATINGE-CLAY.**

a) EDC·HCl, DMAP, Propionsäure **57**, Dichlormethan, 0 °C auf RT, 18 h, 89%; b) HSNAC **58**, Toluol, 80 °C, 6 h, 84%; c) Methyljodid, Kalium-*tert*-butanolat, THF, 0 °C auf RT, 18 h, 85%.<sup>[107]</sup>

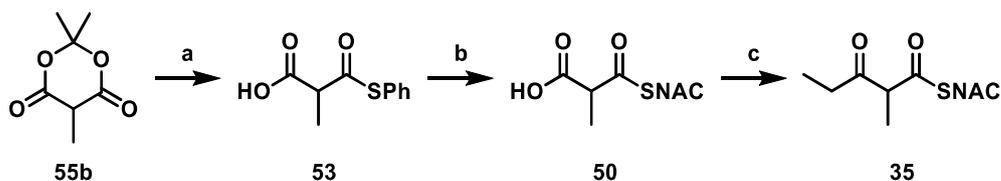
Die MASAMUNE-Route **B** mit literaturbekanntner „klassischer“ Durchführung (Schema 3-1, S. 29, Route **B**) des Schlüsselschritts umgeht die Problematik der doppelten Alkylierung, indem direkt von der methylierten Meldrumsäure **55b** ausgegangen wird. Die gewählte Routenbezeichnung basiert auf der decarboxylativen CLAISEN-Kondensation, die in der zweiten Reaktion angelehnt an MASAMUNE *et al.* mit einem unpolaren Methylmalonsäurehalbthioester (**53**) erfolgt.<sup>[109]</sup> Durch den Einsetzen der Carbonsäuren in diesem Schritt wird die Derivatisierung eine Stufe später als in der KEATINGE-CLAY-Route C ermöglicht und erhöht die Flexibilität der Route **B**. Nach der Transesterifizierung mit HSNAC (**58**) wurde in den ersten Durchgängen für den  $\beta$ -Keto-SNAC-thioester **35** eine Ausbeute über drei Stufen von 70% erreicht (Schema 3-3, S. 31).<sup>[107]</sup>



**Schema 3-3: Syntheseroute B nach MASAMUNE.**

a) DIPEA, TMSCl, Thiophenol, Acetonitril, 0 °C auf 43 °C, 18 h, 99%; b) Propionsäure, CDI, MgBr<sub>2</sub>·OEt<sub>2</sub>, THF, RT, 18 h, 99%; c) HSNAC, DIPEA, DMF, RT, 18 h, 72%.<sup>[107]</sup>

Die *flexiblere* MASAMUNE-basierte Route **A** (Schema 3-1, S. 29) enthält die decarboxylative CLAISEN-Kondensation in der dritten Reaktion. Auf diese Weise wird eine Derivatisierung des Polyketidteils auf der letzten Synthesestufe ermöglicht, sodass der Aufbau einer Substratbibliothek vereinfacht wird. Die Schwierigkeit bestand darin, den in der zweiten Stufe erzeugten 2-Methyl-3-oxopropansäure(SNAC)halbthioester (**50**) für die CLAISEN-Kondensation verfügbar in Lösung zu bringen. H. GEISE gelang dies in ersten Testreaktionen mit einer THF/DMF-Lösungsmittelkombination, jedoch konnte das  $\beta$ -Keton **35** nur in Spuren isoliert werden (Schema 3-4).<sup>[107]</sup>



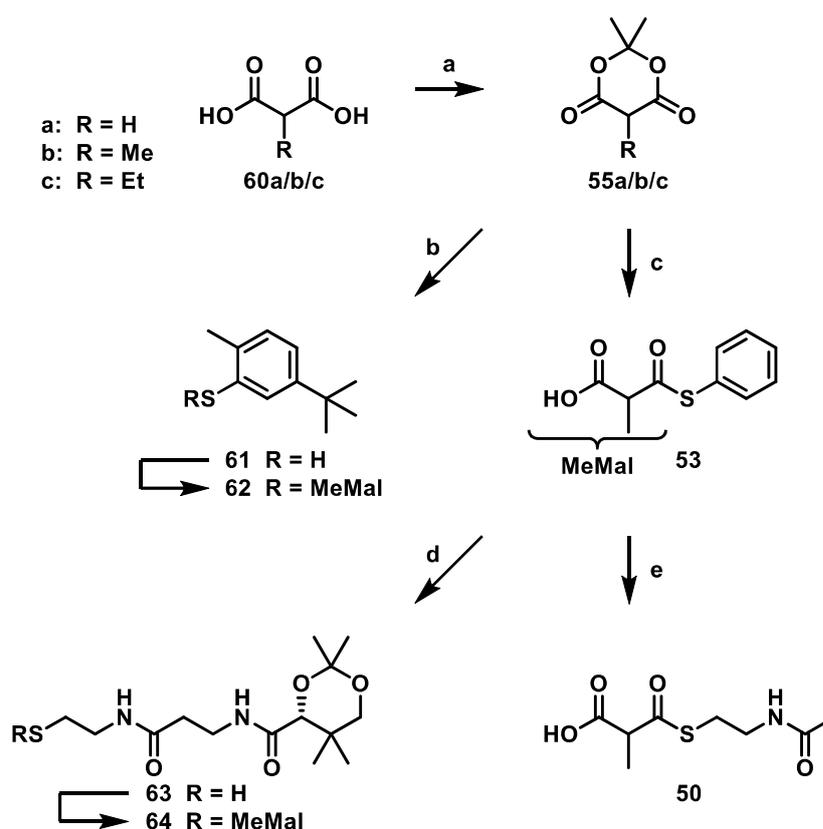
**Schema 3-4: Syntheseroute A nach MASAMUNE.**

a) DIPEA, TMSCl, Thiophenol, Acetonitril, 0 °C auf 43 °C, 18 h, 99%; b) NaHCO<sub>3</sub>, HSNAC, H<sub>2</sub>O, RT, 4 h, 99%; c) Propionsäure, CDI, MgBr<sub>2</sub>·OEt<sub>2</sub>, THF/DMF, RT, 18 h, Spuren.<sup>[107]</sup>

### 3.3.2 Synthese der Malonsäurethioesterbausteine

Das Zentralfragment der  $\beta$ -Kethioester-Substrate stammt in beiden Varianten der MASAMUNE-Route (**A** und **B**) aus einem Derivat der Meldrumsäure (**55b**), welches mit TMSCl aktiviert wird. Mit Thiophenol wird das Acetonid zum entsprechende Malonsäurehalbthioester **53** geöffnet. Meldrumsäure und Derivate konnten aus kommerziell verfügbaren Malonsäuren (**60**) mit Aceton und Essigsäureanhydrid nach SHAIR *et al.* bereitgestellt werden (Schema 3-5, S 32).<sup>[111]</sup> Die Reaktion ist flexibel in Bezug auf die monosubstituierte  $\alpha$ -Position und kann im Multigrammmaßstab in akzeptablen Ausbeuten durchgeführt werden. Meldrumsäure (**55a**, 10 g, 30%), Methylmeldrumsäure (**55b**, 27 g, 75%) und Ethylmeldrumsäure (**55c**, 4.7 g, 65%) wurden auf diesem Weg erhalten.

Die Acetonidöffnung wurde nach MAGDZIAK *et al.* mit der Methylmeldrumsäure **55b** zunächst mit Thiophenol im großen Multigrammmaßstab mit einer Ausbeuten von 91% (**53**, 30 g) durchgeführt.<sup>[112]</sup> Da Thiophenol und das Produkt **53** einen für viele Menschen unangenehmen Geruch besitzen, wurde die Reaktion auch mit 5-(*tert*-Butyl)-2-methylthiophenol (**61**) durchgeführt und erfolgreich das olfaktorisch mildere Malonsäurehalbthioester-Derivat **62** (1.3 g, 75%) erzeugt, welches in zukünftigen Synthesen Verwendung finden könnte.



**Schema 3-5: Synthesen zur Darstellung der Malonsäurehalbthioester-Derivate 50, 53, 62 und 64.**

a) **60**, Essigsäureanhydrid, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0 °C auf RT, 2 h, Aceton, 2 h, **55a**: 30%, **55b**: 75%, **55c**: 65%; b) **55b**, DIPEA, TMSCl, Acetonitril, 5-(*tert*-Butyl)-2-methylthiophenol (**61**), 0 °C auf 43 °C, ü.N., 75%; c) **55b**, DIPEA, TMSCl, Acetonitril, Thiophenol, 0 °C auf 43 °C, ü.N., 91%; d) NaHCO<sub>3</sub>, *N*-(3-((2-Mercaptoethyl)amino)-3-oxopropyl)-(R)-2,2,5,5-tetramethyl-1,3-dioxan-4-carboxamid (**63**), H<sub>2</sub>O, 28 h, RT, 2.2%; e) NaHCO<sub>3</sub>, HSNAC, H<sub>2</sub>O, 4 h, RT, quant.

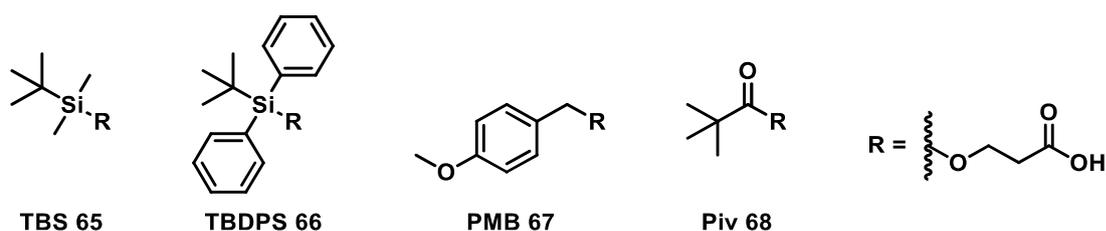
Der für die MASAMUNE-Route **A** benötigte SNAC-halbthioester **50** wurde ausgehend vom Halbthiophenolester **53** über eine Umesterung nach SHERMAN *et al.* erhalten.<sup>[113]</sup> Die von SHERMAN beschriebene Isolierungsprozedur mit einem Ionenaustauscherharz wurde verworfen und durch eine pH-Wert-abhängige stufenweise Isolierung und Reinigung ersetzt. Bei Umsetzungen von unter einem Gramm wurden dadurch quantitative Ausbeuten erreicht und im Multigrammmaßstab Ausbeuten von 61% (25 g). Da das

HSNAC (**58**) eine verkürzte Variante des Pantetheins darstellt, wurde versucht die Vorschrift auf die Umesterung mit dem geschützten Pantethein-Derivat **63** zu übertragen. Die bestehende Isolierungsprozedur führte in einem einmaligen Reaktionstest zu einer geringen Ausbeute von 2.2% (32 mg). Die Synthese des Malonsäure(pantethein)halbthioesters **64** ist somit über diesen Weg möglich, müsste aber mindestens bei der Isolierung des sehr hydrophilen Produkts optimiert werden.

### 3.3.3 Synthese spezieller Carbonsäurebausteine

Die Untersuchungen der KR-Domänen sollten mit einer Substratbibliothek sterisch unterschiedlich anspruchsvoller  $\beta$ -Ketothioester erfolgen. Zur Bereitstellung dieser war eine Vielzahl an Carbonsäuren nötig, die in der decarboxylativen CLAISEN-Kondensation eingesetzt werden konnten.

Für die decarboxylativen CLAISEN-Kondensation sollten neben kommerziell erhältlichen Säuren zusätzlich unterschiedlich geschützte 3-Hydroxypropansäuren einbezogen werden, um sterisch ausgedehnte Polyketidfragmente zu erhalten, welche typischen Intermediaten von Polyketidsyntheserouten ähneln. Ausgewählt wurden zwei silylische, eine benzyliche und eine acetyliche Schutzgruppe (Abbildung 3-9). Die Synthesen der Carbonsäurebausteine **65**, **66**, **67** und **68** ausgehend von 1,3-Propandiol (**163**) (Schema 3-6, S. 34).



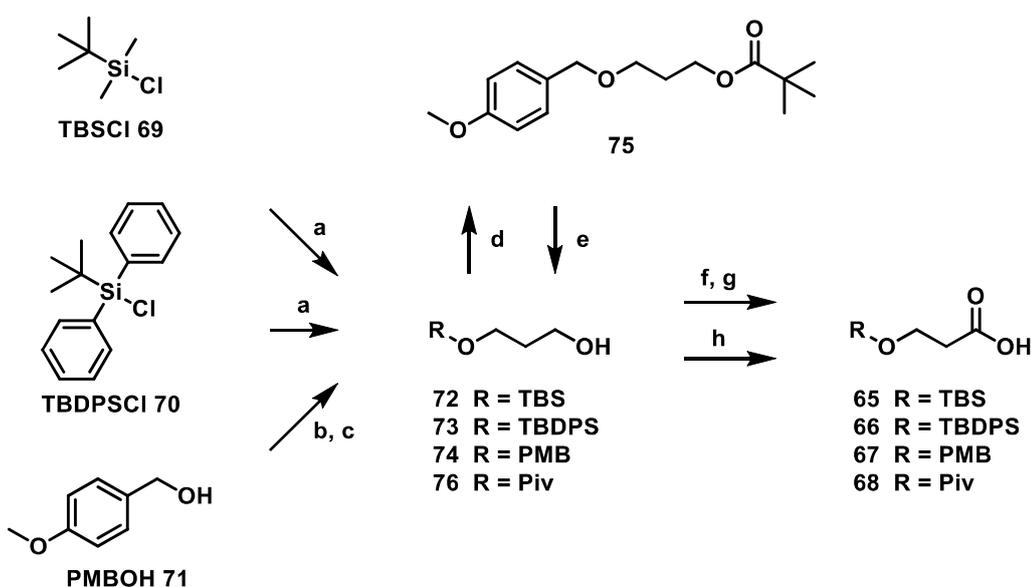
**Abbildung 3-9: Gewählte Alkohol-Schutzgruppen.**

TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl, TBDPS = *tert*-Butyldiphenylsilyl, PMB = *para*-Methoxybenzyl, Piv = Pivaloyl.

Die silylische Schutzgruppen TBS und TBDPS wurden als Silylchloride nach einer Vorschrift von DONNER eingebracht und die entsprechenden Monosilylether **72** (2.5 g, 90%) und **73** (7.8 g, quant.) isoliert.<sup>[114]</sup> Das PMB-Chlorid **164** (15 g, 99%) wurde nach AKAMANCHI *et al.* aus 4-Methoxybenzylalkohol (PMBOH, **71**) dargestellt und der Mono-PMB-Ether **74** (5.7 g, 50%) nach MENCHE *et al.* synthetisiert.<sup>[115,116]</sup> Alle drei geschützten

Diolen wurden daraufhin einzeln in einer SWERN-Oxidation zum jeweiligen Aldehyd umgesetzt (TBS **165**: 2.5 g, 90%; TBDPS **166**: 7.8 g, quant.; PMB **167**: 1.7 g, 84%) und anschließend in einer PINNICK-Oxidation in die entsprechenden Carbonsäuren überführt (TBS **65**: 240 mg, quant.; TBDPS **66**: 690 mg, 98%; PMB **67**: 2.5 g, quant.; Schema 3-6, S. 34).

Die Pivaloyl-Schutzgruppe wurde nach einer Vorschrift von YONEMITSU *et al.* als Säurechlorid zur Schützung des primären Alkohols **74** eingesetzt (Ester **75**: 940 mg, 78%), da eine entsprechende Reaktion mit 1,3-Propandiol zu einem Gemisch aus mono- und di-pivalierten Produkten geführt hätte.<sup>[117]</sup> Die PMB-Gruppe wurde daraufhin mittels DDQ-Oxidation nach KITAHARA *et al.* abgespalten und der entstandene Alkohol **76** ebenfalls einer SWERN-Oxidation unterzogen.<sup>[118]</sup> Dies führte allerdings nur zu Spuren des entsprechenden Aldehyds **168** und dem Verlust des Startmaterials. Der Alkohol **76** wurde daraufhin in einer JONES-Oxidation nach einer Vorschrift von ZHAO *et al.* zur Carbonsäure **68** oxidiert, wobei Chrom(VI)-oxid in katalytischen Mengen (2 mol%) mit Periodsäure (4 Äq.) als Cooxidans verwendet wurde.<sup>[119]</sup> Der Pivaloyl-geschützte Alkohol **76** konnte nach dieser Methode erfolgreich in die Carbonsäure **68** überführt werden (410 mg, 92%, Schema 3-6). Der Versuch 3-((Triethylsilyl)oxo)propanol analog zu oxidieren, führte zur vollständigen Zersetzung des Startmaterials.

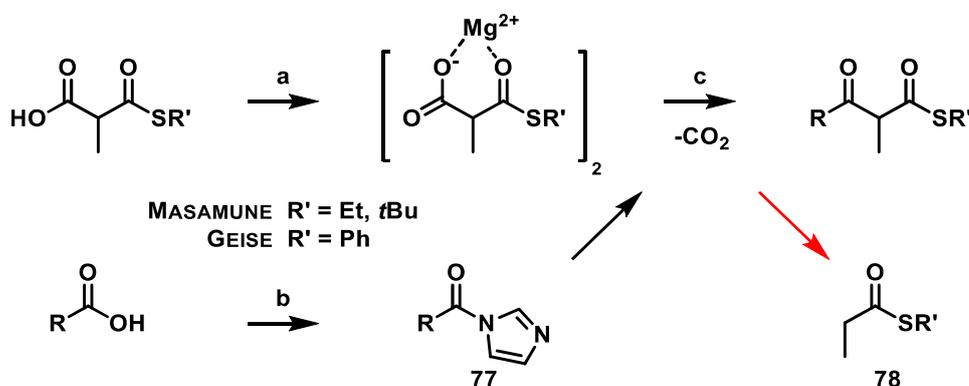


**Schema 3-6: Synthesen der Carbonsäurebausteine 65, 66, 67 und 68.**

a) 1,3-Propandiol (**163**), NaH, THF, 45 min, RT, TBS **72**: 90%, TBDPS **73**: quant.; b) Thionylchlorid, Benzotriazol, Dichlormethan, 0 °C auf RT, 99%; c) 1,3-Propandiol, NaH, DMF, 0 °C auf RT, ü.N., 50%; d) **74**, Pivaloylchlorid, Pyridin, 1.5 h, 0 °C, 78%; e) DDQ, Dichlormethan, H<sub>2</sub>O, 2 h, RT, 79%; f) DMSO, Oxalylchlorid, DIPEA, Dichlormethan, 2 h, -78 °C auf RT, TBS **165**: 90%, TBDPS **166**: quant., PMB **167**: 84%; g) *tert*-Butanol, Phosphatpuffer pH 7, 2-Methyl-2-buten, NaClO<sub>2</sub>, 0 °C auf RT, TBS **65**: quant., TBDPS **66**: 98%, PMB **67**: quant.; h) Piv **76**, CrO<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub>, Acetonitril, H<sub>2</sub>O, 0 °C, 2.5 h, 92%.

### 3.3.4 Route B: Klassische decarboxylative CLAISEN-Kondensation

Die MASAMUNE-Route **B** mit der *klassischen* decarboxylativen CLAISEN-Kondensation während der zweiten Stufe stützte sich auf eine Veröffentlichung von MASAMUNE *et al.* aus dem Jahr 1979. In dieser wurde eine CLAISEN-Kondensation in Tetrahydrofuran beschrieben, welche zwischen einer Imidazol-aktivierten Carbonsäure und einem Malonsäurehalbthioester stattfand. Zusammen mit einem Magnesiumsalz, welches die Malonsäure-Einheit komplexierte, wurde unter Abspaltung von Kohlenstoffdioxid die Enolat-Komponente bereitgestellt. Die C-C-Bindungsbildung erfolgte daraufhin über einen nucleophilen Angriff auf die aktivierte Carbonylkomponente und ein entsprechender  $\beta$ -Ketothioester wurde isoliert.<sup>[109]</sup>



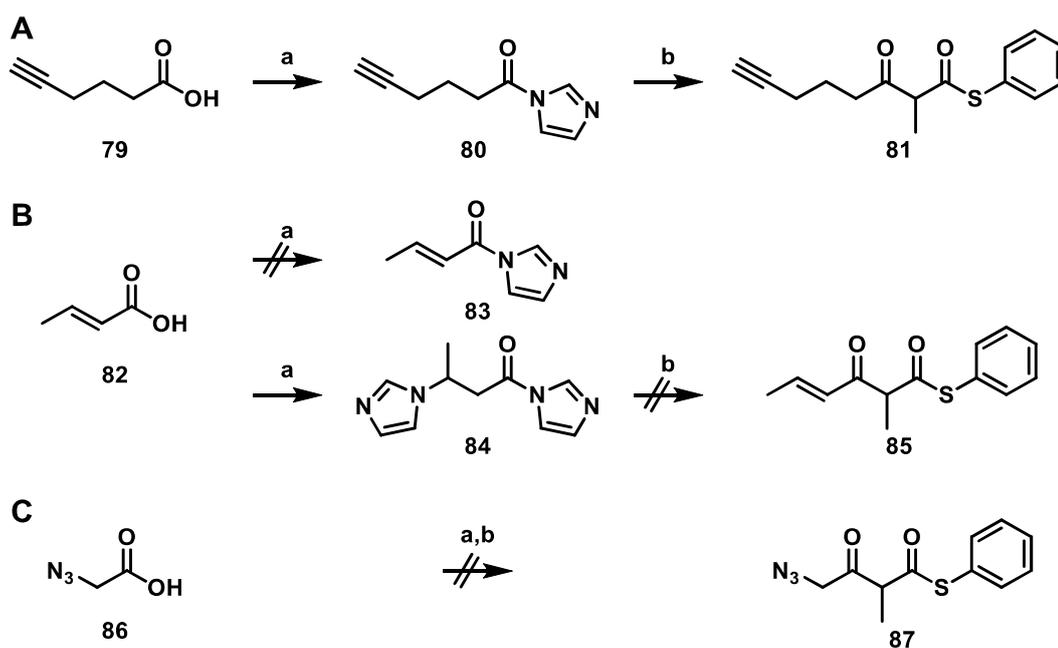
**Schema 3-7: Gesamtübersicht der decarboxylative CLAISEN-Kondensation nach MASAMUNE *et al.***

a)  $\text{MgBr}_2 \cdot \text{OEt}_2$ , THF, RT, 1 h; b) CDI, THF, RT, 2 h; c) 77, THF, RT, 18 h.<sup>[109]</sup> Roter Pfeil: Decarboxylierung ohne C-C-Bindungsaufbau.

Die ersten Reaktionen erfolgten mit Propionsäure als Carbonylkomponente und dem Halbthiophenolester **53** und wurden mit zwei verschiedenen Magnesiumsalzen getestet: Magnesiummethanolat und Magnesiumbromiddiethyletherat. Die Auswertung ergab, dass bei der Verwendung von Magnesiummethanolat größtenteils das Decarboxylierungsprodukt **78-Ph** und nur Spuren des  $\beta$ -Ketoprodukts **59** erhalten wurden. Hingegen wurden unter Verwendung von Magnesiumbromiddietherat Ausbeuten an **59** von 80% erreicht, sodass dieses für die weiteren Optimierungen verwendet wurde.

Die Bildung der aktivierten Form der Carbonylkomponente wurde für zwei funktionalisierte Carbonsäuren genauer betrachtet; die 5-Hexinsäure **79** und die Crotonsäure **82** mit einem MICHEAL-System (Schema 3-8, S. 36). Beide Substanzen wurden von MASAMUNE *et al.* nicht untersucht, allerdings die MICHAEL-System-enthaltende Sorbinsäure (95%).<sup>[109]</sup>

Das Imidazolat **80** der Alkensäure **79** konnte isoliert werden und die weitere Umsetzung ergab das  $\beta$ -Keto-7-oktin-Produkt **81** (90%). Bei der Verwendung der Crotonsäure **82** konnte das korrespondierende Imidazol **83** nicht gefunden werden, sondern der Imidazoylester **84**, da zusätzlich zur Aktivierung der Säurefunktion eine MICHAEL-Addition stattfand. Die Verbindung **84** wurde ebenfalls in die CLAISEN-Kondensation eingesetzt, wonach ein Substanz-Gemisch isoliert wurde, in dem die Produktmasse nicht nachgewiesen werden konnte. Mit Bezug auf die Umsetzung der Crotonsäure mit CDI konnten die Studien von VARELAS *et al.* bestätigt werden, wonach das Produkt **84** ebenfalls erhalten wurde. Die Anwendbarkeit der MASAMUNE Reaktionsvorschrift ist für MICHAEL-Akzeptoren daher nicht geeignet.<sup>[120]</sup> Die CDI-Aktivierung in Gegenwart eines Azids stellt nach JÜRJENS *et al.*<sup>[121]</sup> kein Problem dar, jedoch konnten bei der Umsetzung von Azidoessigsäure **86** weder das Azido- $\beta$ -Keto-Produkt **87** noch Nebenprodukte isoliert werden.

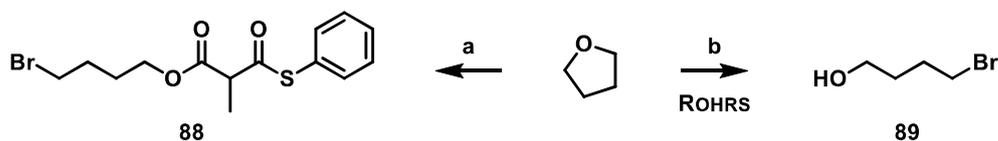


**Schema 3-8: Carbonsäure-Aktivierung und decarboxylative CLAISEN-Kondensation für**

A) 5-Hexinsäure **79**, B) Crotonsäure **82** und C) Azidoessigsäure **86** mit isolierten Zwischen- bzw. Nebenprodukten. a) CDI, THF, RT, 2 h; b)  $\text{MgBr}_2 \cdot \text{OEt}_2$ , Malonsäureester **53**, THF, RT, 18 h; **79** zu **81**: 65%.

Weitere Untersuchungen der decarboxylativen CLAISEN-Kondensation führten zur Isolation eines bromierten Nebenprodukts **88**. Dieses konnte als (4-Brombutyl)oxoester des Malonsäurethioester **53** identifiziert werden. Der enthaltene  $\text{C}_4$ -Körper stammt vermutlich aus dem Lösungsmittel. Für Tetrahydrofuran in Anwesenheit von Salzsäure ist die Öffnung des Ethers beschrieben und ROHRS nutzt die bessere Nukleophilie des Broms zur Synthese

von 4-Brombutanol (**89**) unter milden Bedingungen.<sup>[122,123]</sup> Der nucleophile Angriff des primären Alkohols des 4-Brombutanols (**89**) an die durch Magnesium komplexierte Malonsäure-Einheit **53** erklärt die Bildung des identifizierten Nebenprodukts **88** (Schema 3-9). Acetonitril wurde als alternatives, aprotisches Lösungsmittel getestet und das Nebenprodukt **88** konnte bei diesen Reaktionen nicht nachgewiesen werden.



**Schema 3-9: Entstehung des bromierten Nebenprodukts 88 und Synthese von 4-Brombutanol (89).**  
 a)  $\text{MgBr}_2 \cdot \text{OEt}_2$ , Malonsäureester **53**, Imidazol, RT, 18 h; b)  $\text{HBr}$ , 5 °C, 4.5 h, 77%.<sup>[123]</sup>

Die Umstellung von Tetrahydrofuran auf Acetonitril führte erfolgreich bei allen untersuchten Carbonsäuren zu höhere Ausbeuten (Tabelle 3-7, S. 38). Die größten Steigerungen konnten beim Einsatz von Essigsäure ( $\beta$ -Ketoprodukt **90**), Cyclohexansäure ( $\beta$ -Ketoprodukt **93**) und der PMB-geschützten Propansäure **67** ( $\beta$ -Ketoprodukt **94**) mit einer Verdreifachung der Ausbeute erzielt werden. Insgesamt konnten elf  $\beta$ -Keto- $\alpha$ -methylthiophenol-ester mit der decarboxylativen CLAISEN-Kondensation erfolgreich synthetisiert werden.

Die Bildung der  $\beta$ -Keto-Produkte war in den  $^1\text{H}$  NMR-Spektren anhand der charakteristischen Dublett- bzw. Triplettsignale der Enol-Form bei 13.5 ppm ersichtlich. Die erhöhte Acidität der  $\alpha$ -Position und ausgeprägte Keto-Enol-Tautomerie von 1,3-Diketonen wurde bereits von ROGERS *et al.* untersucht und mit äquivalenten Verschiebungen in  $^1\text{H}$  NMR-Spektren beschrieben.<sup>[124]</sup> Diese Beobachtung war auch auf die entsprechenden SNAC-thioester übertragbar.

### Umesterung von Thiophenolestern zu *N*-Acetylcysteaminestern

Die Umesterung am Ende der MASAMUNE-Route **B** erfolgte nach einer Vorschrift von KANDZIORA *et al.*<sup>[125]</sup> Die  $\beta$ -Kethiophenolester wurde im Überschuss von HSNAC (**58**, 9 Äq.) umgesetzt. Das von KANDZIORA *et al.* verwendete DMF wurde durch das einfacher zu entfernende, ebenfalls polare und aprotische Acetonitril ersetzt. Da das HSNAC **58** sehr ähnliche chromatographische Eigenschaften wie der korrespondierende Thioester besitzt, wurden alle freien Thiole mittels Filtration über Kupfersulfat-imprägniertem Silika entfernt (Kapitel 6.6, S. 145).

Tabelle 3-7: Decarboxylative CLAISEN-Kondensation mit Methylmalonsäurehalbthiophenolester **53**.

P	R	Lösungsmittel	Ausbeute
90		THF	31%
		MeCN	89%
59		THF	91%
		MeCN	100%
91		THF	65%
		MeCN	71%
81		THF	90%
92		THF	72%
		MeCN	80%
93		THF	36%
		MeCN	84%
94		THF	21%
		MeCN	67%
95		THF	54%
96		THF	44%
97		THF	(26%) <sup>b</sup>
98		THF	(60%) <sup>b</sup>
87		THF	-

<sup>a</sup> MgBr<sub>2</sub>·OEt<sub>2</sub>, Malonsäureester **53**, CDI, 18 h, RT. <sup>b</sup> Umsatz, keine isolierte Ausbeute.

Die beschriebene Prozedur konnte erfolgreich auf sieben der acht umgesetzten Thiophenolester angewandt werden und lieferte Ausbeuten von 74–93% (Tabelle 3-8, S. 39). Bei der Reaktion von TBS-Thiophenolester **95** konnten nur das TBS-Silanol und das Dimer **99** des HSNAC **58** isoliert werden.

Das Homodimer **99** und das gemischte Dimer **100** aus Thiophenol und HSNAC **58** waren regelmäßig nach der Aufarbeitung des Rohprodukts nachweisbare und konnten teils nur aufwendig von den SNAC-estern mittels Säulenchromatographie entfernt werden. Das Homodimer **99** entsteht auch bei der längeren Lagerung von lösungsmittelfreien SNAC-thioestern bei Raumtemperatur. Bei der Lagerung bei 4 °C oder -20 °C konnte dies nicht beobachtet werden.

Tabelle 3-8: Transesterifizierung nach KANDZIORA *et al.*

P	R	Zeit	Ausbeute
<b>34</b>		35 min	87%
<b>35</b>		ü.N.	93%
<b>101</b>		30 min	82%
<b>102</b>		30 min	80%
<b>103</b>		ü.N.	74%
<b>104</b>		30 min	86%
<b>105</b>		15 min	82%
<b>106</b>		30 min	-

<sup>a</sup> DIPEA, HSNAC, Acetonitril, RT.

**Fazit der klassischen MASAMUNE-Route B**

Die MASAMUNE-Route **B** lieferte reproduzierbar gute Ausbeute. Die Nachteile durch eine vergleichsweise frühe Derivatisierung in der zweiten Stufe ist aufgrund der breit einsetzbaren Reaktionen akzeptierbar.

Sieben  $\beta$ -Keto-SNAC-thioester konnten mit der Route **B** erfolgreich ausgehend von Methylmeldrumsäure (**55b**) über drei Stufen in Ausbeuten von 50–85% dargestellt werden (Tabelle 3-9, S. 40). Die für die Synthese des PMB-geschützten SNAC-Substrats **105** benötigte Carbonsäure **67** konnte über vier Stufen mit einer Ausbeute von 42% aus 4-Methoxybenzylalkohol **71** synthetisiert werden (Schema 3-6, S. 34).

Tabelle 3-9: Zusammenfassung der Synthesen nach Route B ausgehend von Methylmeldrumsäure (**55b**).

P	R	Gesamtausbeute
<b>34</b>		70%
<b>35</b>		85%
<b>101</b>		53%
<b>102</b>		66%
<b>103</b>		54%
<b>104</b>		66%
<b>105</b>		50%

<sup>a</sup> DIPEA, TMSCl, Acetonitril, Thiophenol, 0 °C auf 43 °C, ü.N., 91%; <sup>b</sup> MgBr<sub>2</sub>·OEt<sub>2</sub>, R-COOH, CDI, Acetonitril oder Tetrahydrofuran, RT, 18 h, Details siehe Tabelle 3-7 (S. 38); <sup>c</sup> DIPEA, HSNAC, Acetonitril, RT, Details siehe Tabelle 3-8 (S. 39).

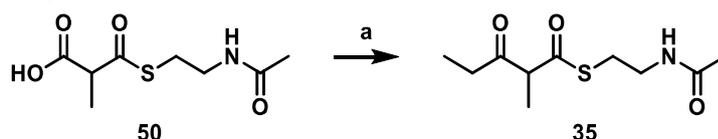
### 3.3.5 Route A: Flexiblere decarboxylative CLAISEN-Kondensation

Ein Versuch die Route **B** zu optimieren, führte zur *flexiblere* MASAMUNE-Route **A**. Die Derivatisierung findet bei dieser Variante auf der letzten Reaktionsstufe statt.

Der Zugang zu dieser Route wurde durch die erfolgreiche Synthese des Methylmalonsäure-(SNAC)halbthioesters (**50**) möglich (Kapitel 3.3.2, S. 32). Die erhöhte Hydrophilie im Vergleich zum Halbthiophenolester **53** verschlechterte die Löslichkeit in Tetrahydrofuran. H. GEISE untersuchte im Rahmen seiner Masterarbeit verschiedene Gemische aus Tetrahydrofuran und Wasser, 2-Propanol oder Dimethylformamid (Tabelle 3-10, S. 41). Die Verwendung von 2-Propanol führte hierbei zu keiner Umsetzung. Für die Reaktionen mit Tetrahydrofuran und Wasser oder Dimethylformamid ließen sich Spuren des  $\beta$ -Ketothioesters **35** nachweisen.<sup>[107]</sup>

Die Optimierung der decarboxylativen CLAISEN-Kondensation innerhalb der Route **B** zeigte bereits, dass eine Substitution von Tetrahydrofuran durch das polar-aprotische Acetonitril möglich war. Zusätzlich verlief die Umesterung der Route **B** in Acetonitril ohne Löslichkeitsprobleme. Acetonitril wurde daher für die CLAISEN-Kondensation mit dem SNAC-halbthioester **50** getestet und eine Ausbeute von 19% erreicht. Die verbesserte Verfügbarkeit der Komponenten war direkt sichtbar, aber noch nicht zufrieden stellend.

Tabelle 3-10: Optimierung der decarboxylativen CLAISEN-Kondensation mit SNAC-Halbthioester (**50**).



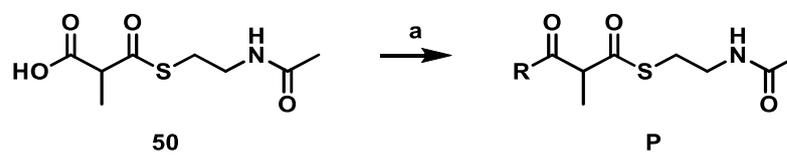
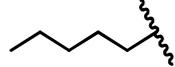
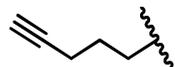
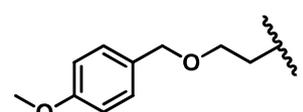
Reaktion	Lösungsmittel	T	Ausbeute
1	THF / iPrOH	RT	-
2	THF / H <sub>2</sub> O	RT	Spuren
3	THF / DMF	RT	Spuren
4	MeCN	RT	19%
5	MeCN	30 °C	41%
6	MeCN	35 °C	55%
7	MeCN	40 °C	11%

<sup>a</sup> MgBr<sub>2</sub>·OEt<sub>2</sub>, Propionsäure, CDI, 18 h.

In einer weiteren Optimierung wurden drei Reaktionstemperaturen von 30 °C bis 40 °C untersucht (Tabelle 3-10, S. 41). Die höchste Ausbeute mit 55% (115 mg) wurde bei 35 °C erreicht. Eine Erhöhung auf 40 °C führte hauptsächlich zur Isolation des decarboxylierten SNAC-esters **78** (Schema 3-7, 35), welches bei 35 °C nicht isoliert werden konnte.

Basierend auf den erzielten Reaktionsoptimierungen wurde die *flexiblere* decarboxylative CLAISEN-Kondensation für drei weitere Carbonsäuren erfolgreich durchgeführt: Hexansäure (**101**: 54%, 135 mg), 5-Hexinsäure **79** (**102**: 61%, 150 mg) und PMB-Carbonsäure **67** (**105**: 43%, 144 mg).

Tabelle 3-11: Decarboxylative CLAISEN-Kondensation mit Methylmalonsäure-(SNAC)halbthioester (**50**).

		
P	R	Ausbeute
<b>35</b>		55%
<b>101</b>		54%
<b>102</b>		61%
<b>105</b>		43%

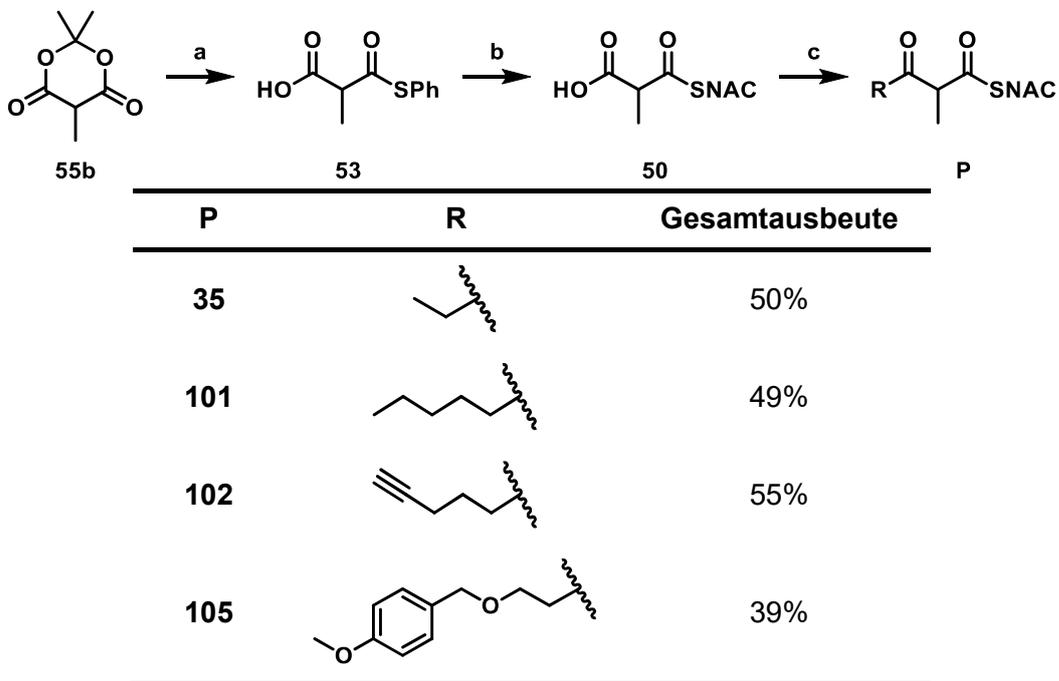
<sup>a</sup> MgBr<sub>2</sub>·OEt<sub>2</sub>, R-COOH, CDI, Acetonitril, 35 °C, 18 h.

### Fazit der *flexibleren* MASAMUNE-Route A

Die MASAMUNE-Route **A** konnte erfolgreich etabliert werden, wenn auch auf niedrigerem Ausbeuteniveau als Route **B**. Vier  $\beta$ -Keto-SNAC-thioester konnten ausgehend von Methylmeldrumsäure (**55b**) über drei Stufen erfolgreich in Ausbeuten von 39–55% erhalten werden (Tabelle 3-12, S. 43). Es konnte am Standort der Leibniz Universität Hannover gezeigt werden, dass die finale Stufe der Route **A** als Schlüsselschritt der Derivatisierung

geeignet ist. Leider ließ sich dieses Ergebnis nicht am Standort der Universität Bayreuth reproduzieren.

Tabelle 3-12: Zusammenfassung der Synthesen nach Route B ausgehend von Methylmeldrumsäure (55b).



<sup>a</sup> DIPEA, TMSCl, Acetonitril, Thiophenol, 0 °C auf 43 °C, ü.N., 91%; <sup>b</sup> NaHCO<sub>3</sub>, HSNAC, H<sub>2</sub>O, 4 h, RT, quant.; <sup>c</sup> MgBr<sub>2</sub>·OEt<sub>2</sub>, R-COOH, CDI, Acetonitril, 35 °C, 18 h.

### 3.3.6 Synthese der $\beta$ -Hydroxyreferenzen

Die Auswertung der relativen und absoluten Stereoselektivitäten innerhalb der enzymatischen Reduktionen mittels NMR-Spektroskopie und chiraler HPLC benötigte entsprechende racemische  $\beta$ -Hydroxy-SNAC-thioester-Referenzen. Diese wurden durch die chemische Reduktion mit Natriumborhydrid erfolgreich hergestellt. Die Ausbeuten sind in Tabelle 3-13 (S. 44) aufgeführt und lagen in einem Bereich von 24–69%. Die angegebenen Diastereomerenverhältnisse basieren auf der Auswertung mittels chiraler HPLC. Die Bestimmung der relativen Konfiguration erfolgte über die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Protonensignale in den  $^1\text{H}$  NMR-Spektren. Eine detailliertere Betrachtung erfolgt in Kapitel 3.4.1 (S. 45).

Tabelle 3-13: Reduktion von  $\beta$ -Keto-SNAC-thioestern mit Diastereomerenverhältnis (*dr*) der Produkte.

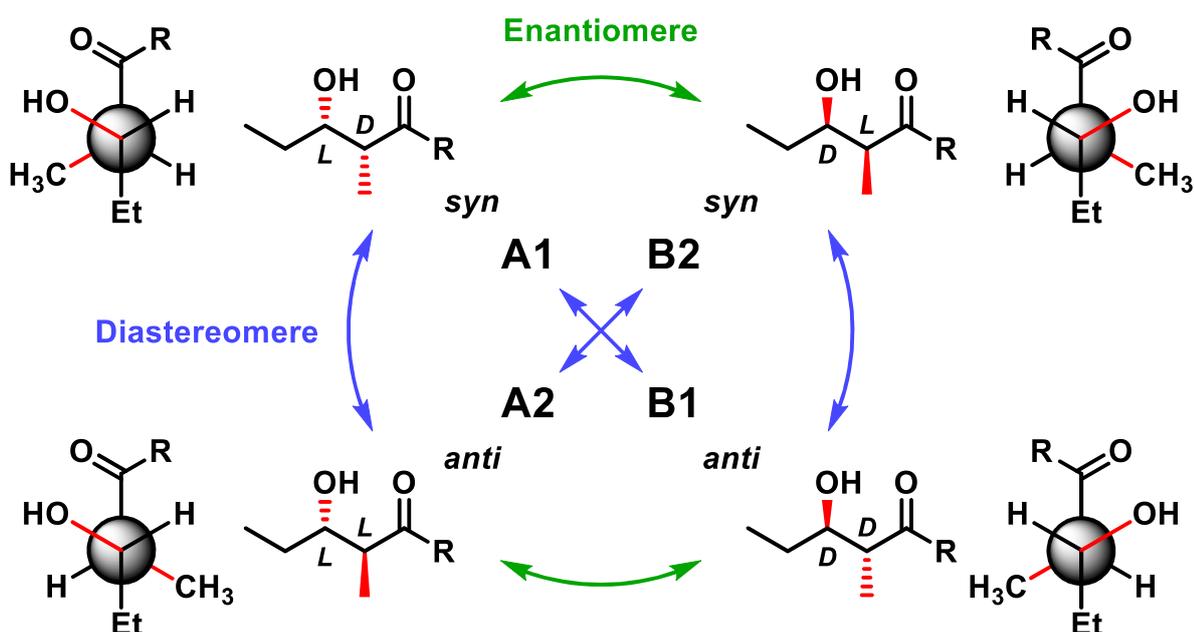
P	R	Ausbeute	$dr_{syn:anti}^b$
107		47%	31:69
108		37%	24:76
109		24%	60:40
110		28%	29:71
111		52%	6:94
112		51%	2:98
113		69%	24:76

<sup>a</sup>  $\text{NaBH}_4$ , MeOH oder EtOH, 0 °C, 0.5-5.0 h. <sup>b</sup> Die relativen Konfigurationen (*syn/anti*) wurden auf Basis der Untersuchungen in Kapitel 3.4.1 (S. 45) zugeordnet.

### 3.4 Studien zur Konfigurationsbestimmung

Die Ketoreduktasedomänen aus PKS-Biosynthesewegen sind hoch stereoselektiv und erzeugen während der  $\beta$ -Ketoreduktion nur eines aus zwei  $\alpha$ -unmethyliert oder eines aus vier  $\alpha$ -methyliert möglichen Stereoisomeren.

Die korrekte Identifizierung der relativen und abschließend der absoluten Produktkonfigurationen ist daher eine zentrale Herausforderung. Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf  $\alpha$ -methyliert KR-Reduktionsprodukte.



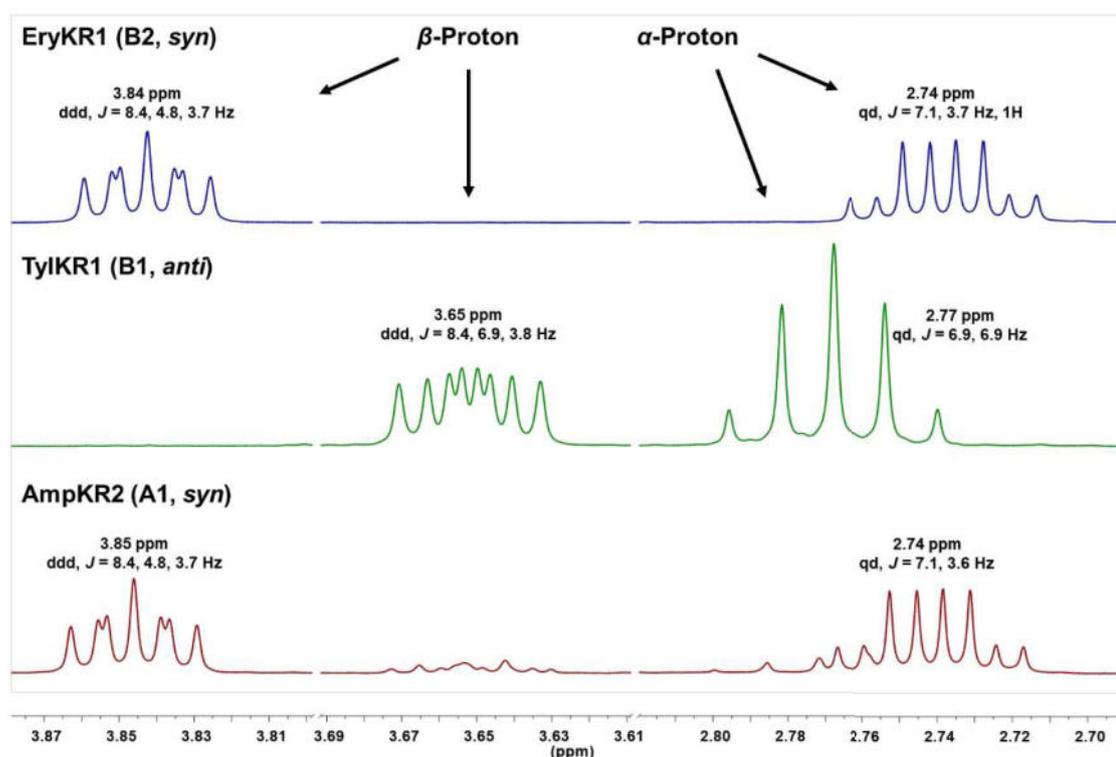
**Schema 3-10: Konfigurationen der vier möglichen Stereoisomere eines  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -methylthioesters.** Gezeigt mit der entsprechenden NEWMAN-Projektion der C2-C3-Bindung. R = SNAC oder S-ACP. S/R-Nomenklatur für gezeigte C5-Alkylkette: A1 = 2R,3S; A2 = 2S,3S; B1 = 2R,3R; B2 = 2S,3R.

#### 3.4.1 Studien zur Bestimmung der relativen $\alpha,\beta$ -Konfiguration

Die Einteilung der PKS-KRs in die vier Gruppen A1, A2, B1 und B2 entsprechen den vier möglichen Reduktionsprodukten von  $\alpha$ -methylierten Substraten, die aufgrund der zwei definierten Stereozentren im Produkt unterschieden werden können. A1- und B2-KR-Domänen erzeugen bei der Reduktion die *syn*-konfigurierten Produkte und KR-Domänen der Typen A2 und B1 die *anti*-konfigurierten. Innerhalb beider Gruppen sind die Produkte enantiomer zueinander; im Vergleich zwischen den Gruppen sind diese diastereomer zueinander. Im Gegensatz zu Enantiomeren besitzen Diastereomere Unterschiede in ihren physikalische Eigenschaften. Diese lassen sich zur spektroskopischen Unterscheidung nutzen.

Die NMR-Spektroskopie wurde für die Differenzierung der Diastereomere genutzt. Aufgrund der unterschiedlichen relativen Konfigurationen besitzen die Atome des  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -methyl-Motivs und benachbarte Atome unterscheidbare chemische Umgebungen, die zu einer Signalverschiebung und zur Änderung der Kopplungskonstanten führen können.

In einer ersten Untersuchung wurde 2-Methyl-3-oxopentansäure(SNAC)thioester (**35**) separat durch AmpKR2 (A1, *syn*), EryKR1 (B2, *syn*) und TylKR1 (B1, *anti*) reduziert. Die anschließend gemessenen  $^1\text{H}$  NMR-Spektren der drei  $\beta$ -Hydroxy-Produkte **108** zeigen für das  $\alpha$ - und das  $\beta$ -Proton deutliche Unterschiede in den Verschiebungen und Multiplizitäten der Signale (Abbildung 3-10, S. 46). Diese bestehen den Erwartungen entsprechend zwischen den *syn*-Produkten und dem *anti*-Produkt, aber nicht innerhalb der beiden vermuteten enantiomeren *syn*-Produkte. Abseits des  $\alpha,\beta$ -Motivs zeigen circa die Hälfte der Protonensignale ebenfalls eine Beeinflussung durch die relative Konfiguration, allerdings nur durch kleine Verschiebungen ( $<0.02$  ppm) und keine Veränderungen der Multiplizitäten.



**Abbildung 3-10:**  $^1\text{H}$  NMR-Spektren der  $\beta$ -Hydroxy-Produkte **35** von EryKR1, TylKR1 und AmpKR2. 3.85 und 3.65 ppm:  $\beta$ -Protonensignale, 2.77 und 2.74 ppm:  $\alpha$ -Protonensignale. (Ausschnitt)

Die  $\alpha$ -Protonensignale der Reduktionsprodukte **35** von EryKR1 und AmpKR2 befinden sich bei 2.74 ppm. Das entsprechende Signal des TylKR1-Produkts befindet sich leicht ins

---

Tieffeld verschoben bei 2.77 ppm. Die Signale des benachbarten  $\beta$ -Protons liegen für EryKR1 und AmpKR2 bei 3.85 ppm. Im Vergleich dazu befindet sich das  $\beta$ -Proton des TylKR1-Produkts ins Hochfeld verschoben bei 3.65 ppm. Die betrachteten Signale der *syn*- und *anti*-Alkohole unterscheiden sich nicht in der Art der Multiplizitäten ( $\alpha$ -H: qd,  $\beta$ -H: ddd), aber in den Kopplungskonstanten (Abbildung 3-10, S. 46; Tabelle 3-14, S. 48).

Die  $^3J_{H,H}$ -Kopplung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proton ist für die Determinierung der relativen Konfiguration zu betrachten. Liegt diese bei einer Bindung mit einem einzigen Hydroxy-substituiertem Bindungspartner zwischen 1 – 4 Hz, weist dies gemäß MATSUMORI *et al.* auf eine *gauche*-Orientierung der Protonen zueinander hin. Bei Werten von 8 – 11 Hz im selben System liegt eine *anti*-Orientierung vor.<sup>[126]</sup>

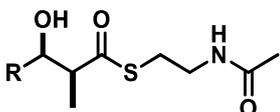
Die Spektren des EryKR1- und des AmpKR2-Produkts zeigen eine  $^3J_{\alpha H, \beta H}$ -Kopplung von 3.7 Hz, womit diese im Bereich für *gauche*-orientierte Protonen liegt (Schema 3-10, S. 45). Dies weist auf die erwartete *syn*-Konfiguration hin. Die 7.0 Hz-Kopplung des Signals der gleichen Bindung im TylKR1-Produkt ist deutlich größer, wenn auch nicht innerhalb des benannten Bereichs für eine *anti*-Orientierung. Da die Orientierung nicht nur von der Konfiguration beeinflusst wird, kann die bevorzugte Konformation des Moleküls zu Abweichungen in den Kopplungskonstanten führen. Bei dem untersuchten  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -methylthioester **108** ist es möglich, dass die Konformation durch eine 1,3-Wasserstoffbrückenbindung aus der *anti*-Phase verschoben vorliegt. Die eindeutige Bestimmung der *anti*-Konfiguration zum TylKR1-Produkts ist zudem durch den Vergleich der  $^1\text{H}$  NMR-Spektren mit den anderen Reduktionsprodukten gegeben. Die korrekte Zuordnung der *syn*-konfigurierten Produkte **108** wurde durch Daten von CHANG *et al.* (2.73 ppm, qd, 1H,  $J = 7.1, 3.7$  Hz) bestätigt.<sup>[127]</sup>

Die Bestimmung der relativen Konfigurationen für die  $\beta$ -Hydroxy-Referenz **108** und den sechs weiteren  $\beta$ -Hydroxy-Referenzen erfolgte wie beschrieben über die  $^3J_{\alpha H, \beta H}$ -Kopplung und über die Verschiebung. Die im Vergleich kleinere  $^3J_{\alpha H, \beta H}$ -Kopplungskonstante und ein ins Tieffeld verschobenes  $\beta$ -Protonensignal zeigten das *syn*-Diastereomerenpaar an. Die entsprechenden Daten der  $^1\text{H}$  NMR-Spektren mit Zuordnung der relativen Konfigurationen sind in Tabelle 3-14 (S. 48) für alle  $\beta$ -Hydroxy-Referenzen aufgeführt. Die Zuord-

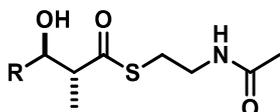
nungen für die  $\beta$ -Hydroxy-Referenzen **107**, **109** und **110** wurden darüber hinaus durch veröffentlichte Daten von LIDDLE *et al.*, CACHO *et al.* und HARVEY *et al.* bestätigt.<sup>[128–130]</sup> Die Diastereomerenverhältnisse der Referenzen **107–113** inklusive Angabe der relativen Konfigurationen sind in Tabelle 3-13 (S. 44) zu finden.

Die angewendete Bestimmung der relativen Konfigurationen mittels  $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplung kann für zukünftige, komplexere Systeme durch 2D-NMR-Studien der entsprechenden  $^3J_{\text{H,C}}$ - und  $^2J_{\text{H,C}}$ -Kopplungen unterstützt werden.<sup>[126,131]</sup>

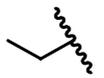
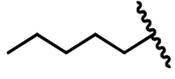
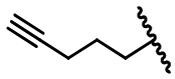
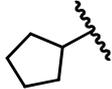
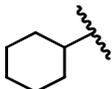
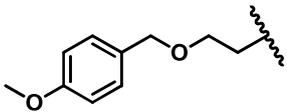
Tabelle 3-14: Zuordnung der relativen Konfigurationen.



*syn-P*



*anti-P*

P	R	<i>syn-P</i>		<i>anti-P</i>	
		$\alpha$ -H [ppm] ( <i>J</i> [Hz])	$\beta$ -H [ppm] ( <i>J</i> [Hz])	$\alpha$ -H [ppm] ( <i>J</i> [Hz])	$\beta$ -H [ppm] ( <i>J</i> [Hz])
<b>107</b>		2.69 (m)	4.11 (6.4, 4.0)	2.69 (m)	3.94 (6.4, 6.4)
<b>108</b>		2.73 (7.1, 3.7)	3.84 (8.4, 4.8, 3.7)	2.76 (7.0, 7.0)	3.65 (8.4, 7.0, 3.8)
<b>109</b>		2.72 (7.0, 3.6)	3.92 (m)	2.75 (7.1, 7.0)	3.71 (m)
<b>110</b>		2.75 (m)	3.95 (m)	2.75 (m)	3.74 (m)
<b>111</b>		2.84 (7.1, 5.6)	3.72 (m)	2.84 (7.1, 5.6)	3.45 (m)
<b>112</b>		2.91 (7.1, 7.1)	3.76 (m)	2.91 (7.1, 7.1)	3.44 (m)
<b>113</b>		2.73 (7.1, 5.6)	4.08 (9.3, 5.6, 2.6)	2.76 (7.4, 7.1)	3.97 (9.8, 7.4, 2.6)

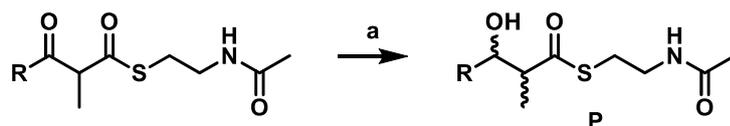
basierend auf den  $^1\text{H}$  NMR-Spektren mittels der Verschiebungen und der Kopplungskonstanten der Protonen des  $\alpha,\beta$ -Motivs der  $\beta$ -Hydroxy-Referenzen.

## Enzymatischer Reduktionen im präparativen Maßstab

$\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -methyl-SNAC-thioester wurden im präparativen Maßstab auf zwei Wegen erzeugt. Die erste Methode war die chemische Reduktion mit Natriumborhydrid, um Referenzgemische zu erhalten (Kapitel 3.3.6, S. 44). Der zweite Weg war die enzymatische Reduktion mit verschiedenen KR-Domänen (Kapitel 3.4.2, S. 50).

In der Tabelle 3-15 (S. 49) sind alle durch enzymatische Reduktion erhaltenen Produkte inklusive Diastereomerenverhältnissen und der Zuordnung der zugehörigen *syn*- und *anti*-Konfiguration aufgeführt. Die präparativen Enzymreaktionen wurden mit 40.0–49.5  $\mu$ mol des jeweiligen  $\beta$ -Keto-SNAC-thioester in 8–10 mL Reaktionsvolumen durchgeführt. Die Ausbeuten lagen zwischen 20–80%, sodass abhängig vom Produkt 2.0–10.5 mg für die weiteren Analysen zur Verfügung standen.

Tabelle 3-15:  $\beta$ -Hydroxy-SNAC-thioester erzeugt durch enzymatische Reduktion im präparativen Maßstab.



P	R	Domäne	Ausbeute	$dr_{syn:anti}^b$
107		AmpKR2	7.2 mg, 60%	54:46
		EryKR1	3.2 mg, 27%	89:11
		TylKR1	4.1 mg, 35%	0:100
108		AmpKR2	4.5 mg, 36%	93:7
		EryKR1	10.0 mg, 80%	100:0
		TylKR1	10.5 mg 84%	0:100
110		AmpKR2	7.0 mg, 54%	76:24
		TylKR1	3.2 mg, 25%	10:90
111		EryKR1	2.0 mg, 20%	- <sup>c</sup>
		MycKRB	5.0 mg, 50%	0:100
113		AmpKR2	9.5 mg, 61%	100:0
		MycKRA	10.0 mg, 64%	21:79
		MycKRB	5.0 mg, 32%	11:89

<sup>a</sup> KR-Domäne, NADPH, HEPES-Puffer, 25 °C, 24 h. <sup>b</sup> Bestimmung mittels <sup>1</sup>H NMR-Spektren. <sup>c</sup> aufgrund von Signalüberlagerungen im <sup>1</sup>H NMR-Spektrum nicht bestimmbar.

### 3.4.2 Studien zur Bestimmung der absoluten $\alpha,\beta$ -Konfiguration

Die Bestimmung der absoluten Konfigurationen der Reduktionsprodukte nach einer enzymatischen oder chemischen Reaktion kann mittels verschiedener Methoden erfolgen. Ausgangspunkt der meisten Methoden sind Referenzmoleküle, deren Konfiguration aufgrund des Synthesewegs bekannt ist. Die Variante mit der direktesten Vergleichbarkeit bietet die Synthese aller Konfigurationsvarianten, die bei der zu untersuchenden Reaktion entstehen könnten.

Wie bereits in der Einleitung dieses Kapitels beschrieben, können bei der Reduktion durch eine PKS-KR-Domäne vier Konfigurationsisomere der  $\alpha$ -methylierten  $\beta$ -Hydroxyester entstehen. Die eindeutige Bestimmung mittels chiraler HPLC benötigt für jedes zu untersuchende Derivat bis zu vier, mindestens aber drei, Konfigurationsreferenzen. Unter Einbezug von Auswertungen mittels RP-UPLC und der damit verbundenen Diastereomerenzuordnung lässt sich die Probenzahl auf ein Enantiomer jedes Diastereomerenpaares (1 $\times$  syn, 1 $\times$  anti) minimieren. Die Anzahl der benötigten Referenzmoleküle dezimiert sich hierdurch für sieben Substrate von zunächst mindestens 21 auf 14 Verbindungen. Jedes zusätzlich zu untersuchende Substrat würde demnach zwei konstruktive Reduktionsreferenzen benötigen.

Der synthetische Aufwand sollte darüber zusätzlich verkleinert werden. Um dies zu ermöglichen wurde nach Methoden gesucht, die eine möglichst direkte Zuordnung der Produktkonfigurationen ermöglichen. Die Bestimmung der absoluten Konfigurationen mittels VCD-Spektroskopie der Reduktionsprodukte und via  $^1\text{H}$  NMR-Spektroskopie entsprechender 9-AMA-Ester wurden näher in Betracht gezogen.

#### **VCD-Spektroskopie von $\alpha$ -methylierten $\beta$ -Hydroxy-SNAC-thioestern**

Die *Vibrational Circular Dichroism*- bzw. VCD-Spektroskopie ermöglicht die Bestimmung der absoluten Konfiguration von kleinen, chiralen Molekülen. Die Methode basiert auf der bei Enantiomeren unterschiedliche Absorption von zirkulär polarisiertem Licht (Circulardichroismus, CD-Spektroskopie). Mit den resultierenden Differenzspektren ( $\Delta\text{Abs.} = \text{Abs. LCPL} - \text{Abs. RCPL}$ ) werden bei der VCD-Spektroskopie die Schwingungen eines Moleküls untersucht, welche das Dipolmoment verändern und somit im IR-Bereich

detektierbar sind.<sup>[132]</sup> Ein Vorteil der VCD-Spektroskopie liegt in der Spezifität der Vibrationszuordnungen, wodurch ein Vergleich gemeinsamer Funktionalitäten zwischen unterschiedlichen Derivaten ermöglicht werden kann.<sup>[133]</sup> Die Zuordnung der absoluten Konfiguration erfolgt dabei über den Abgleich von *ab initio*-Computerberechnungen der zu erwartenden VCD-Spektren.<sup>[134]</sup> Ein Abgleich dieser Berechnungen mit VCD-Messungen von Referenzmolekülen validiert die berechneten Spektren. Die Spektren von Enantiomeren lassen sich dabei durch Symmetrieoperationen ineinander überführen, wodurch die Anzahl benötigter Referenzen sinkt.<sup>[135]</sup>

Die bereits in Kapitel 3.4.1 (S. 45) erwähnten drei KR-Reduktionsprodukte (2-Methyl-3-oxopentansäure(SNAC)thioester **35**) wurden in einer Kooperation mit dem Arbeitskreis MERTEN mittels VCD-Spektroskopie untersucht.<sup>[136]</sup> Der Abgleich mit den *ab initio* berechneten Spektren ermöglichte keine direkte Bestimmung der Konfigurationen auf Grundlage der VCD-Messungen (Abbildung 3-12, S. 52, A, oben). Daraufhin wurden weitere mittels enzymatischer Reduktion erhaltene Substanzen aus Kapitel 3.4.1 (S. 48) einbezogen (Abbildung 3-11, S. 51). Insgesamt wurden neun Proben mittels VCD-Spektroskopie untersucht. Die Probenauswahl enthielt bis zu drei Enantiomere der  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -methyl-SNAC-thioester **108** (Proben von EryKR1, TylKR1, AmpKR2), **110** (TylKR1, AmpKR2), **111** (MycKRB) und **113** (AmpKR2, MycKRA, MycKRB).

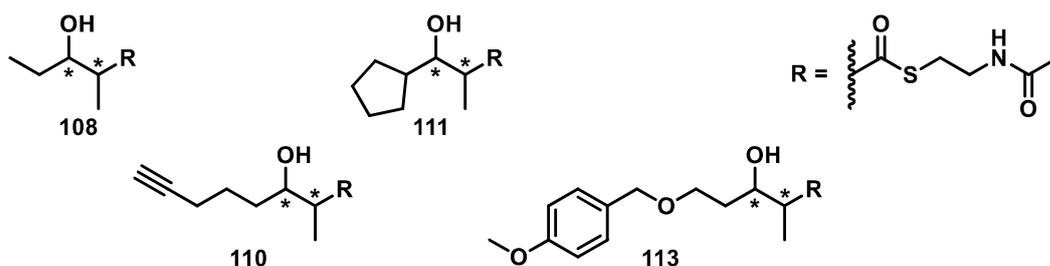
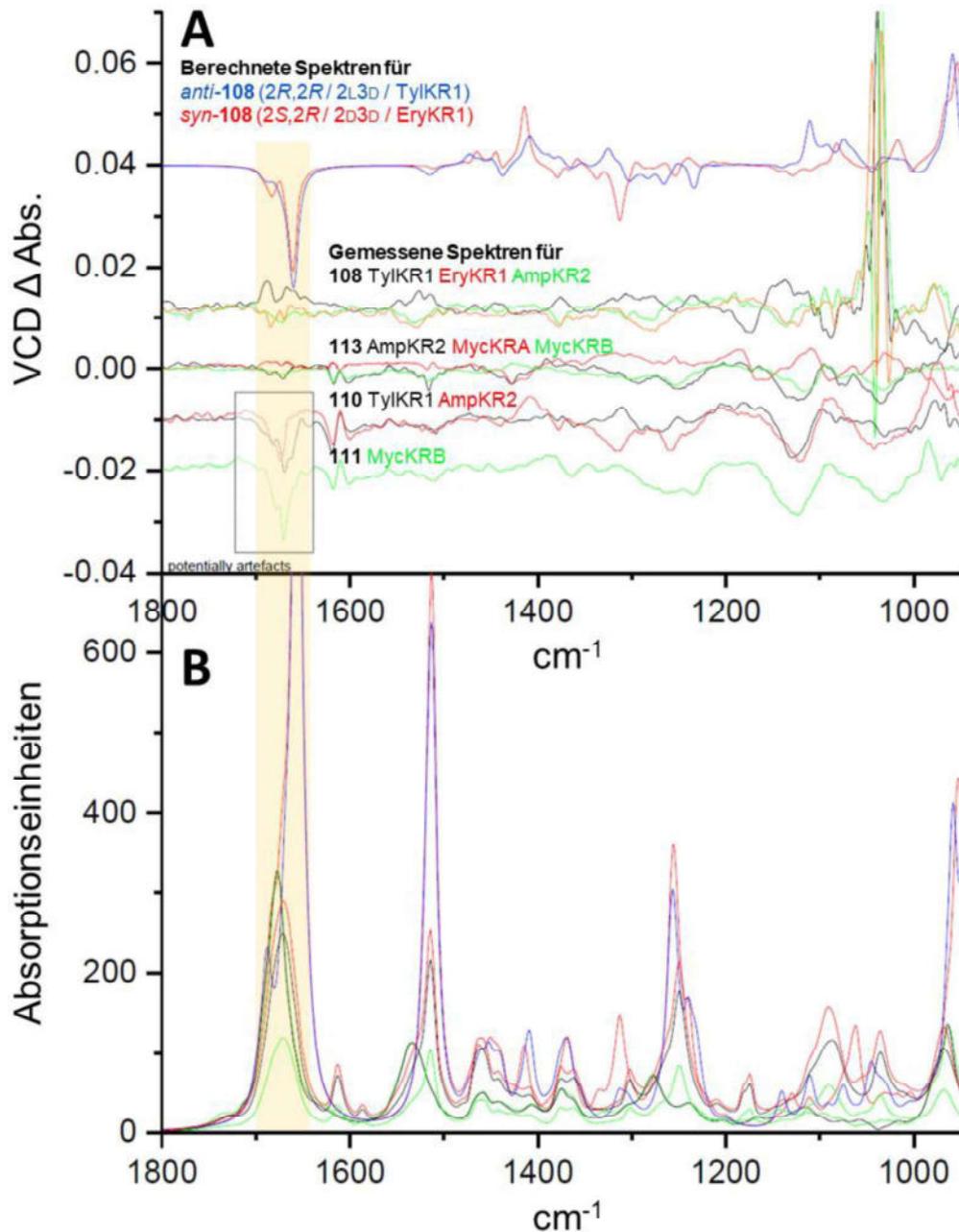


Abbildung 3-11: Strukturen der mittels VCD-Spektroskopie vermessenen Substrate **108**, **110**, **111**, **113**.

Die Auswertung der zusätzlichen Proben ergab keine Verbesserung der Konfigurationszuordnungen, sondern offenbarte eine Problematik von hochfunktionalisierten Molekülen. Ein entscheidender IR-Bereich in den berechneten Spektren lag bei  $1650 - 1700 \text{ cm}^{-1}$  (Abbildung 3-12, S. 52, A, oben). Verschiedene Carbonylverbindungen besitzen allerdings genau in diesem Bereich eine Streckschwingungsabsorption durch die C=O-Doppelbindungen. Die ausgeprägten Carbonylbanden des Thioesters ( $1690 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>[137]</sup> und des

Amids ( $1650 - 1680 \text{ cm}^{-1}$ ) der untersuchten Moleküle überlagerten diesen Bereich, sodass eine Auswertung der Messdaten nicht möglich war (Abbildung 3-12, S. 52, **B**).



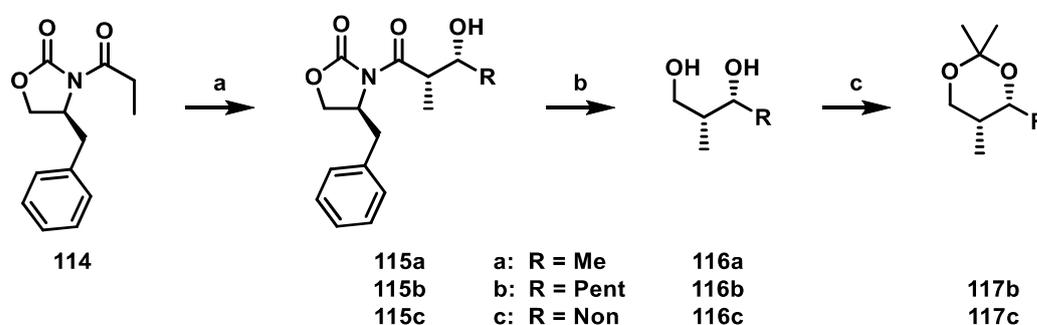
**Abbildung 3-12: VCD- und IR-Spektren der untersuchten SNAC-Substrate.**

A) VCD-Spektren, von oben nach unten: berechnete Spektren für **108** mit 2*L*3*D* und 2*D*3*D*, gemessenen Spektren für die Proben von **108** (TylKR1, EryKR1, AmpKR2), **113** (AmpKR2, MycKRA, MycKRB), **110** (TylKR1, AmpKR2) und **111** (MycKRB). Orange: Bereich, der durch die intensiven IR-Banden der Carbonylfunktionalitäten (COS und CON) überlagert wurde. B) IR-Spektren; berechnet und gemessen.<sup>[133]</sup>

## VCD-Spektroskopie von 1,3-Dioxan-Derivaten

Eine Alternative zur direkten Vermessung von Reaktionsprodukten ist die Transformation dieser in eine für das Messverfahren geeigneteres Derivat. Entsprechende Derivate sollten einen geringen Grad an Funktionalisierung aufweisen und nach Möglichkeit konformationsstabil sein, um intensivere Schwingungsmuster zu erhalten. In Anlehnung an LÜDECKE *et al.* wurde sich dafür entschieden ausgehend von den KR-Reduktionsprodukten eine zweistufige Synthese zu den Acetonid-geschützten Diolen durchzuführen.<sup>[58]</sup> Die VCD-Voruntersuchungen fanden an äquivalenten Referenzmolekülen statt, welche zunächst synthetisiert werden mussten.

Ausgangspunkt der Referenzsynthesen war die stereoselektive EVANS-Aldol-Reaktion auf Basis des benzylsubstituierten EVANS-Auxiliars **173**. Das propionylierte Auxiliar **114** wurde nach einer Vorschrift von BERKHAN *et al.* separat mit Acetaldehyd, Hexanal und Decanal umgesetzt. Die isolierten (2L3D)- $\beta$ -Hydroxyoxazolidinone **115** (**a**: 78%; **b**: 67%; **c**: 78%) wurden mit Lithiumborhydrid zu den entsprechenden (2L3D)-Diolen **116** (**a**: 92%, **b**: 83%, **c**: n.i.) reduziert.<sup>[38]</sup> Die Schützungen der Dirole wurden anschließend mit Dimethoxypropan nach LÜDECKE *et al.* durchgeführt, wobei LÜDECKE *et al.* keine Reinigung vollzog. Beim Entfernen des Lösungsmittels nach erfolgter Säulenchromatographie (Hexan/Ethylacetat) fiel auf, dass die Acetonide **117a** und **117b** stark flüchtig waren. Daraufhin wurde die Säulenchromatographie in einer Reaktionswiederholung auf niedrigsiedende Lösungsmittel umgestellt (Pentan/Diethylether). Das Acetonid **117a** konnte trotzdem nicht angereichert werden, sodass nur die (2L3D)-Acetonide **117b** (21% über zwei Stufen) und **117c** (29% über zwei Stufen) erfolgreich isoliert werden konnten.



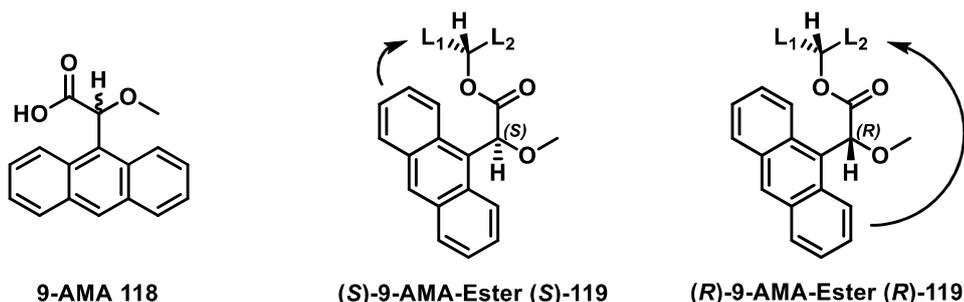
**Schema 3-11: Synthese konformationsstabiler VCD-Referenzen.**

a) **114**, Dibutylboranyltriflat, DIPEA, Acetaldehyd /Hexanal /Decanal, Dichlormethan,  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 4 h, **115a**: 78%, **115b**: 67%, **115c**: 78%; b) LiBH<sub>4</sub>, Diethylether, Methanol,  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , **116a**: 92%, **116b**: 83%, **116c**: n.i.; c) Dimethoxypropan, Aceton, Molekularsieb 3 Å, *p*-Toluolsulfonsäure, RT, 20 h, **117b**: 21% über zwei Stufen, **117c**: 29% über zwei Stufen.

Das nicht flüchtige Dodecyl-Derivat **117c** wurde daraufhin im Arbeitskreis MERTEN mittels VCD-Spektroskopie vermessen und eine Bestimmung der Konfiguration im Abgleich mit *ab initio* berechneten Spektren konnte erfolgreich vollzogen werden. Die Strategie die KR-Reduktionsprodukte in Acetonid-Form mittels VCD-Spektroskopie zu vermessen wurde trotzdem verworfen. Die limitierten Produktmengen der Enzymreaktionstests, die geringen Ausbeuten der Syntheseroute und die Flüchtigkeit der Zielsubstanzen konterkarierten die im Verhältnis großen Substanzmengen (>10 mg), die für eine VCD-Auswertung nötig gewesen wären.

### Konfigurationsbestimmung mit 9-AMA

Eine alternative Konfigurationsbestimmung wurde von RIGUERA *et al.* unter der Verwendung von 2-(Anthracen-9-yl)-2-methoxyessigsäure (9-AMA, **118**) beschrieben und validiert. Der zu untersuchende Alkohol wurde zum 9-AMA-Ester **119** umgesetzt und die  $^1\text{H}$  NMR-Spektren des Ausgangsmaterials und des 9-AMA-Esters **119** verglichen. Das aromatische Ringsystem des 9-AMA schirmt dabei stereospezifisch eine der beiden Seiten ( $L_1/L_2$ ) des Alkohols ab (Abbildung 3-13, S. 54). Mit der Kenntnis über die Konfiguration des verwendeten 9-AMA **118** konnte die Konfiguration des untersuchten Alkohols erfolgreich von RIGUERA *et al.* zugewiesen werden.<sup>[138–140]</sup>

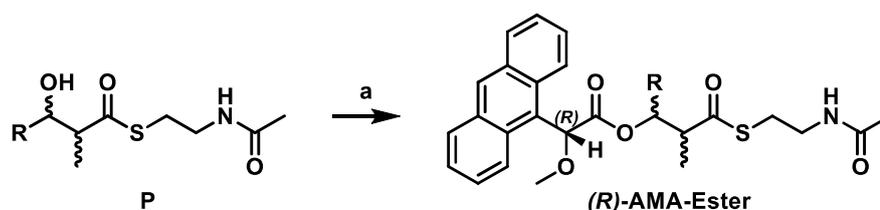


**Abbildung 3-13:** 2-(Anthracen-9-yl)-2-methoxyessigsäure (9-AMA, **118**) und die Abschirmungseffekte von (S)-9-AMA (S)-119 und (R)-9-AMA (R)-119.<sup>[138–140]</sup>

Eine Evaluierung durch T. ROß konnte die Anwendbarkeit der 9-AMA-Methodik erfolgreich bestätigen und auf die vorliegenden  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -methyl-SNAC-thioester übertragen.<sup>[141,142]</sup> Die für die Analysen benötigten 9-AMA-Ester **119** wurden mit 1.0–2.0 mg der enzymatischen Reduktionsprodukte und (R)-9-AMA (R)-**118** dargestellt.

Der Vergleich der  $^1\text{H}$  NMR-Spektren von Alkohol und (*R*)-9-AMA-Ester (*R*)-**119** ermöglichte für alle Proben die eindeutige Zuordnung der L<sub>2</sub>-Gruppe und somit die Bestimmung der absoluten Konfiguration der  $\beta$ -Hydroxygruppe. Die rekombinanten Domänen AmpKR2 und MycKRA erzeugten demnach unabhängig vom Substrat 3L-konfigurierte Alkohole, wohingegen EryKR1, TylKR1 und MycKRB eine 3D-Konfiguration installierten. Zusammen mit den zuvor bestimmten relativen Konfigurationen konnten auch die absoluten Konfigurationen der  $\alpha$ -Methylgruppen zugeordnet werden. Die Ergebnisse der 9-AMA-Analysen mit Angaben der relativen Konfigurationen und den daraus resultierenden vollständigen absoluten Konfigurationen des  $\alpha,\beta$ -Motivs für alle enzymatischen Reduktionsprodukte sind in Tabelle 3-16 zusammengefasst.

**Tabelle 3-16: Ergebnisse der 9-AMA-Analyse mit Angaben zur relativen Konfiguration und der resultierenden absoluten Konfiguration des  $\alpha,\beta$ -Motivs.**



P	R	Domäne	9-AMA-Analyse	$\alpha,\beta$ -Konfiguration	
				relativ	absolut
108		AmpKR2	3S / 3L	<i>syn</i>	2D3L
		EryKR1	3R / 3D	<i>syn</i>	2L3D
		TylKR1	3R / 3D	<i>anti</i>	2D3D
110		AmpKR2	3S / 3L	<i>syn</i>	2D3L
		TylKR1	3R / 3D	<i>anti</i>	2D3D
111		MycKRB	3R / 3D	<i>anti</i>	2D3D
113		AmpKR2	3S / 3L	<i>syn</i>	2D3L
		MycKRA	3S / 3L	<i>anti</i>	2L3L
		MycKRB	3R / 3D	<i>anti</i>	2D3D

<sup>a</sup> P, (*R*)-9-AMA, EDC-HCl, DMAP, Dichlormethan, RT, 1 h.<sup>[142]</sup>

Insgesamt wurden neun enzymatische Reduktionsprodukte mit Blick auf die Konfiguration der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Position untersucht. Im ersten Schritt konnte allen Proben die relative Konfiguration und das dazugehörige Diastereomerenverhältnis erfolgreich zugewiesen werden. Der zweite Schritt umfasste die Bestimmung der absoluten Konfiguration der  $\beta$ -Position unter Anwendung der 9-AMA-Methode. Mit der Zusammenführung beider Teilergebnisse war es möglich die absolute Konfiguration der  $\alpha$ -Methylierung der neun enzymatisch reduzierten Proben erfolgreich zu bestimmen.

Die Ergebnisse der 9-AMA-Studien mit den  $\beta$ -Hydroxy-Verbindungen **108**, **110**, **111** und **113** ließen sich mit Hilfe der Studien zur relativen Konfiguration auf die  $\beta$ -Hydroxy-Verbindungen **107**, **109** und **112** übertragen (Tabelle 3-13/14/15, S. 44/48/49).

Eine ausführliche KR-Domänen-bezogene Auswertung der ermittelten Produktkonfigurationen erfolgt in Kapitel 3.7 (S. 85).

---

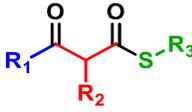
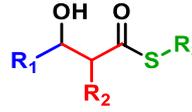
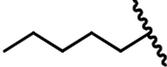
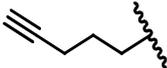
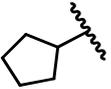
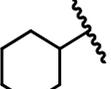
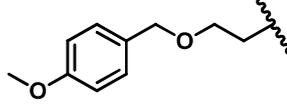
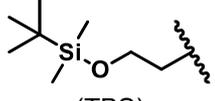
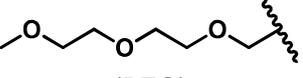
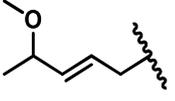
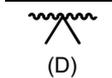
### 3.5 Enzymaktivitätstests und -Kinetiken

Die Studien zur Enzymaktivität wurden basierend auf den selbst aufgebauten Bibliotheken an rekombinanten Ketoreduktase-Domänen und an  $\beta$ -Keto- $\alpha$ -methylthioestern durchgeführt.

Die Bibliothek an rekombinanten KR-Domänen umfasste die sieben Domänen AmpKR1 (A1), AmpKR2 (A2), EryKR1 (E1 und die Derivate E1H und E1P), EryKR6 (E6), TylKR1 (T1 und die Derivate T1H und T1P), MycKRA (MA) und MycKRB (MB). Alle KR-Domänen besaßen einen *N*-terminalen Histidin-6-*tag* (His<sub>6</sub>-*tag*). Es wird im Weiteren auf den Hinweis zur rekombinanten Natur der untersuchten KR-Domänen verzichtet. Aussagen zu den in PKS integrierten KR-Domänen werden sprachlich als solche hervorgehoben.

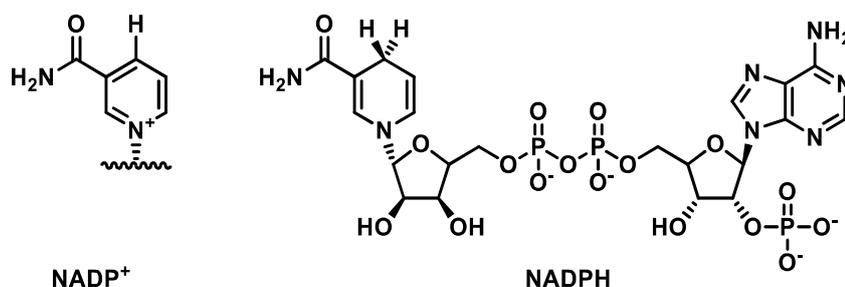
Die Substratbibliothek enthielt insgesamt elf SNAC-Thioester und sechs Thiophenol-ester. Aus Gründen der besseren Übersicht wird im Folgenden eine eigene Nomenklatur für die Substratbezeichnungen verwendet. Diese basiert auf einer vierteiligen Kurzform, welche sich aus den Bezeichnungen des Keto-, des Zentral- und des Thiofragments, sowie einem Präfix zusammensetzt (Tabelle 3-17, S. 58). Der Polyketidteil (erster Teil der Kurzform) wurden in Methyl (M), Ethyl (E), Pentyl (Pa), 4-Pentynyl (Pi), Cyclopentyl (CP), Cyclohexyl (CH), (4-Methoxybenzyl)oxyethyl (PMB), (*tert*-Butyldimethylsilyl)oxyethyl (TBS), Polyethylenglycol (PEG) und 4-Methoxy-2-pentenyl (MPe) unterschieden. Die Varianten des Zentralfragments (zweiter Teil der Kurzform) wurden in  $\alpha$ -unmethyliert (H),  $\alpha$ -methyliert (M) und  $\alpha$ -dimethyliert (D) differenziert. Die beiden einbezogenen Varianten der Thioester bzw. Thiofragmente wurden mit *N*-Acetylcysteamin (N) und Thiophenol (P) als dritter Teil der Kurzform einbezogen. Die Präfixe „K“ bzw. „H“ definieren, ob es sich um die  $\beta$ -Keto- bzw. die  $\beta$ -Hydroxy-Substanz handelte.

Tabelle 3-17: Übersicht der Substanz-Bibliothek unter Einbezug der Kurzform-Bezeichnung und der Substanznummer. Blau: Polyketidteil (R<sub>1</sub>), Rot: Zentralfragment (R<sub>2</sub>), Grün: Thiofragment (R<sub>3</sub>).

		 K-R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub>		 H-R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> R <sub>3</sub>			
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub> = Ph (P)		R <sub>3</sub> = SNAC (N)			
		k	h	k	h		
 (M)	 (H)	-	-	-	MHN	120	121
		MMP	90	122	MMN	34	107
 (E)		EMP	59	123	EMN	35	108
 (Pa)		PaMP	91	124	PaMN	101	109
 (Pi)		-	-	-	PiMN	102	110
 (CP)		CPMP	92	125	CPMN	103	111
 (CH)	 (M)	CHMP	93	126	CHMN	104	112
 (PMB)		PMBMP	94	-	PMBMN	105	113
 (TBS)		TBSMP	95	127	-	-	-
 (PEG)		-	-	-	PEGMN	128	129
 (MPe)	 (D)	-	-	-	MPeMN	130	131
		-	-	-	MPeDN	132	133

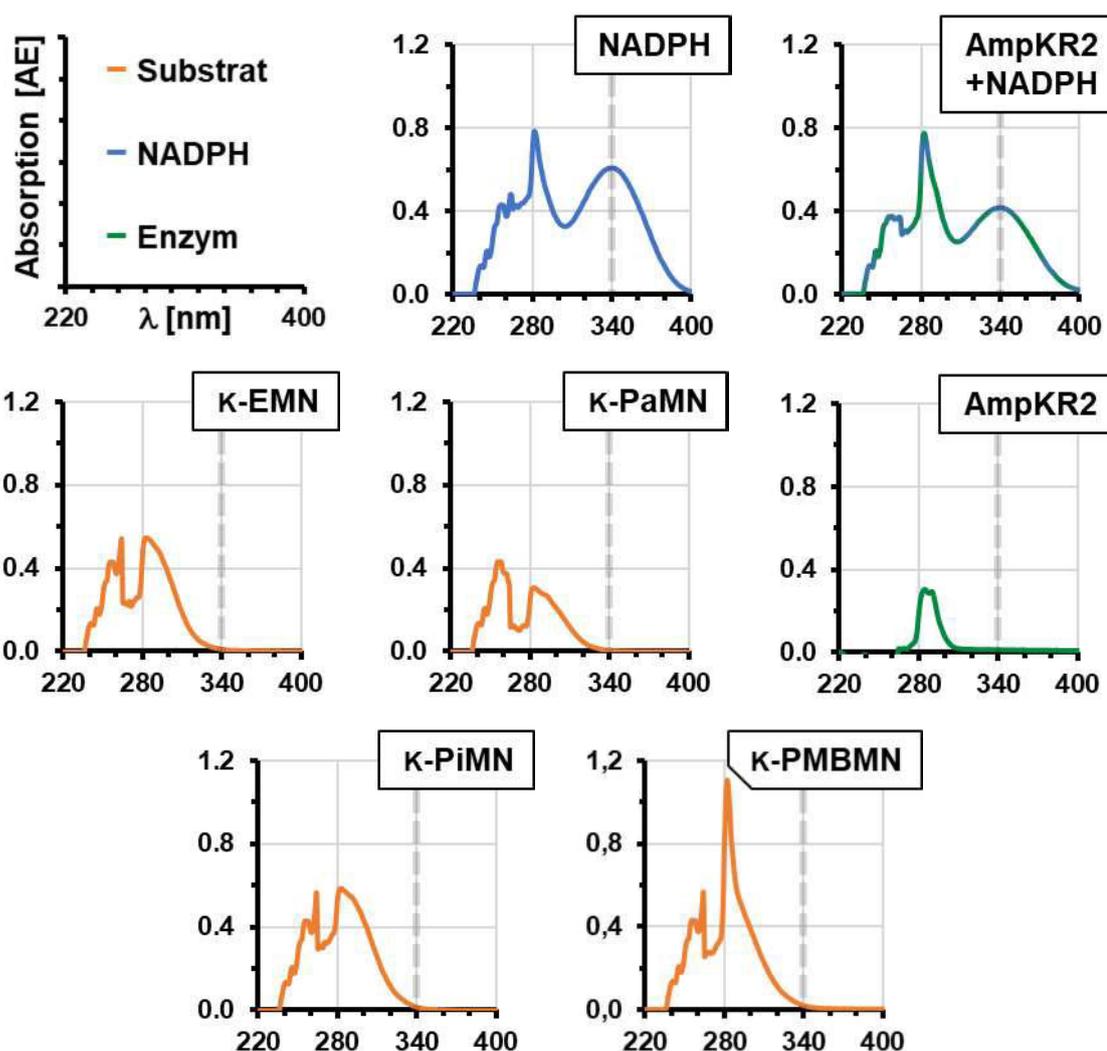
### 3.5.1 Reaktionsverfolgung mittels UV/VIS-Spektroskopie

Die Reaktionsverläufe der Enzymaktivitätstests wurden mittels UV/VIS-Spektroskopie untersucht. Die Detektion erfolgte bei  $\lambda = 340$  nm, welches der Wellenlänge eines der Absorptionsmaxima des verwendeten Kofaktor NADPH entspricht (Abbildung 3-14). Das Oxidationsprodukt NADP<sup>+</sup> besitzt bei dieser Wellenlänge keine Absorption.<sup>[143]</sup>



**Abbildung 3-14: Strukturen des Nicotinsäureadenindinukleotidphosphats.**  
Links: oxidierte Form NADP<sup>+</sup>, Rechts: reduzierte Form NADPH.

Zunächst wurde eine Auswahl von Komponenten der Enzymreaktionstests auf einen eventuellen Einfluss der Absorption insgesamt und speziell bei 340 nm hin untersucht (Abbildung 3-15). Die gewählten Substrate  $\kappa$ -EMN **35**,  $\kappa$ -PaMN **101**,  $\kappa$ -PiMN **102** und  $\kappa$ -PMBMN **105** zeigten alle ein ähnliches Absorptionsverhalten im Bereich von 230 – 340 nm mit zwei Absorptionsmaxima bei 266 nm und 282 nm. Das Alkin  $\kappa$ -PiMN zeigte keine auffälligen Absorptionsunterschiede im Vergleich zu den Substraten mit gesättigten Polyketidteilen. Die hohe Absorption bei 282 nm des  $\kappa$ -PMBMN wurde dem aromatischen System zugeschrieben, genauso wie das Absorptionsmaximum des Enzyms AmpKR2 bei derselben Wellenlänge. Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan (W), Tyrosin (Y), Phenylalanin (P) und Histidin (H) begründen die Absorptionen in diesem Bereich von 270–290 nm. Keine der untersuchten Komponenten, inklusive des verwendeten Puffers, wiesen eine Absorption bei 340 nm auf, sodass die Detektion der Absorption von NADPH bei dieser Wellenlänge für die weiteren Studien genutzt werden konnte.



**Abbildung 3-15: UV/VIS-Absorptionsspektren der untersuchten Lösungen.**

Gezeigt im Wellenlängenbereich von 220 – 400 nm von NADPH (0.3 mM), AmpKR2 (100  $\mu$ M), AmpKR2+NADPH (5  $\mu$ M und 0.3 mM) und vier  $\beta$ -Keto-SNAC-estern (5 mM). Die gestrichelte, vertikale Linie entspricht einer Wellenlänge von 340 nm. Diese Wellenlänge markiert ein lokales Absorptionsmaximum von NADPH und wurde für die Reaktionsverfolgung der Enzymaktivitätstests verwendet. Alle Spektren wurden in HEPES-Puffer (3% DMSO) aufgenommen und gegen eine Puffermessung korrigiert.

### Kalibrierung der NADPH-abhängigen UV/VIS-Spektroskopie

Die Voruntersuchungen zeigten darüber hinaus, dass die Puffer-Lösung mit NADPH und ohne Enzym in den Mikrotiterplatten keinen signifikanten und inklusive Enzym einen konkaven Meniskus besaß. Der weitergehende Vergleich von Lösungen derselben NADPH-Konzentration inklusive und exklusive Enzym offenbarte einen deutlichen Unterschied in den ermittelten Absorptionswerten und -spektren (Abbildung 3-15). Die Absorptionen der NADPH-Lösungen mit Enzym waren signifikant geringer.

Da die beiden benannten Einflüsse die Schichtdicke und den Absorptionskoeffizienten verändern, wurde die Kalibrierung ebenfalls mit TylKR1-enthaltenden NADPH-Lösungen

durchgeführt. Die Lösungen wurden entsprechend der Versuchsdurchführung der Enzymaktivitätstests über 10 min vorinkubiert. Die Messungen erfolgte in Triplikaten in einem Konzentrationsbereich von 0.00–4.05 mM NADPH in HEPES-Puffer mit 5  $\mu\text{M}$  TylKR1. Die Kalibrierung wurde einzig mit den Messwerten im linearen Bereich von 0.00–2.03 mM durchgeführt (Abbildung 3-16) und ergab die Geradengleichung:

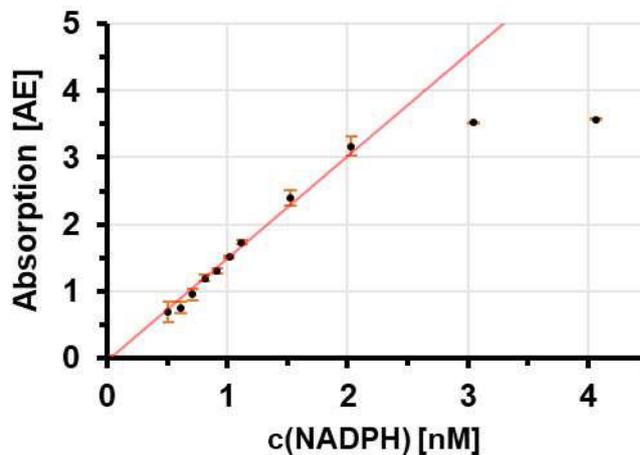
$$y (\text{Absorption}) = m (\text{Steigung}) \cdot x (c(\text{NADPH})) + n (\text{Achsenabschnitt}) \quad [1]$$

$$y (\text{Absorption}) = 1.527 \frac{\text{L}}{\text{mmol}} \cdot x (c(\text{NADPH})) - 0.032 \quad [2]$$

$$\Delta m = \pm 0.037 \frac{\text{L}}{\text{mmol}} \quad \Delta n = \pm 0.036$$

Die ermittelten Werte für die Geradensteigung ( $1.527 \pm 0.037 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1}$ ) und dem Achsenabschnitt ( $-0.032 \pm 0.036 \text{ AE}$ ) ermöglichten die Berechnung der NADPH-Konzentration aus den ermittelten Absorptionswerten während der Enzymreaktionstest.

Der berechnete Absorptionskoeffizient für NADPH in HEPES-Puffer inklusive 5  $\mu\text{M}$  Enzym beträgt  $2132 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ; der ohne Enzym  $2857 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . DAWSON *et al.* gab 1986 den Absorptionskoeffizienten von NADH und NADPH mit  $6220 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  an.<sup>[144]</sup> Die Differenz der Werte unterstreicht die Bedeutung systemspezifischer Kalibrierungen.



**Abbildung 3-16: Graphische Auswertung der Kalibrierung für die NADPH-Absorption** in HEPES-Puffer mit 5  $\mu\text{M}$  TylKR1. Die angegebene Geradengleichung [2] entspricht der roten Linie. Die Messdaten sind in Tabelle 8-3 (S. 251) aufgeführt.

### 3.5.2 Michaelis-Menten-Kinetiken

Eine Überprüfung der eigenen Messmethode und deren Kalibrierung wurde mit Studien zu Enzymkinetiken zweier KR-Domänen erstellt. Enzymkinetiken dienen der Untersuchung von Enzymreaktionen in Hinblick auf die dynamische und konzentrationsabhängige Interaktion des Enzyms mit dem Reaktionspartner bzw. Substrat. Die zeitabhängige Detektion der Konzentrationsveränderung (Produktbildungsgeschwindigkeit  $v$ ) während einer enzymatischen Reaktion bei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen einer Reaktionskomponente ( $[S]$ ) ermöglicht die Berechnung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{\max}$ ) und der MICHAELIS-MENTEN-Konstante ( $K_m$ ). Dabei steht  $v_{\max}$  für diejenige Reaktionsgeschwindigkeit, bei der alle Enzyme im Enzym-Substrat-Komplex (ES) und somit vollständig gesättigt vorliegen. Die MICHAELIS-MENTEN-Konstante ist eine Größe für die Affinität zwischen Enzym (E) und Substrat (S), die unabhängig von der Enzymkonzentration ( $[E]$ ) ist.  $K_m$  entspricht dabei der Substratkonzentration bei der halbmaximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{\max}/2$ ). Niedrige Werte weisen auf eine hohe Affinität hin.



**Formel 3-1: MICHAELIS-MENTEN-Modell [3] für ein Ein-Substrat-Enzym-System ausgehend vom nicht assoziierten Enzym (E) und Substrat (S), hin zum Enzym-Substrat-Komplex (ES), der Umwandlung des Substrats zum Produkt im Enzym-Produkt-Komplex (EP) und der Freisetzung des Produkts (P). Mit einbezogen sind alle Rückreaktionen.**

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad [4]$$

**Formel 3-2: MICHAELIS-MENTEN-Gleichung [4] mit der Produktbildungsgeschwindigkeit  $v$ , welche sich aus der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\max}$ , der MICHAELIS-MENTEN-Konstante  $K_m$  und der Substratkonzentration  $[S]$  ergibt.**

$$k_{\text{cat}} = \frac{v_{\max}}{[E]} \quad [5]$$

$$k_{\text{cat}} / K_m = \frac{k_{\text{cat}}}{K_m} \quad [6]$$

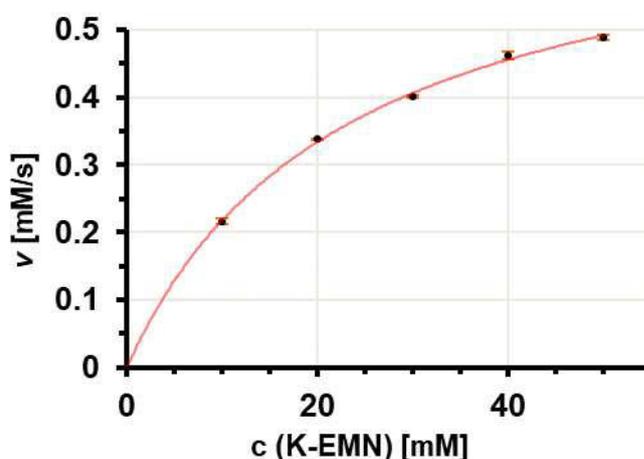
**Formel 3-3: Berechnungsformeln für die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  [5] und die katalytische Effizienz  $k_{\text{cat}}/K_m$  [6].**

Die Größen  $v_{\max}$  und  $K_m$ , sowie die daraus berechnete Reaktionsgeschwindigkeitskonstante (Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$ ) und die katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) ermöglichen einen Vergleich von enzymatischen Reaktionen unabhängig von den Bedingungen des Systems.

Die Kinetikstudien wurden mit Substratkonzentration durchgeführt, die einen Überschuss des Substrats gegenüber der Domäne sicherstellten (200:1 bis 1000:1). Die NADPH-

Konzentration war im Vergleich zur Substratkonzentration äquimolar oder im Unterschuss angelegt (1:1 bis 1:5). Bevor die zu untersuchende Reduktionsreaktion durch die Zugabe des Substrats gestartet wurde, erfolgte in allen Fällen eine Vorinkubation des Enzyms mit NADPH. Diese Vorbehandlung sollte den Einfluss der Bildungsgeschwindigkeit des Enzym-Kofaktor-Komplexes auf die ermittelte Gesamtreaktionsgeschwindigkeit minimieren und damit die Produktbildung zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt werden lassen.

Die ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen innerhalb eines Enzym-Substrat-Systems wurden in einer direkt-linearen Auftragung zusammengetragen (Abbildung 3-17) und mittels nicht-linearer Regression analysiert.



**Abbildung 3-17: MICHAELIS-MENTEN-Kinetik für die enzymatische Reduktion von  $\kappa$ -EMN durch EryKR1.** Die Messdaten sind in Tabelle 8-4 (S. 251) aufgeführt. Die mittels nicht-linearer Regression erhaltenen Daten sind in Tabelle 3-18 (S. 64) gezeigt.

Die Studien der MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken umfassten die KR-Domänen EryKR1 und TylKR1 mit jeweils drei Substraten.  $\kappa$ -EMN **35** und  $\kappa$ -PaMN **101** wurden für beide Domänen untersucht,  $\kappa$ -PMBMN **105** nur für die EryKR1 und  $\kappa$ -MMN **34** nur für die TylKR1. Beide Domänen katalysieren in der jeweiligen Naturstoff-Biosynthese die Reduktion des ACP-gebundenen  $\kappa$ -EMN-Äquivalents.

Die untersuchten Enzym-Substrat-Kombinationen zeigten mit Ausnahme einer Messung (T1 +  $\kappa$ -MMN) alle einen  $K_m$ -Wert größer 9 mM. Der höchste Wert von 36 mM wurde bei der Reduktion von  $\kappa$ -PMBMN durch EryKR1 ermittelt. Die  $K_m$ -Werte liegen bei vielen Enzymen abseits der PKS-Systeme im niedrigen einstelligen, millimolaren Bereich, oft aber deutlich darunter.<sup>[145]</sup> Der Aufbau und die Funktionsweise von PKS-Systemen erfordern

keine hohen Substrataffinitäten für die modifizierenden Domänen der reduktiven Schleife. Da das Substrat kovalent an die ACP gebunden vorliegt und diese das Substrat in die aktiven Zentren der vorhandenen KR-, DH- und ER-Domänen eines Moduls dirigiert, sind in dieser Umgebung nur wenige, konkurrierende Prozesse vorhanden. Die Einschränkung der Bewegungsfreiheitsgrade des Substrats wirkt daher den hohen  $K_m$ -Werten bzw. niedrigen Affinitäten ausgleichend entgegen. In der Konsequenz sollten KR-Domänen eine große Substrattoleranz aufweisen, da diese keine hohe Affinität zu einem spezifischen Substrat benötigen.

**Tabelle 3-18: Kennzahlen der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik für für eine Auswahl an Substraten.**

Domäne	Substrat	$K_m$ [mM]	$v_{max}$ [ $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	$k_{cat}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_m$ [ $\text{s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ]
EryKR1	$\kappa$ -EMN	22.9 $\pm$ 1.4	0.72 $\pm$ 0.02	0.143 $\pm$ 0.004	6.25 $\pm$ 0.42
	$\kappa$ -PaMN	9.34 $\pm$ 3.76	3.60 $\pm$ 2.60	0.719 $\pm$ 0.520	(77.0)*
	$\kappa$ -PMBMN	36.0 $\pm$ 13.8	0.016 $\pm$ 0.003	0.0033 $\pm$ 0.0006	0.092 $\pm$ 0.039
TylKR1	$\kappa$ -MMN	2.88 $\pm$ 0.74	1.23 $\pm$ 0.15	0.247 $\pm$ 0.030	85.7 $\pm$ 24.3
	$\kappa$ -EMN	21.3 $\pm$ 3.0	1.37 $\pm$ 0.14	0.273 $\pm$ 0.029	12.8 $\pm$ 2.2
	$\kappa$ -PaMN	9.51 $\pm$ 2.70	2.34 $\pm$ 0.48	0.468 $\pm$ 0.096	49.2 $\pm$ 17.2

EryKR1 (5  $\mu\text{M}$ ) und TylKR1 (5  $\mu\text{M}$ ). \*Der absolute Fehler übersteigt den Messwert.

Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten  $v_{max}$  wurden zunächst mit der Enzymkonzentration zu entsprechenden Umsatzraten  $k_{cat}$  verrechnet, welche den Umsatz eines einzelnen Enzymmoleküls für das gesättigte System angeben. Für alle untersuchten Enzym-Substrat-Kombinationen liegt  $k_{cat}$  unter einem reduzierten Substratmolekül pro Sekunde ( $k_{cat} = 0.14$  bis  $0.72 \text{ s}^{-1}$ ). EryKR1 ist für  $\kappa$ -PMBMN sogar nur fähig ein Molekül innerhalb von fünf Minuten umzuwandeln ( $k_{cat} = 0.0033 \text{ s}^{-1}$ ). Diese Werte sind niedrig und entsprechen den Wechselzahlen von Enzymen des Sekundärmetabolismus. Enzyme des Primärmetabolismus können deutlich höhere Umsatzraten aufzeigen, wie z. B. die Urease (*Klebsiella aerogenes*) mit 3000 Harnstoff-Molekülen pro Sekunde.<sup>[146]</sup>

Da die Bedingungen enzymatischer Reaktionen in physiologischen Umgebungen meist keine Substratsättigung bereitstellen, wurde zuletzt der Wert für die katalytische Effizienz als Quotient aus der Wechselzahl  $k_{cat}$  und der Substrataffinität  $K_m$  berechnet. Die ermittelten Werte für EryKR1 bzw. TylKR1 bei der Reaktion mit  $\kappa$ -EMN liegen bei 6.3

bzw.  $12.8 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ . Mit Ausnahme der Reduktion von  $\kappa$ -PMBMN durch EryKR1 ( $k_{cat}/K_m = 0.092 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ) besitzen alle anderen Enzym-Substrat-Kombination höhere Werte ( $k_{cat}/K_m = 49$  bis  $86 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ). Die höhere katalytische Effizienz bei Substraten mit Polyketidketten, die nicht in der Biosynthese vorkommen, sind ohne weitere Untersuchungen nur spekulativ einzuordnen. Eine mögliche Erklärung könnte eine veränderte Orientierung der Substrate innerhalb der KR-Domänen sein, welche mit einer veränderten Produktkonfiguration verbunden sein würde.

In der Gesamteinordnung der beiden mittels MICHAELIS-MENTEN-Kinetik untersuchten Domänen EryKR1 und TyIKR1 zeigte sich, dass diese im Vergleich zu anderen Enzymen wenig effizient sind (Chymotrypsin für Phenylalanin  $k_{cat}/K_m = 100\,000 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ).<sup>[145]</sup> Der Grund könnte in der bereits erwähnten Stellung der Polyketid-Biosynthese innerhalb der jeweiligen Organismen liegen.

### Reproduktion der MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken von WEISSMAN *et al.*

Die durchgeführten MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken wurde darüber hinaus genutzt, die eigenen Messverfahren und Durchführungen zu validieren. Als Basis der Validierung dienen die Kennzahlen der Enzymkinetiken von EryKR1 und TyIKR1, welche von WEISSMAN *et al.* veröffentlicht wurden und in Tabelle 3-19 (S. 65) aufgeführt sind. Neben einer Auswahl verschiedenster Ketone wurde auch  $\kappa$ -EMN als einziges  $\beta$ -Keto-SNAC-Substrat in die Untersuchungen einbezogen. Beide KR-Domänen wurden in diesen Studien als Fusionsproteine mit *N*-terminalem GST-*tag* verwendet.<sup>[59,147]</sup>

**Tabelle 3-19: Kennzahlen der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik für EryKR1 und TyIKR1 für die Reduktion von  $\kappa$ -EMN veröffentlicht von WEISSMAN *et al.*<sup>[147]</sup>**

Domäne	Substrat	$K_m$ [mM]	$k_{cat}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_m$ [ $\text{s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ]
EryKR1-GST	$\kappa$ -EMN	$35 \pm 4$	$0.26 \pm 0.01$	$7 \pm 1$
TyIKR1-GST	$\kappa$ -EMN	$13 \pm 2$	$0.61 \pm 0.04$	$47 \pm 10$

EryKR1-GST besitzt einen  $K_m$ -Wert von 35 mM, einen  $k_{cat}$ -Wert von  $0.26 \text{ s}^{-1}$  und einen Quotienten  $k_{cat}/K_m$  von  $7 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ . Die WEISSMAN-Kennzahlen sind für diese Enzym-Substrat-Kombination etwas größer als die selbst ermittelten Werten, liegen aber jeweils in derselben Größenordnung. Die Daten für TyIKR1-GST zeigen eine ähnliche Tendenz. Die

Affinität ( $K_m = 13 \text{ mM}$ ) zu  $\kappa$ -EMN ist höher als das eigenen Experiment mit TylKR1 zeigte, und auch die Werte für die Wechselzahl ( $k_{cat} = 0.61 \text{ s}^{-1}$ ) und die katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_m = 47 \text{ s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ ) waren größer. Dennoch sind auch diese Werte in der gleichen Größenordnung wie in den selbst durchgeführten Untersuchungen. Die ermittelten MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken ergaben somit vergleichbare Kennzahlen für zwei veröffentlichte Enzym-Substrat-Kombinationen. Die Unterschiede im Detail könnten auf die Variation von GST- bzw. His<sub>6</sub>-tag zurückzuführen sein.

Die Messmethode und Durchführung der eigenen Studien konnte somit durch die Validierung mit den externen Messergebnissen erfolgreich als funktional bestätigt werden.

---

## 3.6 Relative Enzymkinetiken

Relativen Enzymkinetiken eignen sich für Studien, welche die enzymatische Aktivität innerhalb eines konstanten Reaktionssystems untersuchen. Jede Veränderung der Bedingung muss separat betrachtet werden. Ein externer Vergleich wie mit den erhaltenen Daten der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik ist dabei nicht oder nur eingeschränkt möglich.

Die untersuchten Systeme besaßen konstante Startkonzentration für die KR-Domänen, die Substrate und NADPH. Das Puffersystem, äußere Bedingungen und die Durchführung waren bei allen Messungen identisch. Dies waren die nötigen Voraussetzungen für eine Auswertung der relativen Kinetiken in Hinblick auf den Einfluss der verschiedenen KR-Domänen auf die Umsetzung der untersuchten Substratbibliothek. Die enzymatische Reduktion von  $\kappa$ -EMN durch EryKR1 wurde als Bezugssystem gewählt und alle anderen Messungen zu diesem in Relation gesetzt. Der Begriff „Aktivität“ wird in diesem Kapitel synonym zur Formulierung „relative Aktivität“ verwendet.

### 3.6.1 Thiophenol-Substrate

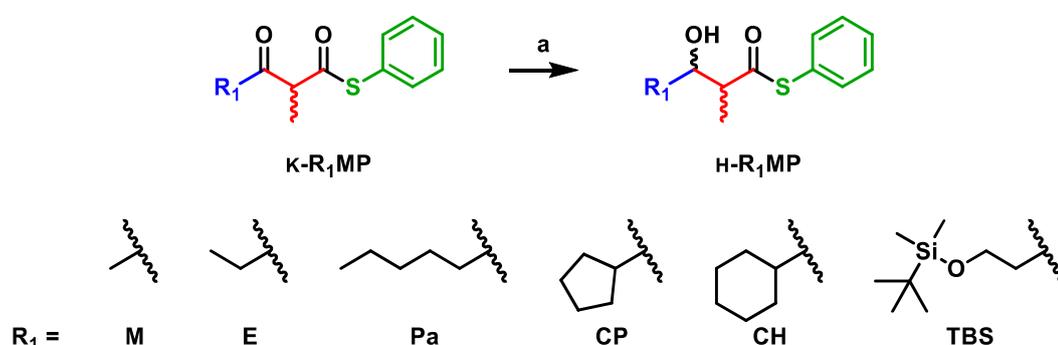
Die ersten Studien zu relativen Enzymaktivitäten erfolgten mit sechs  $\beta$ -Ketothiophenol-ester-Substraten, welche innerhalb der *klassischen* MASAMUNE-Syntheseroute erhalten wurden ( $\kappa$ -M/E/Pa/CP/CH/TBSMP, Schema 3-12, S. 68). Die Untersuchungen erfolgten mit einer Auswahl an KR-Domänen, die in ihrer Stichprobe Domänen mit natürlichen Substraten unterschiedlicher Größe umfasste. EryKR1 und TylKR1 repräsentierten Domänen mit kurzen bzw. diketidischen natürlichen Substraten. Langkettige Polyketid-Substrate mit bis zu acht zuvor erfolgten Elongationsschritten werden in den Naturstoff-Biosynthesen von EryKR6 und MycKRB umgesetzt. AmpKR2 befindet sich mit einem Substrat mit einem Hexan-Rückgrat zwischen den genannten Substratgrößen. Die ermittelten relativen Aktivitäten wie auch zuvor die MICHAELIS-MENTEN-Kinetiken bezogen sich immer auf sämtliche Stereoisomere der entstandenen  $\beta$ -Hydroxy-Produkte.

Das kleinste Substrat  $\kappa$ -MMP wurde von vier Domänen mit einer ca. 4%igen relativen Aktivität umgesetzt. EryKR1 erreichte als einzige eine Aktivität von 5.5%. Die Umsetzung von  $\kappa$ -PaMP zeigte ein ähnliches Bild mit Aktivitäten um 3.5%; außer für AmpKR2, hier

wurden 5.1% erreicht. Die für diese beiden Substrate geringe Varianz der Aktivitäten setzte sich bei den anderen Substraten nicht fort.

Das Diketid  $\kappa$ -EMP entsprach weitestgehend dem natürlichen Substrat von EryKR1 und TylKR1. Erwartungsgemäß wurde  $\kappa$ -EMP von diesen Domänen mit 6.9% bzw. 8.6% am aktivsten umgesetzt. Die Aktivitäten der anderen drei Domänen blieben unter 5%.

Die beiden cyclisch substituierten Substrate  $\kappa$ -CPMP und  $\kappa$ -CHMP wurden nur von AmpKR2 mit über 4% Aktivität umgesetzt. Obwohl  $\kappa$ -PaMP dem natürlichen Substrat strukturell näher ist, zeigte AmpKR2 bei diesen räumlich anspruchsvolleren Substraten mit 9.7% bzw. 8.9% zwei der drei höchsten gemessenen Aktivitäten für Thiophenolester-Derivate.



**Schema 3-12: Enzymatische Reduktion von  $\beta$ -Keto- $\alpha$ -methylthiophenolestern ( $\kappa$ -R<sub>1</sub>MP).**

Mit variablem Polyketidteil zu entsprechenden  $\beta$ -Hydroxythiophenolestern (H-R<sub>1</sub>MP). a) KR-Domäne, NADPH, HEPES-Puffer, 25 °C, 1 h.

Die Verteilung der im Vergleich hoher und niedriger Aktivitäten drehte sich für  $\kappa$ -TBSMP um. EryKR1 (9.0%), TylKR1 (7.3%), EryKR6 und MycKRB (jeweils 8.2%) boten unerwartet hohe Akzeptanzen für dieses nicht in der Natur vorhandene Substrat. Einzig AmpKR2 überschritt nicht die 5%-Hürde.  $\kappa$ -TBSMP ist für die aus späteren Modulen stammenden Domänen EryKR6 und MycKRB damit das am besten akzeptierte Thiophenol-Substrat. EryKR1 zeigt sogar eine höhere Aktivität als für das naturnähere  $\kappa$ -EMP.

Eine mögliche Erklärung für die besondere Akzeptanz von  $\kappa$ -TBSMP könnte eine von den anderen Thiophenol-Substraten abweichende Orientierung im aktiven Zentrum sein. Die veränderte Orientierung von kleinen Thiophenol-Substraten (u. a.  $\kappa$ -MMN) wurde bereits von LÜDEKE *et al.* beschrieben und anhand von Konfigurationsanalysen der Produkte belegt.<sup>[58]</sup>

Aufgrund der für die  $\beta$ -Ketothiophenolester-Substrate global niedrigen Aktivitäten und damit zu erwartenden geringen Produktmengen wurden keine weiterführenden Studien für diese Enzym-Substrat-Kombinationen durchzuführen. Alle weiteren Studien erfolgten mit SNAC-Estern.

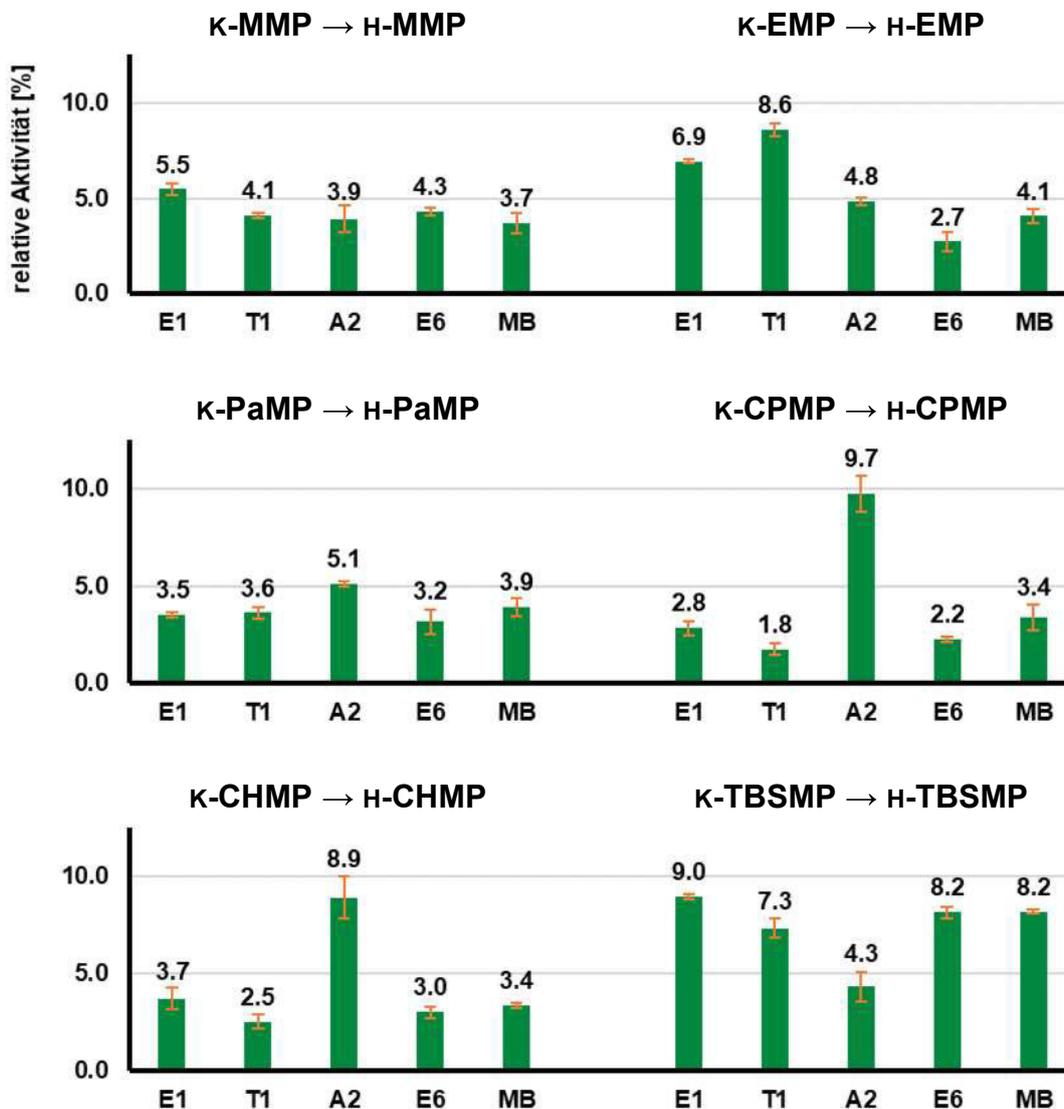
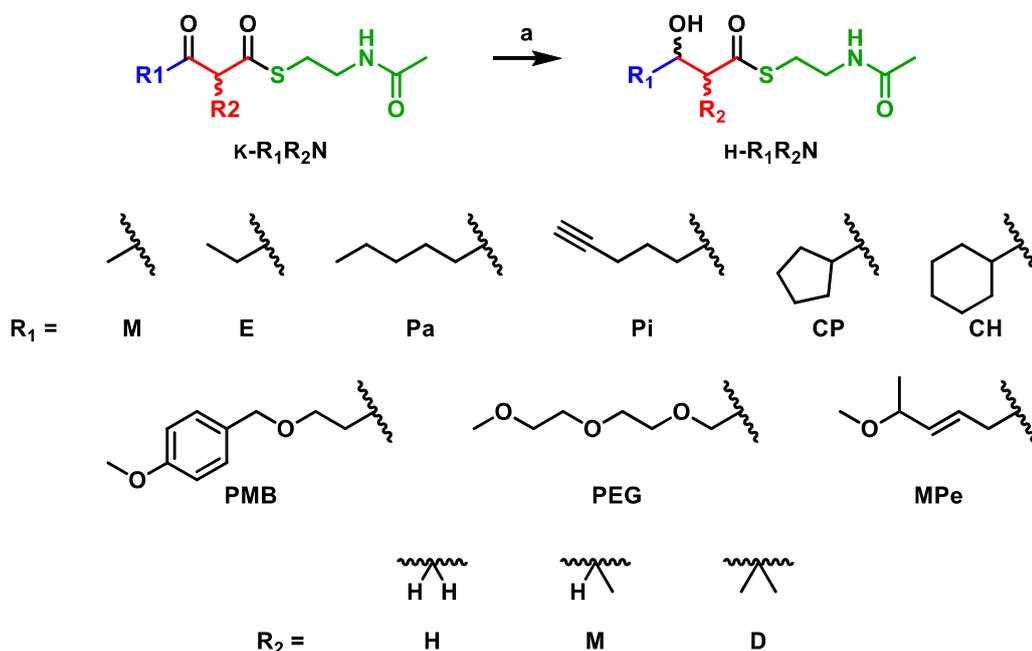


Abbildung 3-18: Relative Kinetiken für die KR-Umsetzung der  $\beta$ -Ketothiophenol-Substrate  $\kappa$ -MMP 90,  $\kappa$ -EMP 59,  $\kappa$ -PaMP 91,  $\kappa$ -CPMP 92,  $\kappa$ -CHMP 93 und  $\kappa$ -TBSMP 96 zu entsprechenden  $\beta$ -Hydroxy-Produkten. Die Angaben sind in Prozentpunkten und stehen in Relation zur Bezugsreaktion von EryKR1 (E1) mit  $\kappa$ -EMN (100%, violetter Rand, Abbildung 3-20, S. 72). Die jeweilige KR-Domäne ist unter dem Diagramm angegeben: E1 = EryKR1, T1 = TyIKR1, A2 = AmpKR2, E6 = EryKR6, MB = MycKRB.

### 3.6.2 SNAC-Substrate

Die relativen Kinetiken mit SNAC-Derivaten wurden mehrheitlich mit der gesamten Bibliothek an KR-Domänen durchgeführt. Die Auswahl enthielt zusätzlich die aus einem frühen Modul stammende AmpKR1 und die MycKRA, welche an der Modifikation langkettiger Polyketid-Intermediate beteiligt ist. Darüber hinaus wurden Derivate der EryKR1 und Ty1KR1 untersucht, die einen zweiten *His<sub>6</sub>-tag* (E1H/T1H) oder einen zusätzlichen *Pro<sub>5</sub>-tag* (E1P/T1P) am C-Terminus besaßen.

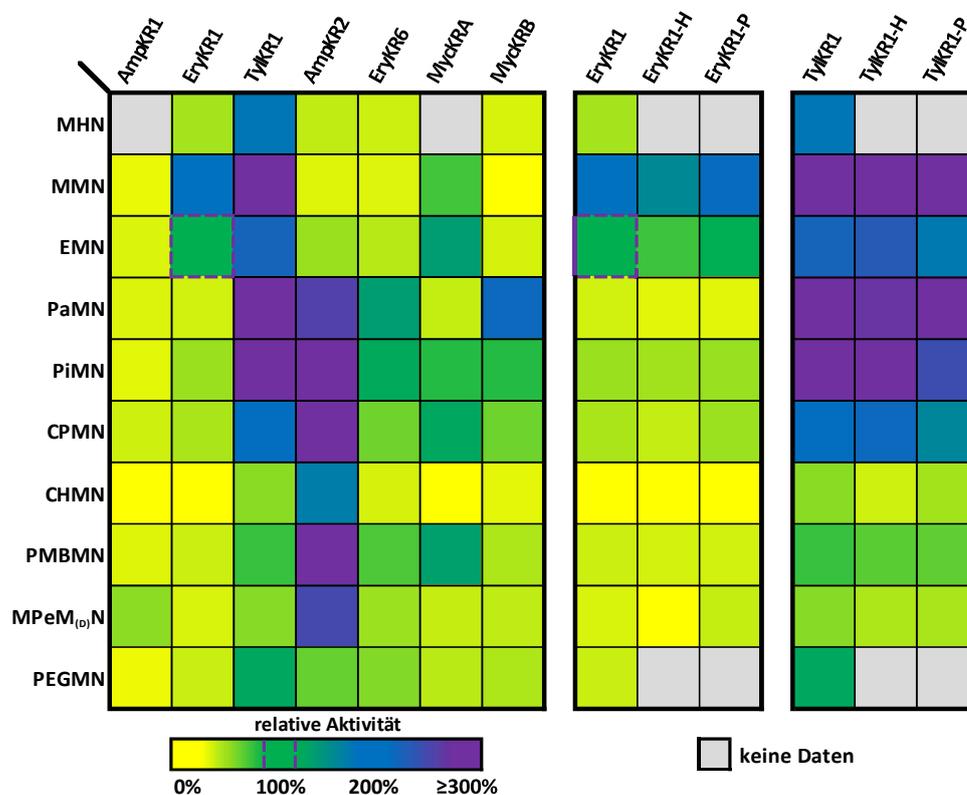


**Schema 3-13: Enzymatische Reduktion von  $\beta$ -Keto-SNAC-thioestern ( $\kappa$ -R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>N).**

Mit variablem Ketofragment und Zentralfragment zu entsprechenden  $\beta$ -Hydroxy-SNAC-thioestern (H-R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>N). a) KR-Domäne, NADPH, HEPES-Puffer, 25 °C, 24 h.

Die Reduktionen der SNAC-Substrate waren insgesamt mit höheren relativen Aktivitäten verbunden als diese bei den Thiophenol-Substraten erfasst wurden. Manche Enzym-Substrat-Kombinationen zeigten sogar Aktivitäten von über 300% mit Bezug auf die Referenzreduktion von  $\kappa$ -EMN durch EryKR1. Aufgrund des allgemein hohen Aktivitätslevels war es möglich den Umsatz mittels UPLC/MS zu bestimmen. Da NADPH für die bestmögliche photometrische Reaktionsverfolgung für die relativen Kinetiken im Unterschuss eingesetzt wurde, wurde aus methodischen Gründen in keiner Reaktion ein Substratumsatz von 100% erreicht. Dieselben Reaktionen wurden parallel in 24-stündigen Enzymreaktionen mit einem Überschuss an NADPH durchgeführt und ebenfalls mittels UPLC/MS analysiert. Die ermittelten Diastereomerenverhältnisse der Reduktion im Unter-

und im Überschuss zeigten keine signifikanten Unterschiede und sind daher für die Studien der relativen Kinetiken nicht aufgeführt. Die Ergebnisse der 24-stündigen Studien mit Umsätzen, Diastereomeren- und der Enantiomerenverhältnissen sind in Kapitel 3.7 (S. 85) gezeigt und diskutiert.



**Abbildung 3-19: Relativen Aktivitäten von Enzym-Substrat-Kombinationen mit SNAC-Thioester-Substraten.** Die Angaben stehen in Relation zur Bezugsreaktion von EryKR1 mit  $\kappa$ -EMN (100%, violett gepunkteter Rahmen). Die jeweilige KR-Domäne ist über dem Diagramm angegeben. H = C-terminaler His<sub>6</sub>-tag, P = C-terminaler Pro<sub>5</sub>-tag. Die zugrundeliegenden Messwerte befinden sich Abbildung 3-20 (S. 72), Abbildung 3-21 (S. 74), Abbildung 3-23 (S. 78) und Abbildung 3-24 (S. 81) aufgeführt.

### SNAC-Substrate mit kurzen Dicarboxyl-Fragmenten

Die drei kurzkettigen Substrate waren  $\kappa$ -MHN **120**,  $\kappa$ -MMN **34** und  $\kappa$ -EMN **35**, deren relative Aktivitäten und Strukturen in Abbildung 3-20 (S. 72) dargestellt sind.  $\kappa$ -MHN war das einzige getestete Substrat, das keine  $\alpha$ -Methylierung und daher den kleinsten Dicarboxyl-Körper (C<sub>4</sub>) besaß. Das äquivalente, ACP-gebundene Substrat findet sich in nur wenigen PKS-Systemen, wie z. B. in der Mycolacton-Biosynthese. Die  $\alpha$ -methylierte Variante  $\kappa$ -MMN spiegelte ein Substrat z. B. aus der Amphotericin- oder Pederin-Biosynthese wieder.  $\kappa$ -EMN war um eine Methylengruppe verlängert und wird beispielsweise während der PKS-Synthese von Erythromycin oder Tylosin prozessiert.

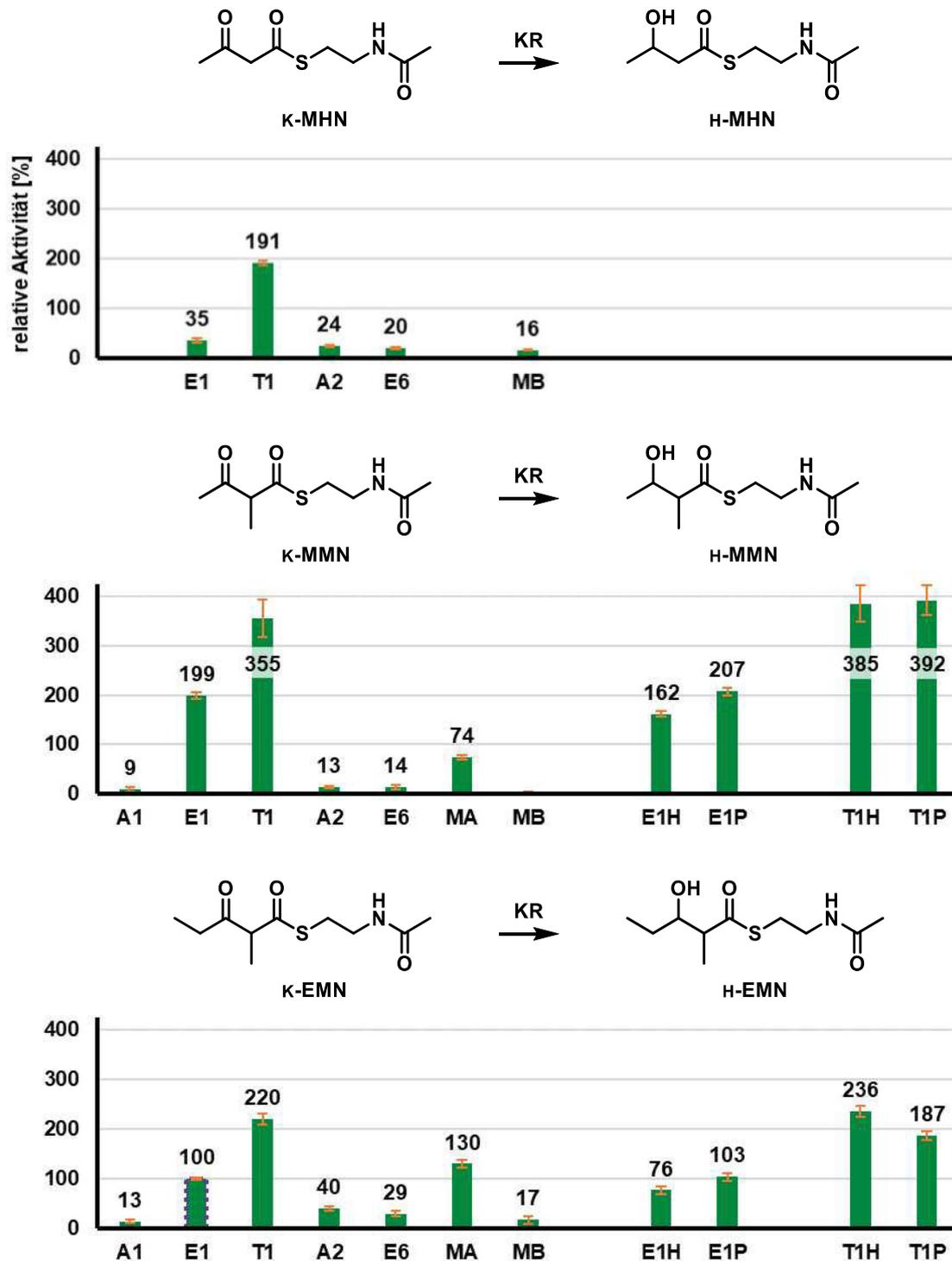


Abbildung 3-20: Relative Kinetiken für die KR-Umsetzung der  $\beta$ -Keto-SNAC-Substrate  $\kappa$ -MHN 120,  $\kappa$ -MMN 34 und  $\kappa$ -EMN 35 zu entsprechenden  $\beta$ -Hydroxy-Verbindungen.

Die Angaben sind in Prozentpunkten und stehen in Relation zur Bezugsreaktion von EryKR1 (E1) mit  $\kappa$ -EMN (100%, violett gepunkteter Rahmen). Die jeweilige KR-Domäne ist unter dem Diagramm angegeben: A1 = AmpKR1, E1 = EryKR1, T1 = TylKR1, A2 = AmpKR2, E6 = EryKR6, MA = MycKRA, MB = MycKRB, H = C-terminaler His<sub>6</sub>-tag, P = C-terminaler Pro<sub>5</sub>-tag.

---

Wie zuvor erwähnt, stellte die Reduktion von  $\kappa$ -EMN durch EryKR1 die Referenzreaktion (100%) der relativen Kinetiken dar. Alle weiteren Aktivitäten wurden zu dieser in Bezug gesetzt. Die Aktivität mit  $\kappa$ -MMN war trotz kürzerer C<sub>4</sub>-Kette doppelt so hoch (199%), wohingegen das unmethylierte  $\kappa$ -MHN nur 35% Aktivität erreichte. EryKR1 besitzt demnach eine Bevorzugung von  $\alpha$ -methylierten Substraten. TylKR1 zeigte bei allen Substraten höhere Aktivitäten ( $\kappa$ -MHN: 191%;  $\kappa$ -MMN: 355%,  $\kappa$ -EMN: 220%) als EryKR1. Auch hier war die Aktivität mit dem kürzesten methylierten Substrat am höchsten. TylKR1 zeigt aber keine Bevorzugung methylierter Substrate wie EryKR1.

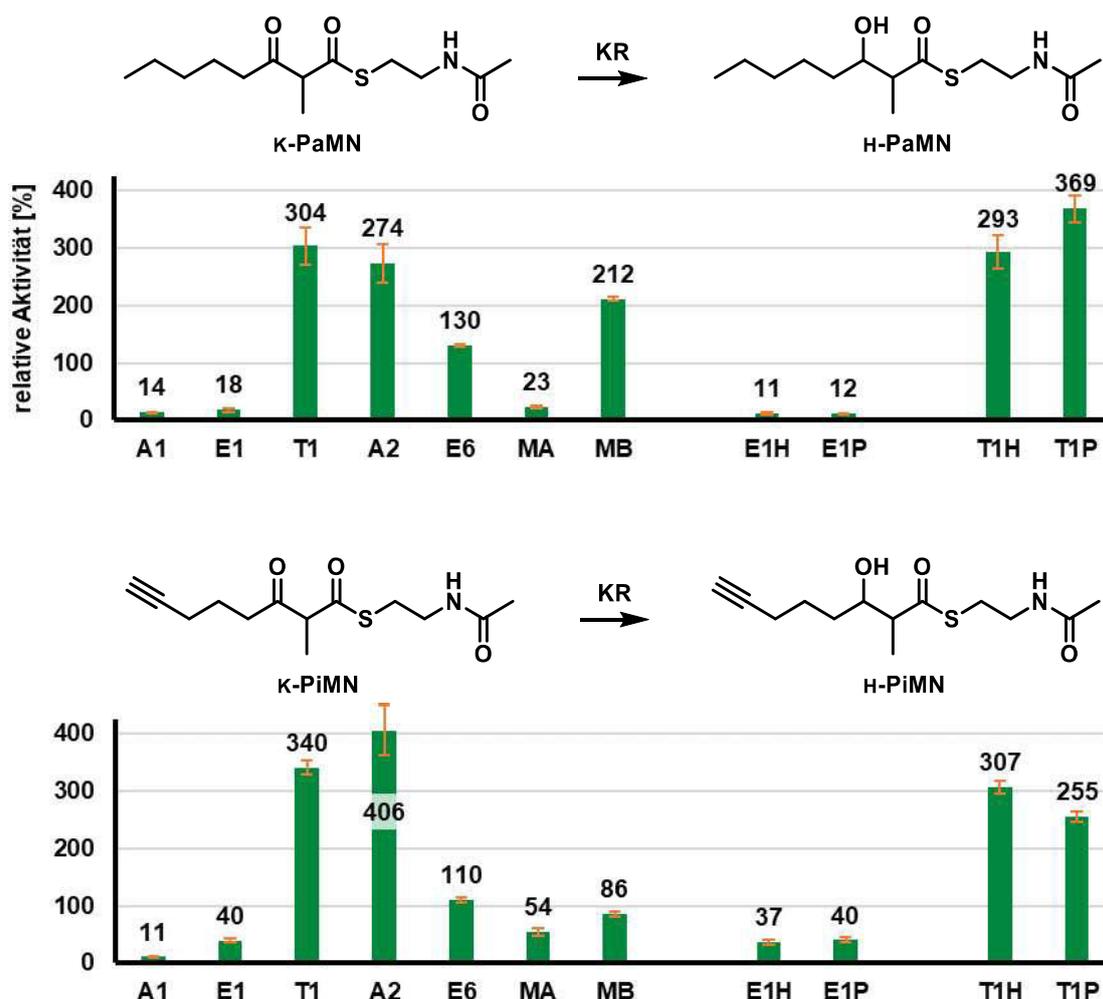
Die Aktivitäten der anderen KR-Domänen waren auf einem insgesamt niedrigen Niveau, sodass eine Präferenz zu  $\alpha$ -methylierten Substraten nicht zuzuordnen war. Einzig MycKRA und AmpKR2 zeigten bei den kurzkettigen Substraten Aktivitäten von über 30%. Die MycKRA war mit 74% bei  $\kappa$ -MMN und 130% bei  $\kappa$ -EMN aktiver als die AmpKR2 für  $\kappa$ -EMN mit 40%.

MycKRB und AmpKR1 zeigten bei  $\kappa$ -MHN,  $\kappa$ -MMN und  $\kappa$ -EMN Aktivitäten von unter 20%, obwohl beide Domänen ihr natürliches Substrat-Äquivalent in dieser Gruppe besitzen (MB:  $\kappa$ -MH-ACP; A1:  $\kappa$ -MM-ACP). MycKRB besitzt allerdings die Besonderheit, dass diese innerhalb der Mycolacton-Biosynthese in mehreren Modulen vorhanden und aktiv ist. Diese Domäne scheint daher vor der Duplizierung an länger-kettige Polyketid-Intermediate angepasst gewesen zu sein, welches sich in weiteren Untersuchungen zeigte (Abbildung 3-21, S. 74).<sup>[60]</sup> Dementgegen liegen die Gründe der niedrigen Aktivitäten bei AmpKR1 vermutlich in der unvollständigen oder inkorrekten Rückfaltung, da in anderen Studien AmpKR1 bereits erfolgreich mit hoher Aktivität verwendet wurde.<sup>[57]</sup>

### **SNAC-Substrate mit linearen C<sub>9</sub>-Dicarbonyl-Fragmenten**

Die Substrate  $\kappa$ -PaMN **101** und  $\kappa$ -PiMN **102** repräsentieren Derivate von tetraketidischen Polyketid-Intermediaten, die im vorliegenden Modifikationsgrad nicht in den Biosynthesen der untersuchten 32 Naturstoffe zu finden sind. Dies liegt am vollständig reduzierten Ketofragment des  $\kappa$ -PaMN und der in PKS-Naturstoffen nicht zu findenden, endständigen Dreifachbindung des  $\kappa$ -PiMN. Intermediate mit tetraketidischem Aufbau

existieren allerdings in allen Polyketid-Biosynthesen, die mindestens drei Elongations-schritte umfassen. Allerdings ist in allen untersuchten Polyketid-Naturstoffe auf dieser Stufe der Biosynthese bereits mindestens eine verbleibende Hydroxygruppe. Die Struk-turen von  $\kappa$ -PaMN und  $\kappa$ -PiMN und die relativen Aktivitäten der enzymatischen Reduk-tionen sind in Abbildung 3-21 (S. 74) dargestellt.



**Abbildung 3-21: Relative Kinetiken für die KR-Umsetzung der  $\beta$ -Keto-SNAC-Substrate  $\kappa$ -PaMN 101 und  $\kappa$ -PiMN 102 zu entsprechenden  $\beta$ -Hydroxy-Verbindungen.**

Die Angaben sind in Prozentpunkten und stehen in Relation zur Bezugsreaktion von EryKR1 (E1) mit  $\kappa$ -EMN (100%, violett gepunkteter Rahmen, Abbildung 3-20, S. 72). Die jeweilige KR-Domäne ist unter dem Diagramm angegeben: A1 = AmpKR1, E1 = EryKR1, T1 = TyIKR1, A2 = AmpKR2, E6 = EryKR6, MA = MycKRA, MB = MycKRB, H = C-terminaler His<sub>6</sub>-tag, P = C-terminaler Pros-tag.

Der niedrige Hydroxylierungsgrad und die damit verbundene niedrige Polarität von  $\kappa$ -PaMN und  $\kappa$ -PiMN könnten ausschlaggebend für die niedrigen Aktivitäten (23% bzw. 54%) der MycKRA sein, da das triketidische Intermediat der Biosynthese  $\delta$ -hydroxyliert vorliegt (Kapitel 0, S. 97). Die Länge der beiden Tetraketide dürfte auch die niedrigen

---

Umsatzraten der frühmoduligen KR-Domänen AmpKR1 ( $\kappa$ -PaMN: 14%;  $\kappa$ -PiMN: 11%) und der EryKR1 ( $\kappa$ -PaMN: 18%;  $\kappa$ -PiMN: 40%) bewirkt haben.

Die ebenfalls mit kurzen Intermediaten agierenden Domänen TylKR1 (Diketid) und AmpKR2 (Triketid) zeigten für beide Substrate sehr hohe Aktivitäten von über 250%. Die TylKR1 erreichte für  $\kappa$ -PaMN eine Aktivität von 304% und für  $\kappa$ -PiMN 340%. Die Umsetzungen der TylKR1 besitzen damit insgesamt stabile Aktivitäten auf hohem Niveau (191% bis 355%) für Substrate kurzer und mittlerer Länge. AmpKR2 zeigte Aktivitäten von 274% für  $\kappa$ -PaMN und 406% für  $\kappa$ -PiMN und offenbarte im Gegensatz zur TylKR1 eine scharfe Trennung zwischen den kurzkettigen Substraten mit niedrigen Aktivitäten (13% bis 40%) und den etwas längeren Substraten mit hohen Aktivitäten (über 270%). Dieses Ergebnis legt nahe, dass es mehrere Ebenen der Substraterkennung in KR-Domänen gibt, die je nach Domäne unterschiedlich stark ausgeprägt sind. Die Diskriminierung erfolgte in den bisherigen Interaktionsstudien aufgrund der Länge des Substrats und der Polarität des Polyketidfragments. EryKR6 und MycKRB zeigten ein der AmpKR2 vergleichbares Verhalten, aber mit einer niedrigeren Amplitude zwischen kurz- und langkettigen Substraten (E6: ca. 20% zu ca. 120%; MB: ca. 10% zu i.D. 150%). Die Tetraketide  $\kappa$ -PaMN und  $\kappa$ -PiMN scheinen für diese drei Domänen aufgrund der größeren Interaktionsoberfläche einen besseren Zugang zum aktiven Zentrums zu haben.

Eine mögliche Erklärung besteht in der Annahme einer kollabierten, aktiven Tasche in den Domänen bei Abwesenheit der Substratmoleküle. Eine Konformationsänderung zur Freigabe des aktiven Zentrums würde dann eventuell erst bei einem Substrat entsprechender Größe erfolgen. Mit Bezug auf das gleichbleibend hohe Aktivitätsniveaus müsste bei TylKR1 demnach eine stabilere, geöffnete Konformation des aktiven Zentrums vorliegen.

Der Sättigungsgrad von  $\kappa$ -PaMN und  $\kappa$ -PiMN zwischen den Positionen C7 und C8 hatte einen uneinheitlichen Einfluss auf die Aktivitäten der Domänen. Dies dürfte mit der rigideren Struktur der Dreifachbindung zusammenhängen, da sich die beiden C-C-Bindungen an C7 in einem fixierten Winkel von 180° befinden. Dementgegen liegt in  $\kappa$ -PaMN an der C7-Position ein 120° Winkel zwischen den frei drehbaren Bindungen vor, wodurch die Methylgruppe flexibler in der räumlichen Ausrichtung ist.

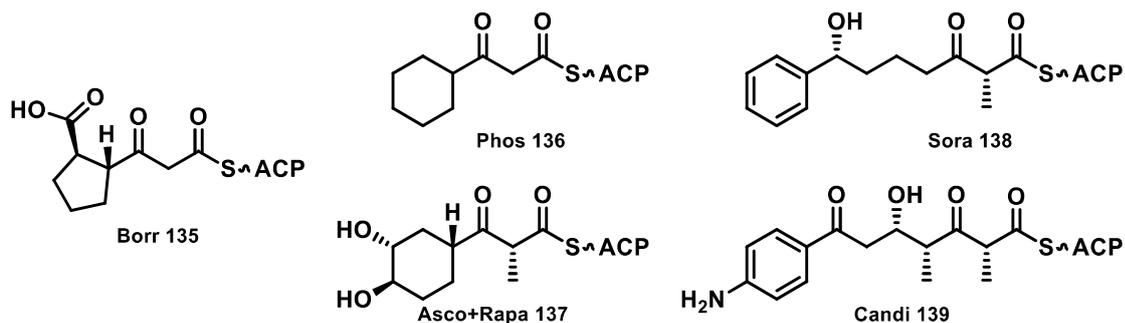
TylKR1 und AmpKR2 steigerten ihre Aktivitäten um 36 bzw. 132 Prozentpunkte vom Alkan zum Alkin. Im geringeren Umfang zeigten auch EryKR1 und MycKRA dieselbe Tendenz. MycKRB und EryKR6 verringerten hingegen ihre Aktivitäten in Anwesenheit der Dreifachbindung (-126 bzw. -20 Prozentpunkte). Die theoretische Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum und damit der KR-Typ besaß keinen Einfluss. Die zusätzliche oder fehlende Interaktion mit einer spezifischen Aminosäureseitenkette im Umkreis von ca. 7.3 Å (Länge des Alkin-Ketofragments) konnte die beobachtete Aktivitätsveränderungen daher nicht erklären. Die einzige Basis der divergenten Tendenzen lag in der Unterscheidung von Domänen aus frühen Modulen (E1, T1, A2, MA) und solchen aus späteren Modulen (E6, MB).

Das TylKR1-H-Derivat mit zweitem His<sub>6</sub>-tag wies eine ähnliche Aktivitätsverschiebung wie das einfach getaggte TylKR1 auf. TylKR1-P zeigte allerdings eine entgegengesetzte Auswirkung und verhielt sich wie EryKR6 und MycKRB. EryKR1-H und -P im Vergleich zu EryKR1 bildeten keinen tag-Effekt ab.

Der wechselhafte Einfluss der tags unterstreicht die besondere Individualität jeder KR-Domäne. Trotz des gemeinsamen Ursprungs scheinen sich die untersuchten Domänen vielschichtig und individuell in den jeweiligen Biosynthesen mit Hinblick auf die Zielstrukturen angepasst zu haben. Gleichzeitig stellt dies die lineare Übertragbarkeit der Schlussfolgerungen von Studien mit rekombinanten Domänen auf PKS-integrierte Domänen in Frage. LEADLAY *et al.* konnten diese herausfordernde Situation in vergleichenden Studien von mutierten, rekombinanten zu mutierten, integrierten KR-Domänen bereits aufzeigen (Kaptitel 1.2, Schema 1-8, S. 11).<sup>[63]</sup>

#### **SNAC-Substrate mit cyclischen Substituenten**

Die drei SNAC-Ester  $\kappa$ -CPMN **103**,  $\kappa$ -CHMN **104** und  $\kappa$ -PMBMN **105** mit cyclischem Substituenten bildeten die nächste Kategorie an untersuchten Substratanaloga (Abbildung 3-23, S. 78). Die Mehrzahl der PKS-Naturstoffe mit cyclischen Strukturen enthalten Furan- oder Pyranstrukturen, die während oder nach den Prozessierungsschritten aufgebaut werden. Die Position dieser Heterocyclen hängt von der Biosynthese des Naturstoffs ab und kann zu Beginn, mittig oder am Ende der Polyketidkette liegen.<sup>[148]</sup>



**Abbildung 3-22: ACP-gebundene, di- und tetraketidische Intermediate verschiedener PKS-Systeme.**  
 Für Borrelidin (**175**) (Modul 1: **135**), Phoslactomycin (**194**) (Modul 1: **136**), Ascomycin (**174**) und Rapamycin (**192**) (je Modul 1: **137**), Soraphen A (**193**) (Modul 3: **138**) und Candicin D (**42**) (hypothetisches Modul 3: **139**) vor der Reduktion durch die KR-Domäne des jeweiligen Moduls.<sup>[28,29,74,75,88,89,149]</sup>

Cycloalkane oder benzyliche Strukturen finden sich in nur wenigen Polyketid-Naturstoffen aus PKS-Systemen des Typs I wieder. Eingeführt werden diese in der Biosynthese zumeist in den Startmodulen als entsprechende CoA-Bausteine. Den Substraten  $\kappa$ -CPMN,  $\kappa$ -CHMN und  $\kappa$ -PMBMN gleichende ACP-gebundene Strukturen finden sich beispielsweise in den ersten Elongationsmodulen der PKS-Systemen von Borrelidin, Phoslactomycin, Phoslactomycin, Ascomycin und Rapamycin sowie im dritten PKS-Modul von Soraphen A bzw. Candicin D. Die zugehörigen Strukturen der Di- bzw. Tetraketide sind in **Abbildung 3-22** gezeigt.<sup>[28,29,74,75,88,89,149]</sup>

Die cyclische Struktur von  $\kappa$ -CPMN und  $\kappa$ -CHMN befinden sich in direkter Nachbarschaft zum  $\beta$ -Keton. Die zusätzliche Methylengruppe der Cyclohexylgruppe vergrößert den Umfang der cyclischen Struktur um ca. 1.5 Å, wodurch die Cyclohexylgruppe ein größeres Raumvolumen als die Cyclopentylgruppe besitzt. Beide Strukturen können zwischen verschiedenen Konformationen wechseln. Die aromatische Benzylgruppe des  $\kappa$ -PMBMN ist im Gegensatz dazu planar, konformationsstabil und kann  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen eingehen. Sterisch anspruchsvolle Reste der gesättigten, cyclischen Strukturen können in den Naturstoffen allerdings auch diese in einer Konformation verstärkt fixieren. Die Strukturen von  $\kappa$ -CPMN,  $\kappa$ -CHMN und  $\kappa$ -PMBMN und die relativen Aktivitäten der KR-Umsetzungen sind in **Abbildung 3-23** (S. 78) dargestellt.

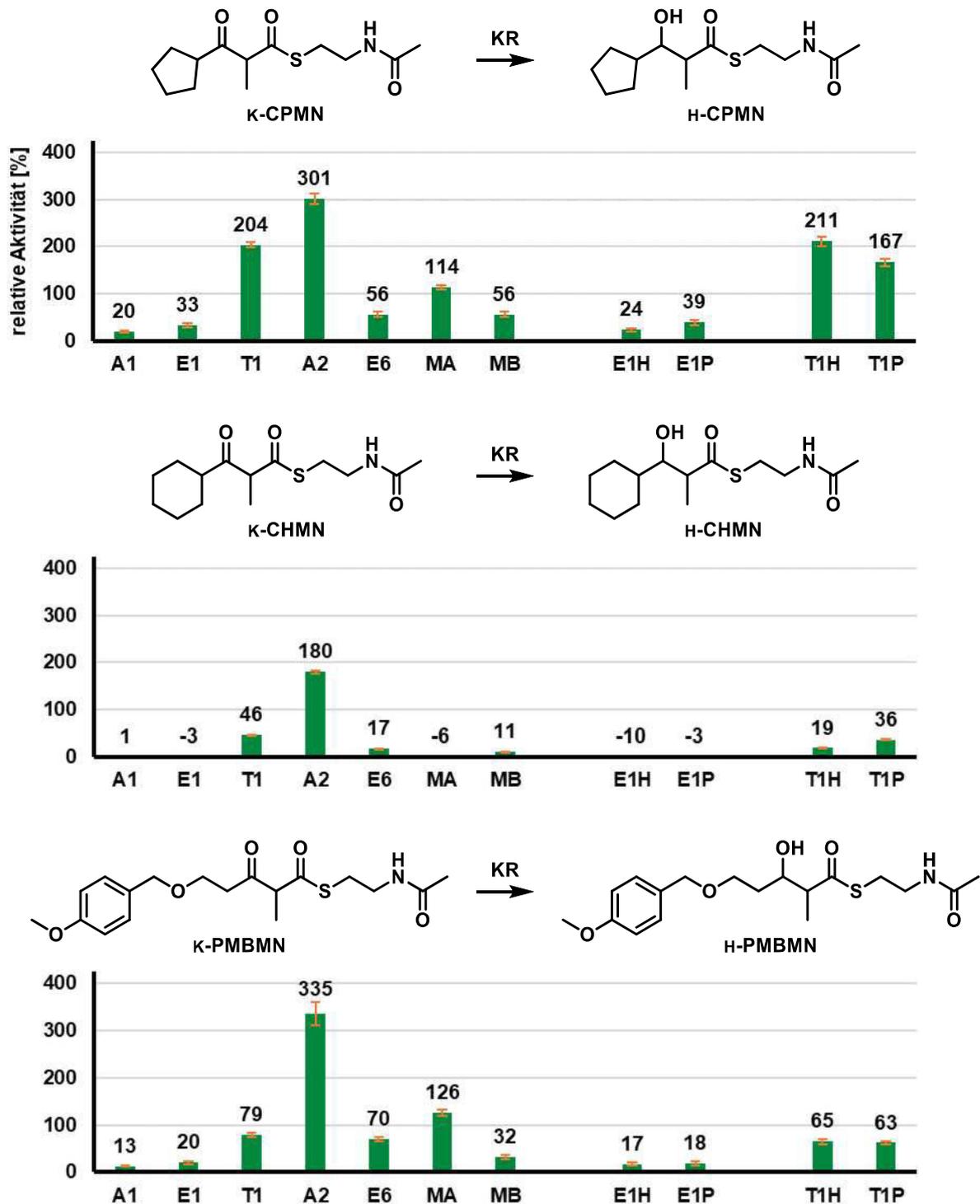


Abbildung 3-23: Relative Kinetiken für die KR-Umsetzung der  $\beta$ -Keto-SNAC-Substrate  $\kappa$ -CPMN 103,  $\kappa$ -CHMN 104 und  $\kappa$ -PMBMN 105 zu entsprechenden  $\beta$ -Hydroxy-Verbindungen.

Die Angaben sind in Prozentpunkten und stehen in Relation zur Bezugsreaktion von EryKR1 (E1) mit  $\kappa$ -EMN (100%, violett gepunkteter Rahmen, Abbildung 3-20, S. 72). Die jeweilige KR-Domäne ist unter dem Diagramm angegeben: A1 = AmpKR1, E1 = EryKR1, T1 = TylKR1, A2 = AmpKR2, E6 = EryKR6, MA = MycKRA, MB = MycKRB, H = C-terminaler His<sub>6</sub>-tag, P = C-terminaler Pro<sub>5</sub>-tag.

---

Den höchsten Aktivitätswert für  $\kappa$ -CPMN zeigte AmpKR2 mit 301%, gefolgt von TylKR1 mit 204%. MycKRA wies eine Aktivität von 114% auf; MycKRB sowie EryKR6 jeweils einen Wert von 56%. Die Aktivitäten von AmpKR1 und EryKR1 lagen unter 40%.

Der Einfluss der größeren, cyclischen Struktur des  $\kappa$ -CHMN bewirkte einen globalen Einbruch der Aktivitäten. Nur TylKR1 (46%) und AmpKR2 (180%) überstiegen 40%. Bei EryKR1 (E1/E1P: -3%; E1H: -10%) und MycKRA (-6%) wurden negative Aktivitätswerte erhalten, was auf eine langsamere Oxidation von NADPH in Anwesenheit von  $\kappa$ -CHMN als in Abwesenheit hinweist.  $\kappa$ -CHMN scheint daher zumindest innerhalb der Domänen EryKR1 und MycKRA eine bevorzugte Orientierung einzunehmen, die die Interaktionen der Nikotinsäuregruppe und die Reduktion von Molekülen durch diese unterbindet. Entsprechende 24 h-Studien (Kapitel 3.7, S. 85) zeigten nichtsdestotrotz eine Umsetzung von  $\kappa$ -CHMN, sodass auch die Existenz einer reduktionsfähigen Orientierung von  $\kappa$ -CHMN nachgewiesen werden konnte. ELBER *et al.* untersuchten in *in silico*-Studien bereits die Orientierung von  $\kappa$ -EMN innerhalb von AmpKR1 und die daraus resultierenden Einflüsse auf die Reduktion des Substrats.<sup>[150]</sup> Es konnten gezeigt werden, dass die energetisch bevorzugte Konformation von  $\kappa$ -EMN im aktiven Zentrum der rekombinanten KR nicht reduktionsfähig ist. Die energetischen Hürden hin zur reduktionsfähigen Konformation von  $\kappa$ -EMN sind allerdings niedrig.  $\kappa$ -CHMN scheint mit der Cyclohexylgruppe das Konformationsgleichgewicht hin zur nicht reduktionsfähigen Form verschoben zu haben. Ein Bezug zu PKS-KR-inhibierenden Strukturen konnte nicht hergestellt werden, da keine Inhibitoren für dieses System bekannt sind.

Den einzigen aromatischen Substituenten unter den Substraten wies  $\kappa$ -PMBMN **105** auf. Der aromatische Ring der *para*-Methoxybenzylgruppe befand sich allerdings in größerem Abstand zum  $\beta$ -Keton als die cyclischen Strukturen von  $\kappa$ -CPMN und  $\kappa$ -CHMN ( $\kappa$ -CHMN: ca. 1.5 Å;  $\kappa$ -PMBMN: ca. 7.4 Å). AmpKR1, EryKR1 und MycKRB zeigten auch mit diesem Substrat keine Aktivitäten über 40%. Die aktivste Domäne war erneut AmpKR2 mit 335%. Zwischen diesen Grenzen befanden sich die relativen Aktivitätswerte von TylKR1 (79%), EryKR6 (70%) und MycKRA (114%).

Der Aktivitätsverlust von TylKR1 von  $\kappa$ -CPMN (204%) zu  $\kappa$ -PMBMN (79%) zeigte, dass diese KR-Domäne in ihrer Interaktion in der näheren Umgebung des aktiven Zentrums bis ca. 3 Å flexibel ist. Gleichzeitig diskriminiert TylKR1 anscheinend sterisch anspruchsvolle Substratstrukturen in der Peripherie des aktiven Zentrums ab ca. 7 Å Entfernung.

AmpKR2 unterschied nicht nach diesem Prinzip und auch nicht nach der Flexibilität der Position des Polyketidfragments direkt neben dem zu reduzierenden Keton. Sowohl  $\kappa$ -CPMN (301%) und  $\kappa$ -CHMN (180%) mit dem tertiären Kohlenstoff in direkter Nachbarschaft als auch die an dieser Position lineare Struktur des  $\kappa$ -PMBMN (335%) zeigten Aktivitätswerte, die in der selben Größenordnung wie für  $\kappa$ -PaMN (274%) und  $\kappa$ -PiMN (406%) lagen.

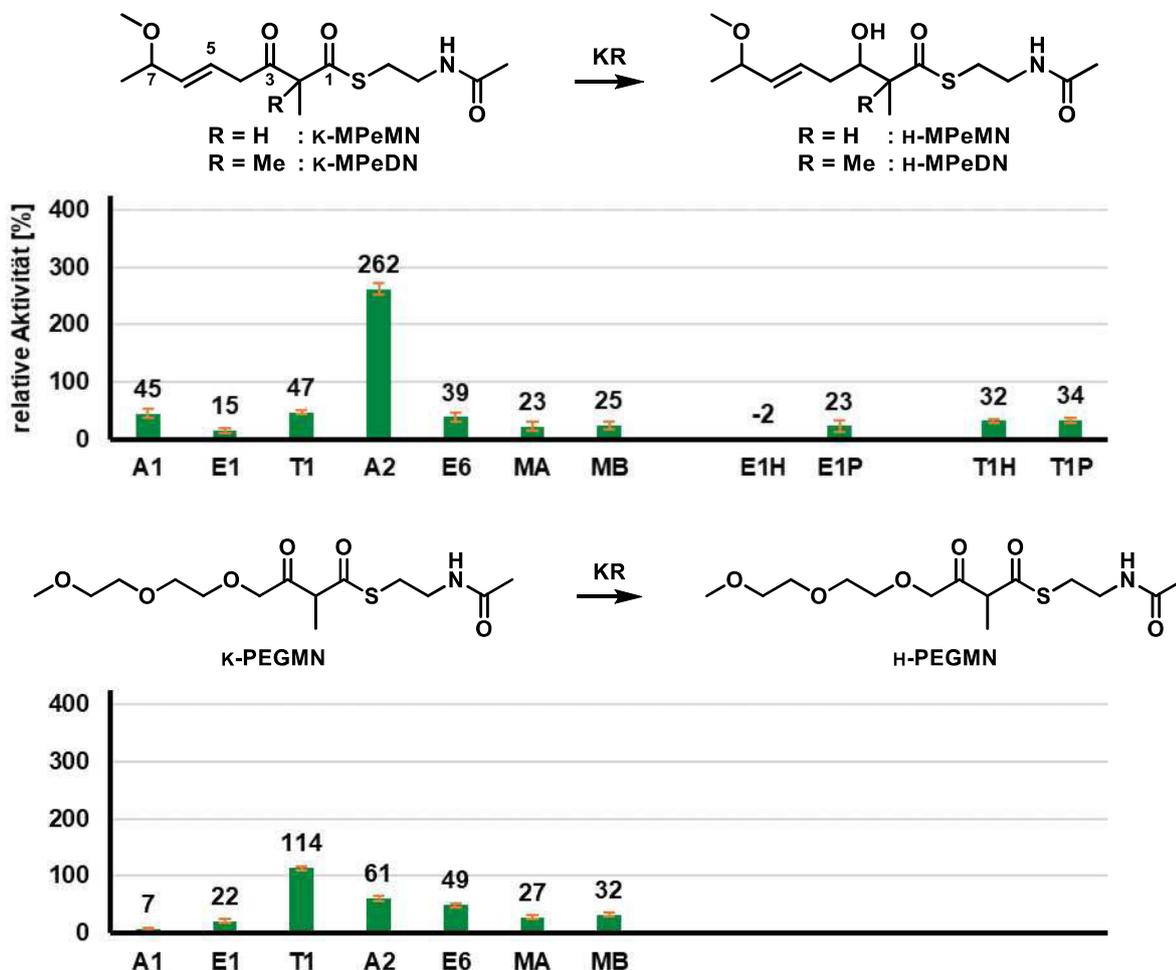
#### **Weitere SNAC-Substrate**

Zwei weitere SNAC-Ester wurden in die Studien zu den relativen Aktivitäten der KR-Domänen mit einbezogen: das einer modifizierten Polyketidkette nachempfundene Tetraketid  $\kappa$ -MPeMN **130** und das Polyethylenglykol-Substrat  $\kappa$ -PEGMN **128**. (Abbildung 3-24, S. 81). Beide Substrate wurden im Rahmen der Masterarbeit von T. ROß synthetisiert und bereitgestellt.<sup>[110]</sup> Die Ergebnisse der Bestimmung der relativen Aktivitäten sind ebenfalls in Abbildung 3-24 dargestellt.

Die Studien zu  $\kappa$ -MPeMN wurden mit einem Stoffgemisch aus  $\kappa$ -MPeMN und  $\kappa$ -MPeDN (5:2) durchgeführt, da sich mono- und dimethyliertes Derivat nicht chromatographisch trennen ließen.  $\kappa$ -MPeDN verhielt sich bei den enzymatischen Reduktionen inert, wie sich später in den Analysen mittels UPLC/MS zeigte (Kapitel 3.7.8, S. 101). Der Einfluss von  $\kappa$ -MPeDN auf die Umsetzung von  $\kappa$ -MPeMN ist nicht bekannt. Eine Bindungskonkurrenz beider Substanzen in den aktiven Zentren ist allerdings zu erwarten, sodass die relative Aktivität für die Reinsubstanz  $\kappa$ -MPeMN höher ausfallen müsste.

Einzig AmpKR2 zeigte einen hohen Aktivitätswert für das Gemisch von 262%. AmpKR1 und TylKR1 wiesen Werte von 45% bzw. 47% auf. Alle weiteren KR-Domänen erreichten keine Aktivitäten über 40%. AmpKR2 blieb damit bei diesem Gemisch von modifizierten Tetraketiden auf einem beständigen Aktivitätslevel, wie bei den linearen Substraten  $\kappa$ -PaMN (274%) und  $\kappa$ -PiMN (406%) sowie den Substraten mit cyclischen Substituenten

$\kappa$ -CPMN (301%) und  $\kappa$ -PMBMN (335%). Alle anderen, bei einem oder mehreren dieser vier Substrate aktiven KR-Domänen wiesen einen Einbruch der Aktivität auf. Dies könnte auf die generell niedrige Affinität von  $\kappa$ -MPeMN oder auf eine hohe Affinität bzw. eventuell inhibierende Wirkung von  $\kappa$ -MPeDN zurückzuführen sein. TylKR1 besaß für die Umsetzung von  $\kappa$ -PaMN (304%) und  $\kappa$ -PiMN (340%) ähnlich der AmpKR2 (274% bzw. 406%) hohe Aktivitäten. Der Aktivitätseinbruch von TylKR1 für  $\kappa$ -MPeMN war daher unerwartet stark ausgefallen und lässt die Inhibition der Reduktion von  $\kappa$ -MPeMN durch  $\kappa$ -MPeDN als das realistischere Szenario erscheinen. Ohne Studien der Reinsubstanzen kann allerdings keine valide Aussage getroffen werden.



**Abbildung 3-24: Relative Kinetiken für die KR-Umsetzung der  $\beta$ -Keto-SNAC-Substrate  $\kappa$ -MPeMN 130 (zusammen mit  $\kappa$ -MPeDN 132) und  $\kappa$ -PEGMN 128 zu entsprechenden  $\beta$ -Hydroxy-Verbindungen.**

Die Angaben sind in Prozentpunkten und stehen in Relation zur Bezugsreaktion von EryKR1 (E1) mit  $\kappa$ -EMN (100%, violett gepunkteter Rahmen, Abbildung 3-20, S. 72). Die jeweilige KR-Domäne ist unter dem Diagramm angegeben: A1 = AmpKR1, E1 = EryKR1, T1 = TylKR1, A2 = AmpKR2, E6 = EryKR6, MA = MycKRA, MB = MycKRB, H = C-terminaler His<sub>6</sub>-tag, P = C-terminaler Pro<sub>5</sub>-tag.

$\kappa$ -MPeDN 132 ist das erste  $\alpha$ -dimethylierte SNAC-Substrat, das für PKS-KR-Domänen eingesetzt wurde. Auch wenn keine Reduktion des  $\beta$ -Ketons erfolgte, liefert dies Einblicke

in die substratabhängigen Reduktionsfähigkeit der untersuchten KRs. Zwei Erkenntnisse rahmen die Beobachtungen ein. Erstens sind andere sterisch anspruchsvolle Ketone für PKS-KR-Reduktionen zugänglich.<sup>[59]</sup> Zweitens wurde  $\kappa$ -MPeMN zumindest von AmpKR2 mit hoher Aktivität reduziert.<sup>[142]</sup> Damit muss das Ausbleiben der Reduktion von  $\kappa$ -MPeDN in der Enzym-Substrat-Kombination begründet liegen. Der Methylierungsgrad der  $\alpha$ -Position scheint die ausschlaggebende Größe zu sein. Die zweite Methylierung beeinflusst vermutlich die Substratorientierung im aktiven Zentrum und führt anscheinend zu einer stabilen, nicht reduktionsfähigen Konformation des Substrats. Wie zuvor schon im Vergleich des  $\alpha$ -unmethylierten  $\kappa$ -MHN und des  $\alpha$ -methylierten  $\kappa$ -MMN gezeigt werden konnte (S. 71), kann der Methylierungsgrad einen entscheidenden Einfluss auf die relative Aktivität bestimmter KR-Domänen haben. Im Gegensatz dazu verhindert die  $\alpha$ -Dimethylierung bei allen KRs eine Umsetzung.

Das Ketofragment von  $\kappa$ -PEGMN **128** besitzt im Gegensatz zu  $\kappa$ -MPeMN keine PKS-analoge Struktur. Dieses Substrat sollte die längste, lineare Struktur in der Substrat-Bibliothek darstellen und gleichzeitig eine beständige Löslichkeit in wässrigem Medium aufweisen. Die Länge des  $\kappa$ -PEGMN entsprach der von hexaketidischen PKS-Intermediaten. Da modifikationsfreie Alkanketten dieser Länge ausgeprägt hydrophob agieren, wurde auf die hydrophileren Ethylenglykol-Strukturen zurückgegriffen.<sup>[110]</sup>

Drei KR-Domänen zeigten bei der Umsetzung von  $\kappa$ -PEGMN Aktivitäten über 40%. TylKR1 erreichte mit 114% die höchste Aktivität in dieser Enzym-Substrat-Kombination, gefolgt von AmpKR2 mit 61% und EryKR6 mit 49%. EryKR6 setzt innerhalb der PKS-Biosynthese ein ACP-gebundenes, heptaketidisches Substrat um (Schema 3-18, S. 96) und  $\kappa$ -PEGMN als Hexaketid-Äquivalent besitzt eine vergleichbare Größe. Trotzdem beträgt der Aktivitätswert für  $\kappa$ -PEGMN nur ca. die Hälfte der Werte für die Umsetzung der tetra-ketidischen Substrate  $\kappa$ -PaMN (130%) und  $\kappa$ -PiMN (110%). Das Interaktionsmuster möglicher Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Ketofragment von  $\kappa$ -PEGMN scheint nicht ausreichend für eine höhere Aktivität zu sein. Dieselbe Situation stellte sich vermutlich bei MycKRA und MycKRB ein, welche ebenfalls ausgeprägt langkettige Substrate gut akzeptieren sollten. Der Aufbau von  $\kappa$ -PEGMN und dessen Größe dürften auch für

---

AmpKR2 und TylKR1 die Gründe für den Aktivitätseinbruch um mehrere 100 Prozentpunkte sein.

### **Gesamtbild der relativen Kinetiken bei der Umsetzung von SNAC-Thioestern**

TylKR1 zeigte nichtdestotrotz die stabilsten Aktivitäten über alle Substrate hinweg (46% bis 355%). Sobald die getesteten Substrate die Größe von linearen Diketiden überschritten, wies auch AmpKR2 eine hohe Aktivitätsstabilität auf (180% bis 406%) und übertraf für Substrate mit cyclischen Substituenten TylKR1 teils deutlich. Die Enzymreaktionen mit EryKR1 resultierten einzig bei den beiden kurzen, methylierten Substraten  $\kappa$ -MMN **34** und  $\kappa$ -EMN **35** in höheren Aktivitätswerten (199% bzw. 100%). Die aus derselben Naturstoff-Biosynthese stammende EryKR6 zeigte unter den getesteten Verbindungen starke Präferenzen für Substrate mit einer Größe entsprechend von Tetraketiden, die in Nachbarschaft zum  $\beta$ -Keton lineare Alkyl-Strukturen aufwiesen (70% bis 130%). MycKRA und MycKRB zeigten ein insgesamt differenzierteres Bild. MycKRA besaß hohe Aktivitäten bei der Umsetzung von  $\kappa$ -EMN,  $\kappa$ -CPMN **103** und  $\kappa$ -PMBMN **105** (114% bis 130%). MycKRB zeigte höhere Werte nur für die linearen Substrate  $\kappa$ -PaMN **101** (212%) und  $\kappa$ -PiMN **102** (86%). AmpKR1 war vermutlich aufgrund einer fehlerhaften Faltungsstruktur die Domäne mit der insgesamt schlechtesten Performanz über alle Substrate hinweg.

Die getaggen Enzym-Derivate von EryKR1 und TylKR1 zeigten keine auffällig abweichenden, relativen Aktivitäten auf. Im Detail besaßen EryKR1-H und EryKR1-P vorwiegend leicht niedrigere Aktivitäten als das ungetaggte EryKR1. EryKR1-P lag dabei immer um einige Prozentpunkte über EryKR1-H. Die drei TylKR1-Derivate zeigten hingegen keine globalen Tendenzen, sondern bei jedem Substrat zeigte sich ein anderes Verhältnis zwischen den drei Varianten (EryKR1 und TylKR1: Abbildung 3-20, S. 72; Abbildung 3-21, S. 74; Abbildung 3-23, S. 78; Abbildung 3-24, S. 81). Die *tags* His<sub>6</sub> (20 AS, 2.2 kDa) und Pros (24 AS, 2.7 kDa) zeigten insgesamt für ihre kleinen Ausmaße in Relation zu den Domänen bereits signifikant große Einflüsse auf die Domänenaktivität, allerdings ohne vorhersagbare Einflussrichtung. WEISSMAN *et al.* konnte im Vergleich von verschiedenen KR-Domänen der Erythromycin-Biosynthese mit und ohne GST-*tag* (26 kDa) ebenfalls einen Einfluss auf Affinität und Aktivität dokumentieren.<sup>[147]</sup> Der dabei gezeigte Effekt einer benachbarten

Tertiärstruktur (GST) kann anhand der vorliegenden Daten um den Einfluss von benachbarten Primär- oder Sekundärstrukturen auf die relative Aktivität einer Domäne erweitert werden. Die einzige Studie, die einen stärkeren Effekt eines *C*-terminalen His<sub>6</sub>-tags nachweisen konnte, wurden von LÜDEKE *et al.* erarbeitet. In dieser veränderte die Position des tags die Regio- und die Stereoselektivität der Carbonylreduktase.<sup>[151]</sup>

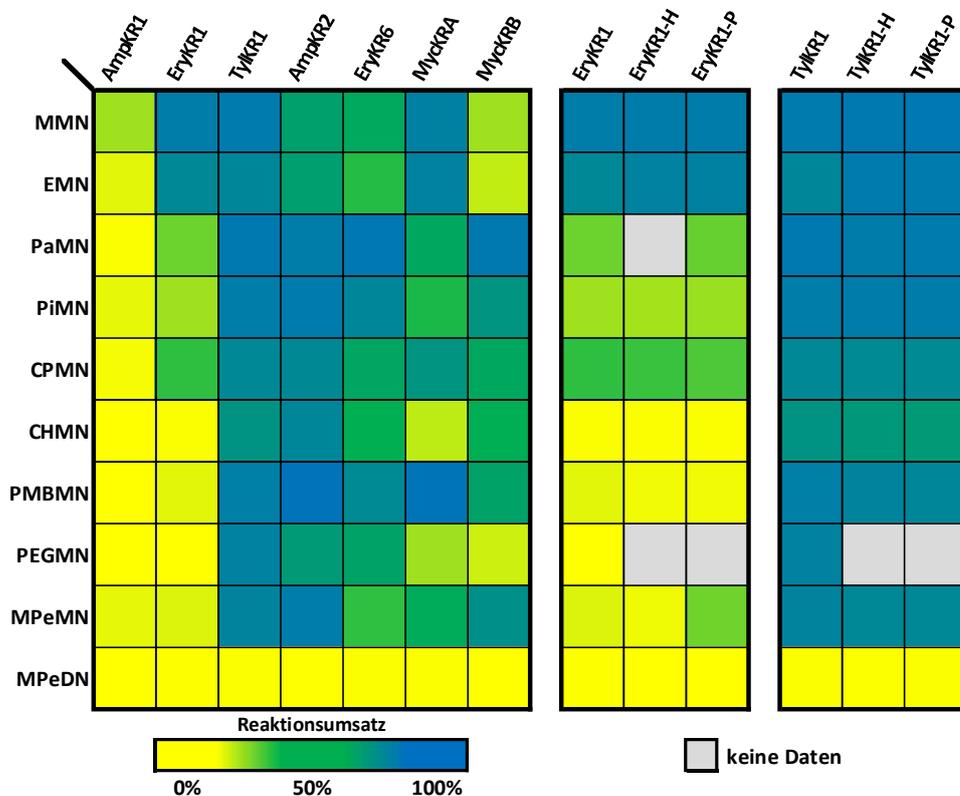
Die Einflüsse von benachbarten Strukturen innerhalb der PKS-Systeme bzw. verlängerten Aminosäureketten bei rekombinanten Domänen verdeutlichen, dass die KR-Domänen keine zwingend unabhängig agierenden Proteinstrukturen sind. Diese und vermutlich auch andere PKS-Domänen stehen in wechselseitigem Einfluss der Gesamtstruktur dieser Multienzymkomplexe.

### 3.7 Enzymaktivitätstests mit Zuordnung der Produktkonfigurationen

Die 24-stündigen Enzymaktivitätstests zur Ermittlung des Umsatzes und der Produktkonfigurationen wurden mit einem Überschuss an NADPH durchgeführt (Kapitel 6.5.4, S. 142). Die erhaltenen Extrakte wurden mittels UPLC/MS und chiraler HPLC untersucht.

#### Umsatz, Diastereomerenzuordnung und -verhältnisse

Die Bestimmung der Umsätze wurde anhand der *m/z*-Integrale (UPLC/MS) der detektierten Edukte und Produkte ermittelt. Die Zuordnung der relativen Produktkonfigurationen erfolgte auf Basis von  $\beta$ -Hydroxy-Referenzmolekülgemischen mit bekannten *syn/anti*-Verhältnissen (Kapitel 3.4.1, S. 45). Die entsprechenden Messungen der Referenzsubstanzen und einer repräsentativen Auswahl von enzymatischen Reduktionsprodukten sind in Abbildung 8-30 (S. 310; MMN, EMN, PaMN, PiMN), Abbildung 8-31 (S. 311; CPMN, CHMN, PMBMN, PEGMN) und Abbildung 8-32 (S. 312; MPeMN, MPeDN) dargestellt.<sup>[142]</sup>

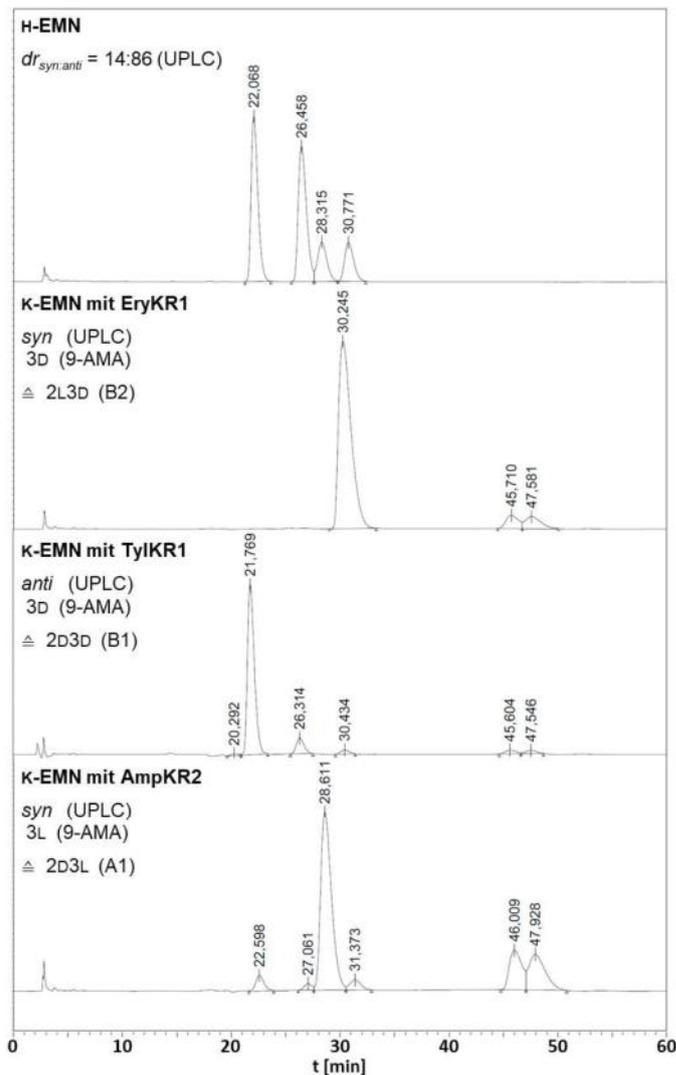


**Abbildung 3-25: Umsatzraten von Enzym-Substrat-Kombinationen mit SNAC-Thioester-Substraten.** Die jeweilige KR-Domäne ist über dem Diagramm angegeben. H = C-terminaler His<sub>6</sub>-tag, P = C-terminaler Pro<sub>5</sub>-tag. Die zugrundeliegenden Messwerte befinden sich in Tabelle 3-24 (S. 93) bis Tabelle 3-29 (S. 103).

Die Angaben zum Umsatz und den Diastereomerenverhältnissen (*dr*) sind für jede rekombinante KR-Domäne in einer Tabelle im entsprechenden Kapitel zusammengefasst. Eine graphische Gesamtübersicht der Umsatzraten ist in Abbildung 3-25 (S. 85) zu finden. Die entsprechende Übersichtsgraphik zu den Diastereomerenverhältnissen befindet sich in Abbildung 3-31 (S. 104). Die Daten der  $\beta$ -Hydroxy-Referenzgemische sind in Tabelle 8-5 (S. 309) aufgelistet. Innerhalb der UPLC(RP)/MS-Messungen besaß das jeweilige *syn*-Reduktionsprodukt die niedrigere Retentionszeit.

#### **Enantiomerenzuordnung und -verhältnisse**

Die Analyse der absoluten Konfigurationen beinhaltete die Untersuchung der Produkte mittels chiraler HPLC, UPLC/MS und 9-AMA. Die Zuordnung von Edukten und Produkten erfolgte je Substrat über eine Edukt-Referenz und einem  $\beta$ -Hydroxy-Referenzgemisch mit bekanntem *syn/anti*-Verhältnis. Die Bestimmung der absoluten Produktkonfigurationen erfolgte mittels 9-AMA-Methode (Kapitel 3.4.2, S. 54) von KR-Reduktionsprodukten aus hochgradig stereoselektiven Enzymumsetzungen im präparativen Maßstab (Kapitel 6.5.5, S. 143).<sup>[142]</sup> Die Integration der absoluten Konfigurationen der  $\beta$ -Positionen spezifischer Reduktionsprodukte in die Daten der relativen Konfigurationen der Referenzgemische ermöglichte die komplette Zuordnung der absoluten Konfigurationen der  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -methyl-Motive. In Abbildung 3-26 (S. 87) ist die Zuordnung am Beispiel von  $\kappa$ -EMN bzw. dem Reduktionsprodukt H-EMN gezeigt. Die relative Konfiguration von H-EMN nach der Umsetzung durch EryKR1 wurde als *syn* identifiziert. Die Analyse mittels 9-AMA ergab eine 3D/(*R*)-Konfiguration für die Hydroxygruppe, sodass im *syn*-Produkt die Methylgruppe eine 2L/(*S*)-Konfiguration besitzen musste. Das ermittelte 2L3D-Motiv entspricht dem KR-Typ B2, was mit bisher durchgeführten Studien über EryKR1 übereinstimmt.<sup>[57,59]</sup> Die erhaltenen Zuordnungen der absoluten Konfigurationen für die Substrate  $\kappa$ -EMN,  $\kappa$ -PiMN,  $\kappa$ -CPMN und  $\kappa$ -PMBMN ließen sich auf Basis der vorhandenen Daten der relativen Konfigurationen auf die Substrate  $\kappa$ -MMN (Bezug:  $\kappa$ -EMN),  $\kappa$ -PaMN (Bezug:  $\kappa$ -EMN und  $\kappa$ -PiMN) und  $\kappa$ -CHMN (Bezug:  $\kappa$ -CPMN) übertragen.



**Abbildung 3-26: Chromatogramme der chiralen HPLC.**

Gezeigt für die Produkte aus den Enzymaktivitätstests von EryKR1, TylKR1 und AmpKR2 mit  $\kappa$ -EMN und einem Referenzgemisch von H-EMN. Angegeben sind die zuvor ermittelte relative Konfiguration (UPLC) und absolute Konfiguration der  $\beta$ -Position (9-AMA). Absorption bei 235 nm. Die Signale zwischen 45.5 bis 48.0 min stammen von nicht-umgesetzten Startmaterial (Kapitel 8.7.2, Abbildung 8-50 S. 319).

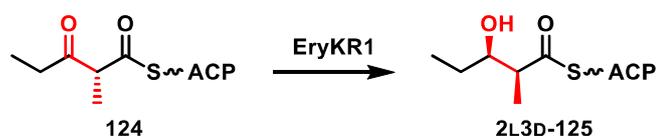
Die Angaben zu Stereoisomerenverteilungen und -verhältnissen sind für jede rekombinante KR-Domäne in einer Tabelle im entsprechenden Kapitel zusammengefasst. Die Daten der  $\beta$ -Hydroxy-Referenzgemische befinden sich in Tabelle 8-5 (S. 309). Die Reihenfolge der Angaben zu den Stereoisomerenanteilen in den Tabellen spiegelt nicht die Abfolge nach Retentionszeiten wider (Tabelle 8-6, S. 309). Die Retentionszeiten der einzelnen Isomere eines  $\beta$ -Hydroxyprodukts folgten im Vergleich der Substrate keiner gesamt einheitlichen Reihenfolge. Allerdings besaß das 2D3D-Isomer (*anti*, B1) immer eine niedrigere Retentionszeit als das 2L3L-Isomer (*anti*, A2) und 2L3D-Isomer (*syn*, B2). Innerhalb der *syn*-Isomere wurde immer das 2D3L-Isomer (A1) vor dem 2L3D-Isomer (B2) detektiert.

Im Folgenden werden die Ergebnisse geordnet nach rekombinanter KR-Domäne präsentiert und diskutiert. Es wird dabei auf den wiederholenden Hinweis zur rekombinanten Natur der untersuchten KR-Domänen verzichtet. Aussagen zu den in PKS integrierten KR-Domänen werden sprachlich als solche hervorgehoben.

Die Studien zu  $\kappa$ -MPeMN im Substanzgemisch mit  $\kappa$ -MPeMN werden in Kapitel 3.7.8 (S. 101) separat behandelt, da  $\kappa$ -MPeMN das einzige Substrat mit acht möglichen Produktisomeren war und hier einzig die UPLC/MS-Daten der Reduktionsprodukte vorliegen.

### 3.7.1 Enzymaktivitätstests mit EryKR1

EryKR1 ist eine äußerst umfangreich untersuchte KR-Domäne und stammt aus dem ersten Elongationsmodul des Erythromycin-PKS-Systems (Abbildung 3-1, S. 17). In Schema 3-14 (S. 88) ist das ACP-gebundene Diketid **134** vor und nach Reduktion gezeigt. Innerhalb der Biosynthese entsteht durch Reduktion mittels EryKR1 ein 2L3D-Motiv.<sup>[6,22,51,57,59,147]</sup>  $\kappa$ -EMN **35** stellte das naturanaloge Substrat in den vorliegenden Studien dar. Bei Untersuchungen der relativen Aktivitäten der KR-Domänen zeigte EryKR1 die höchsten Werte für  $\kappa$ -EMN (100%, Referenz) und  $\kappa$ -MMN (199%). Die Aktivität für  $\kappa$ -CHMN lag bei -3% und für alle anderen SNAC-Substrate zwischen 15% und 40% (Kapitel 3.6.2, S. 76). Bei den Thiophenol-Substraten zeigten sich keine relativen Aktivitäten höher als 9% ( $\kappa$ -TMSMP, Kapitel 3.6.1, S. 67).



**Schema 3-14:**  $\beta$ -Reduktion der Polyketidkette **134** ( $\kappa$ -EM-ACP) durch die im PKS-System integrierte EryKR1 während der Biosynthese von Erythromycin.

Das Reduktionsprodukt **144** besitzt ein 2L3D- bzw. (2*S*,3*R*)-Motiv und entspricht damit der Konfiguration, die durch KRs des Typs B2 erzeugt wird.<sup>[6,22]</sup>

Die höchsten Umsatzraten wurden für die Substrate  $\kappa$ -MMN (90%),  $\kappa$ -EMN (90%) und  $\kappa$ -CPMN (41%) ermittelt (Tabelle 3-20, S. 89). Alle Substrate mit einem Umsatz von über 5% zeigten stabile Diastereomerenüberschüsse von mindestens 90% ( $\kappa$ -CHMN: 1%, 74% *de*).  $\kappa$ -PEGMN wurde nicht in detektierbarem Ausmaß von EryKR1 reduziert. Die absoluten  $\alpha,\beta$ -Konfigurationen der Reduktionsprodukte  $\text{H-MMN}$ ,  $\text{H-EMN}$  und  $\text{H-CPMN}$

konnten einheitlich dem B2-Typ (2D3D) zugeordnet werden, wobei der Enantiomerenüberschuss jeweils  $\geq 99\%$  betrug.

EryKR1 besaß demnach eine hohe Stereoselektivität unabhängig vom Polyketidteil. Gleichzeitig akzeptierte EryKR1 ein bisher nicht untersuchtes Substratspektrum, wobei fünf von acht SNAC-Substraten moderate (19%) bis sehr gute Umsätze (90%) ergaben. Die Verbindungen  $\kappa$ -MMN und  $\kappa$ -EMN zeigten die erfolgreichsten Umsetzungen und waren dem natürlichen Substrat strukturell am ähnlichsten. Diese Ergebnisse reproduzieren einerseits die Arbeiten von KEATINGE-CLAY *et al.* und erweitern andererseits das Spektrum untersuchter Substrate um Substanzen, deren natürliche Derivate in der Erythromycin-Biosynthese nicht existieren und trotzdem nach der Reduktion einen hohen Diastereomerenüberschuss aufwiesen (90% *de*).<sup>[57]</sup>

**Tabelle 3-20: Umsätze, Diastereomerenverhältnisse (*dr*), Stereoisomerenverteilung und Enantiomerenverhältnisse (*er*) der  $\beta$ -Hydroxy-Produkte (H-XMN) nach der Reduktion durch EryKR1.**

Produkt	Umsatz <sup>a</sup>	<i>dr</i> <sub>syn:anti</sub> <sup>a</sup>	Stereoisomere <sup>b</sup> [%]				<i>er</i> <sup>b</sup>	
			A1	B2	B1	A2	<i>syn</i>	<i>anti</i>
			2D3L	2L3D	2D3D	2L3L		
H-MMN	90%	95:5	0	97	0	3	0:100	-
H-EMN	82%	100:0	0	100	0	0	0:100	-
H-PaMN	29%	96:4	-	-	-	-	-	-
H-PiMN	19%	100:0	-	-	-	-	-	-
H-CPMN	41%	95:5	0	97	0	3	0:100	-
H-CHMN	1%	87:13	-	-	-	-	-	-
H-PMBMN	6%	95:5	-	-	-	-	-	-
H-PEGMN	0%	-:-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> UPLC/MS; <sup>b</sup> chirale HPLC.

### Derivate von EryKR1

Die beiden Varianten der KR-Domäne EryKR1 mit His<sub>6</sub>- bzw. Pro<sub>5</sub>-tag zeigten in der Gesamtübersicht keine signifikanten Unterschiede mit Bezug auf Umsatz und erhaltene Diastereomerenverhältnisse. Ausnahmen davon fanden sich jedoch bei  $\kappa$ -CHMN und  $\kappa$ -PMBMN.

Die beiden getaggten Derivate besaßen für  $\kappa$ -CHMN mit einem  $de$  von  $\geq 99\%$  deutlich höhere Werte als die ungetaggte Domäne (74%  $de$ ). Das Diastereomerenverhältnis für die Reduktion von  $\kappa$ -PMBMN variierte je nach Domänenderivat stark. Die ungetaggte Domäne erzeugte einen  $de$  von 90%; die Pro<sub>5</sub>-getaggte Variante sogar von  $\geq 99\%$ . Im Gegensatz dazu wies das Produkt bei der Reduktion durch die EryKR1-H nur einen  $de$  von 58% auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Veränderung des C-Terminus einen Einfluss auf das erzeugte Diastereomerenverhältnis haben kann. Die Art und Intensität des Einflusses ist allerdings abhängig vom Polyketidpart des Substrats, wie die Umsetzungen von  $\kappa$ -CHMN und  $\kappa$ -PMBMN gegenüber den anderen Substraten zeigten.

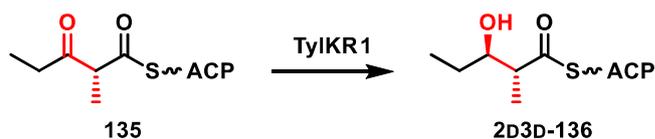
**Tabelle 3-21: Umsätze und Diastereomerenverhältnisse ( $dr$ ) der  $\beta$ -Hydroxy-Produkte (H-XMN) nach der Reduktion durch EryKR1-H und EryKR1-P im Vergleich mit EryKR1.**

Produkt	EryKR1		EryKR1-H		EryKR1-P	
	Umsatz <sup>a</sup>	$dr_{syn:anti}$ <sup>a</sup>	Umsatz <sup>a</sup>	$dr_{syn:anti}$ <sup>a</sup>	Umsatz <sup>a</sup>	$dr_{syn:anti}$ <sup>a</sup>
H-MMN	90%	95:5	91%	96:4	91%	96:4
H-EMN	82%	100:0	86%	100:0	87%	100:0
H-PaMN	29%	96:4	-	-:-	30%	98:2
H-PiMN	19%	100:0	18%	96:4	20%	96:4
H-CPMN	41%	95:5	39%	94:6	35%	94:6
H-CHMN	1%	87:13	1%	100:0	1%	100:0
H-PMBMN	6%	95:5	3%	79:21	3%	100:0

<sup>a</sup> UPLC/MS.

### 3.7.2 Enzymaktivitätstests mit TyIKR1

Die KR-Domäne TyIKR1 besitzt ihren Ursprung innerhalb der Biosynthese von Tylosin (Abbildung 3-1, S. 17). Dabei reduziert TyIKR1 die  $\beta$ -Position des Diketids **145**. Die entstehende  $\beta$ -Hydroxyverbindung **146** besitzt ein 2D3D-Motiv (Schema 3-15, S. 91), womit TyIKR1 dem B1-Typ zugeordnet werden kann.<sup>[26]</sup>



**Schema 3-15:  $\beta$ -Reduktion der Polyketidkette 145 ( $\kappa$ -EM-ACP) durch die im PKS-System integrierte TyIKR1 während der Biosynthese von Tylosin.**

Das Reduktionsprodukt 146 besitzt ein 2D3D- bzw. (2*R*,3*R*)-Motiv und entspricht damit der Konfiguration, die durch KRs des Typs B1 erzeugt wird.<sup>[26]</sup>

Die ermittelten relativen Aktivitätswerte von TyIKR1 waren für vier SNAC-Substrate moderat bis gut ( $\kappa$ -CHMN: 46%;  $\kappa$ -MPeMN: 47%;  $\kappa$ -PMBMN: 46%;  $\kappa$ -PEGMN: 114%) und für sechs weitere SNAC-Substrate mit über 190% sehr hoch ( $\kappa$ -MHN,  $\kappa$ -MMN,  $\kappa$ -EMN,  $\kappa$ -PaMN,  $\kappa$ -PiMN und  $\kappa$ -CPMN). Die relativen Aktivitätswerte für die Thiophenol-Derivate überstiegen im Vergleich dazu nicht 9% ( $\kappa$ -EMN;  $\kappa$ -TBSMN: 7%).

**Tabelle 3-22: Umsätze, Diastereomenverhältnisse (*dr*), Stereoisomerenverteilung und Enantiomerenverhältnisse (*er*) der  $\beta$ -Hydroxy-Produkte (H-XMN) nach der Reduktion durch TyIKR1.**

Produkt	Umsatz <sup>a</sup>	<i>dr</i> <sub>syn:anti</sub> <sup>a</sup>	Stereoisomere <sup>b</sup> [%]				<i>er</i> <sup>b</sup>	
			A1	B2	B1	A2	<i>syn</i>	<i>anti</i>
			2D3L	2L3D	2D3D	2L3L		
H-MMN	92%	1:99	0	0	30	70	-	30:70
H-EMN	83%	3:97	0	3	88	9	-	91:9
H-PaMN	93%	8:92	1	5	94	0	17:83	100:0
H-PiMN	90%	7:93	2	2	96	0	-	100:0
H-CPMN	82%	30:70	0	21	78	0	0:100	100:0
H-CHMN	73%	23:77	0	15	85	0	0:100	100:0
H-PMBMN	89%	18:82	9	0	88	3	100:0	97:3
H-PEGMN	86%	6:94	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> UPLC/MS; <sup>b</sup> chirale HPLC.

Das SNAC-Substrat mit dem geringsten Umsatz von 73% war  $\kappa$ -CHMN. Alle anderen Substrate wurden von TyIKR1 zu über 80% ( $\kappa$ -EMN,  $\kappa$ -CPMN,  $\kappa$ -PMBMN,  $\kappa$ -PEGMN) oder gar über 90% ( $\kappa$ -MMN,  $\kappa$ -PaMN,  $\kappa$ -PiMN) umgesetzt. Dabei wurden bei allen Substraten bevorzugt die *anti*-gegenüber den *syn*-Produkten dargestellt (40 bis 98% *de*). In der Gesamtübersicht stellte TyIKR1 vorwiegend das 2D3D-Motiv entsprechend der Tylosin-Biosynthese dar.  $\kappa$ -MMN war das einzige Substrat, bei dem mit einem Enantiomerenüberschuss von 40% das 2L3L-Motiv installiert wurde. Wie von LÜDEKE *et al.* beschrieben, wurde dieses kurzkettige Substrat vorzugsweise mit einer gegenläufigen Orientierung

innerhalb des aktiven Zentrums reduziert.<sup>[58]</sup> Bereits durch die Verlängerung der Alkylkette um ein Kohlenstoffatom sankt der Anteil des 2L3L-Reduktionsprodukts von 70% auf 9%. Alle anderen 2D3D-Produkte wurden mit einem Enantiomerenüberschuss von  $\geq 94\%$  erhalten. Darüber hinaus wurde das 2L3D-Motiv in signifikanten Anteilen bei den Substraten  $\kappa$ -CPMN (21%) und  $\kappa$ -CHMN (15%) registriert.

TyIKR1 reduzierte insgesamt mit einer hohen Stereoselektivität  $\beta$ -Keto- $\alpha$ -methyl-SNAC-thioester-Substrate zu entsprechenden 2D3D-konfigurierten Produkten mit Ausnahme des kleinsten, verzweigten Substrats  $\kappa$ -MMN.

### Derivate von TyIKR1

Die Derivate der TyIKR1-Domäne zeigten insgesamt ähnliche Umsätze und Diastereomerenverhältnisse wie die ungetaggte Variante. Einzige signifikante Ausnahme stellte die Enzym-Substrat-Kombination von TyIKR1-H und  $\kappa$ -PMBMN dar. Hierbei stieg der Anteil von *anti*-Produkten von 82% bzw. 79% auf 94%. Die unterschiedlichen C-Termini besitzen damit bei TyIKR1 einen geringeren Einfluss auf Umsätze und Isomerenverteilung als bei EryKR1.

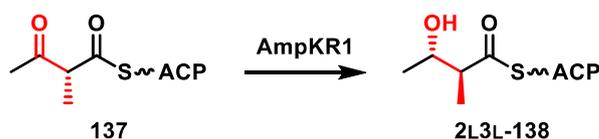
Tabelle 3-23: Umsätze und Diastereomerenverhältnisse (*dr*) der  $\beta$ -Hydroxy-Produkte (H-XMN) nach der Reduktion durch TyIKR1-H und TyIKR1-P im Vergleich mit EryKR1.

Produkt	TyIKR1		TyIKR1-H		TyIKR1-P	
	Umsatz <sup>a</sup>	<i>dr</i> <sub>syn:anti</sub> <sup>a</sup>	Umsatz <sup>a</sup>	<i>dr</i> <sub>syn:anti</sub> <sup>a</sup>	Umsatz <sup>a</sup>	<i>dr</i> <sub>syn:anti</sub> <sup>a</sup>
H-MMN	92%	1:99	93%	1:99	94%	1:99
H-EMN	83%	3:97	92%	4:96	92%	4:96
H-PaMN	93%	8:92	91%	7:93	92%	8:92
H-PiMN	90%	7:93	91%	3:97	91%	8:92
H-CPMN	82%	30:70	80%	30:70	80%	29:71
H-CHMN	73%	23:77	69%	18:82	67%	25:75
H-PMBMN	89%	18:82	85%	6:94	83%	21:79

<sup>a</sup> UPLC/MS.

### 3.7.3 Enzymaktivitätstests mit AmpKR1

Die KR-Domäne AmpKR1 stammt aus dem ersten Elongationsmodul der Biosynthese von Amphotericin (Abbildung 3-1, S. 17). Das natürliche, ACP-gebundene Substrat **147** ist ein Diketid (Schema 3-16) und entspricht dem analogen SNAC-Substrat  $\kappa$ -MMN **34**. Die PKS-integrierte KR-Domäne erzeugt ein 2L3L-Motiv und entspricht damit dem A2-Typ.<sup>[30]</sup>



**Schema 3-16:**  $\beta$ -Reduktion der Polyketidkette **147** ( $\kappa$ -MM-ACP) durch die im PKS-System integrierte AmpKR1 während der Biosynthese von Amphotericin.

Das Reduktionsprodukt **148** besitzt ein 2L3L- bzw. (2*S*,3*S*)-Motiv und entspricht damit der Konfiguration, die durch KRs des Typs A2 erzeugt wird.<sup>[30]</sup>

In den Studien zur relativen Aktivität der KR-Domänen zeigte AmpKR1 insgesamt nur niedrige Aktivitätswerte von 1% für  $\kappa$ -CHMN **104** bis 20% für  $\kappa$ -CPMN **103** für die Untersuchungen mit Reinsubstanzen. Unerwarteter Weise lag die relative Aktivität für das Tetra-*ketid*  $\kappa$ -MPeMN **130** im Substanzgemisch mit  $\kappa$ -MPeDN **132** bei 45% und damit über allen anderen Substraten.

**Tabelle 3-24:** Umsätze, Diastereomerenverhältnisse (*dr*), Stereoisomerenverteilung und Enantiomerenverhältnisse (*er*) der  $\beta$ -Hydroxy-Produkte (H-XMN) nach der Reduktion durch AmpKR1.

Produkt	Umsatz <sup>a</sup>	<i>dr</i> <sub>syn:anti</sub> <sup>a</sup>	Stereoisomere <sup>b</sup> [%]				<i>er</i> <sup>b</sup>	
			A1	B2	B1	A2	<i>syn</i>	<i>anti</i>
			2D3L	2L3D	2D3D	2L3L		
H-MMN	19%	97:3	0	100	0	0	0:100	-
H-EMN	6%	100:0	0	100	0	0	0:100	-
H-PaMN	1%	72:28	-	-	-	-	-	-
H-PiMN	5%	100:0	-	-	-	-	-	-
H-CPMN	2%	97:3	-	-	-	-	-	-
H-CHMN	0%	-:-	-	-	-	-	-	-
H-PMBMN	0%	-:-	-	-	-	-	-	-
H-PEGMN	0%	-:-	-	-	-	-	-	-

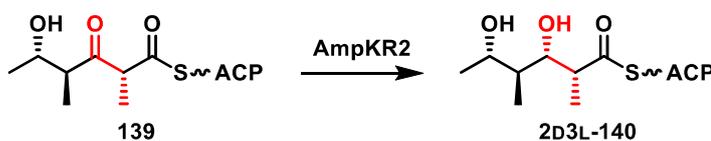
<sup>a</sup> UPLC/MS; <sup>b</sup> chirale HPLC.

Die Umsatzraten der 24-stündigen Enzymaktivitätstests zeigten die stabilste enzymatische Reduktion beim naturalogenen  $\kappa$ -MMN (19%; Tabelle 3-24, S. 93). Das einzige andere Substrat mit einem Umsatz über 5% war  $\kappa$ -EMN (6%). Die geringe Umsetzung der SNAC-Substrate durch AmpKR1 könnte auf eine teilweise inaktive Rückfaltung der Domäne hinweisen, da KEATINGE-CLAY *et al.* deutlich höhere Werte nachweisen konnte ( $\kappa$ -MMN: 100%;  $\kappa$ -EMN: 50%).<sup>[57]</sup> Die Untersuchung der Reduktionsprodukte dieser beiden Substrate mittels chiraler HPLC zeigte, dass in beiden Fällen einzig das 2L3D-Motiv (B2) durch die Reduktion von AmpKR1 nachweislich installiert wurde. Die Orientierung der SNAC-Substrate im aktiven Zentrum war somit mutmaßlich anders als in während der Biosynthese und deckt sich nicht mit den Studien von KEATINGE-CLAY *et al.* (2L3L/A2,  $\geq 99\%$  ee).<sup>[57]</sup>

AmpKR1 zeigte somit für zwei Substrate eine hohe Stereoselektivität mit unerwarteter Konfiguration (B2,  $\geq 99\%$  ee). Darüber hinaus besaß das Expressionsprodukt nach der Denaturierung und Rückfaltung lediglich eine geringe Aktivität.

### 3.7.4 Enzymaktivitätstests mit AmpKR2

Die zweite KR-Domäne mit Ursprung in der Amphotericin-Biosynthese ist die AmpKR2. Diese reduziert im natürlichen Kontext das um eine Methylmalonyleinheit verlängerte Triketid **149** (Schema 3-17, S. 94). Das entstehende 2D3L-Motiv zeugt von einer A1-KR.<sup>[30]</sup>



**Schema 3-17:  $\beta$ -Reduktion der Polyketidkette **149** durch die im PKS-System integrierte AmpKR2 während der Biosynthese von Amphotericin.**

Das Reduktionsprodukt **149** besitzt ein 2D3L- bzw. (2R,3S)-Motiv und entspricht damit der Konfiguration, die durch KRs des Typs A1 erzeugt wird.<sup>[30]</sup>

Die höchsten, relativen Aktivitäten der Thiophenol-Substrate zeigten die Reduktionen von  $\kappa$ -CPMP (10%) und  $\kappa$ -CHMP (9%). Die entsprechenden Werte für die kurzkettigen SNAC-Substrate  $\kappa$ -MHN,  $\kappa$ -MMN und  $\kappa$ -EMN waren nur geringfügig größer (13 bis 40%).  $\kappa$ -PEGMN wurde ebenfalls mit einer moderaten Aktivität von 61% umgesetzt. AmpKR2 setzte alle weiteren SNAC-Substrate mit 180 bis 406% relativer Aktivität um.

Diese Verteilung der relativen Aktivitäten spiegelt sich ebenfalls in den Umsätzen wider, wobei auch die kurzen SNAC-Substrate  $\kappa$ -MMN und  $\kappa$ -EMN zu 63% bzw. 64% umgesetzt wurden. Die Substrate  $\kappa$ -PaMN,  $\kappa$ -PiMN und  $\kappa$ -PMBMN mit linearem Polyketidfragment im 7 Å-Bereich mit Bezug zur  $\beta$ -Position besitzen die höchsten Umsatzraten von 90 bis 98%.

Die *syn*-Konfigurationen wurden bei allen Reduktionen durch AmpKR2 mit einem mindestens 90%igen Anteil bevorzugt dargestellt. Nur bei dem Substrat  $\kappa$ -MMN lag der *syn*-Anteil im Produkt bei 67% (A1, 100% *ee*) und der Anteil der *anti*-Produkte fällt hauptsächlich auf das 2L3L-Enantiomer (A2, 58% *ee*). Das 2D3L- bzw. A1-Enantiomer war auch bei den anderen Substraten das primäre Produkt, mit Ausnahme der Umsetzung von  $\kappa$ -CHMN (B2, 4% *ee*). Die Enantiomerenüberschüsse lagen für H-EMN, H-PaMN und H-PMBMN bei 89, 84 und 100%. 13, 33 bzw. 50% der Produkte H-PiMN, H-CPMN und H-CHMN entsprachen dem jeweiligem 2L3D-Isomer und zeigten damit mit signifikantem Anteil eine zuvor nicht für AmpKR2 berichtete Produktkonfiguration.

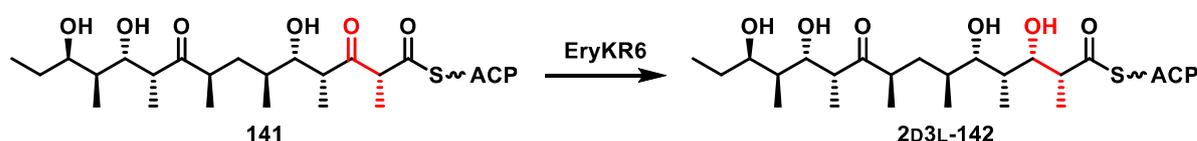
**Tabelle 3-25: Umsätze, Diastereomerenverhältnisse (*dr*), Stereoisomerenverteilung und Enantiomerenverhältnisse (*er*) der  $\beta$ -Hydroxy-Produkte (H-XMN) nach der Reduktion durch AmpKR2.**

Produkt	Umsatz <sup>a</sup>	<i>dr</i> <sub><i>syn:anti</i></sub> <sup>a</sup>	Stereoisomere <sup>b</sup> [%]				<i>er</i> <sup>b</sup>	
			A1	B2	B1	A2	<i>syn</i>	<i>anti</i>
			2D3L	2L3D	2D3D	2L3L		
H-MMN	63%	62:38	67	0	7	26	100:0	21:79
H-EMN	64%	90:10	87	5	6	2	95:5	75:25
H-PaMN	90%	94:6	90	8	2	0	92:8	-
H-PiMN	92%	97:3	86	13	1	0	87:13	-
H-CPMN	81%	90:10	64	33	1	2	66:34	-
H-CHMN	83%	91:9	47	50	3	0	48:52	-
H-PMBMN	98%	93:7	95	0	2	3	100:0	-
H-PEGMN	67%	95:5	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> UPLC/MS; <sup>b</sup> chirale HPLC.

### 3.7.5 Enzymaktivitätstests mit EryKR6

Innerhalb der Biosynthese von Erythromycin gibt es eine weitere KR-Domäne, die in die Studien mit einbezogen wurde, die EryKR6. Diese Domäne des Typs A1 ist die letzte KR innerhalb der Biosynthese und installiert ein 2D3L-Motiv im Heptaketid **151** (Schema 3-18, S. 96).<sup>[6,22]</sup> Die relativen Aktivitäten bei den Thiophenol-Substraten liegen wie bei den anderen Domänen sehr niedrig mit einem Maximalwert von 8% ( $\kappa$ -TBSMP). Die entsprechenden Werte für die SNAC-Substrate befinden sich ohne Ausnahme darüber, wobei nur die Aktivitäten bei  $\kappa$ -PaMN und  $\kappa$ -PiMN über 100% betragen (130% bzw. 110%).



**Schema 3-18:**  $\beta$ -Reduktion der Polyketidkette **151** durch die im PKS-System integrierte EryKR6 während der Biosynthese von Erythromycin.

Das Reduktionsprodukt **152** besitzt ein 2D3L- bzw. (2S,3R)-Motiv und entspricht damit der Konfiguration, die durch KRs des Typs A1 erzeugt wird.<sup>[6,22]</sup>

Die dem A1-Typ zugeschriebene Domäne EryKR6 zeigte stark substratabhängige Unterschiede bei den Umsätzen und den Isomerenverteilungen der entstehenden Produkte. Mit Ausnahme der Substrate mit cyclischen Strukturen entspricht die Orientierung der Startmaterialien in der Domäne bevorzugt dem A-Typ, wobei bis zu 55% des Produkts (H-MMN, 100% *ee*) eine 2L3L-Konfiguration besaßen (A2-Typ). Die zuvor für EryKR6 nicht als Hauptprodukt berichtete 2L3D-Konfiguration (B2) zeigte sich bei den Produkten H-CPMN und H-CHMN sogar mit einem hohen Enantiomerenüberschüssen von  $\geq 94\%$ . Den höchste Enantiomerenüberschuss für ein Produkt mit einer 2D3L-Konfiguration wurde bei der Umsetzung von  $\kappa$ -PMBMN mit 92% gefunden. Allerdings betrug hier der entsprechende Diastereomerenüberschuss nur 40%.

Die untersuchten Enzym-Substrat-Kombinationen mit EryKR6 zeigten somit nie hohe Umsätze mit gleichzeitigen hohen Enantiomeren- oder Diastereomerenüberschüssen. EryKR6 scheint damit sehr spezifisch an das natürliche Substrat angepasst zu sein und auf Veränderungen in der Substratstruktur sensibel zu reagieren.

Tabelle 3-26: Umsätze, Diastereomerenverhältnisse (*dr*), Stereoisomerenverteilung und Enantiomerenverhältnisse (*er*) der  $\beta$ -Hydroxy-Produkte (H-XMN) nach der Reduktion durch EryKR6.

Produkt	Umsatz <sup>a</sup>	<i>dr</i> <sub>syn:anti</sub> <sup>a</sup>	Stereoisomere <sup>b</sup> [%]				<i>er</i> <sup>b</sup>	
			A1	B2	B1	A2	<i>syn</i>	<i>anti</i>
			2D3L	2L3D	2D3D	2L3L		
H-MMN	56%	47:53	45	0	0	55	100:0	0:100
H-EMN	43%	43:57	45	6	5	45	88:12	10:90
H-PaMN	94%	65:35	58	18	4	21	76:24	16:84
H-PiMN	83%	73:27	45	37	3	15	55:45	17:83
H-CPMN	58%	76:24	3	83	4	10	3:97	28:72
H-CHMN	51%	84:16	1	91	8	0	1:99	100:0
H-PMBMN	80%	64:36	66	3	4	28	96:4	13:87
H-PEGMN	61%	60:40	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> UPLC/MS; <sup>b</sup> chirale HPLC.

### 3.7.6 Enzymaktivitätstests mit MycKRA

Die erste aus der Mycolacton-Biosynthese stammende Domäne ist die MycKRA (Abbildung 3-1, S. 17). Diese KR ist insgesamt in drei Modulen der beiden beteiligten PKS-Systeme enthalten. Das kleinste, natürliche Produkt ist das Diketid **153** und das längste Produkt das Hexaketid **155** (Abbildung 3-27, S. 97). Genau wie die anderen beiden Produkte ist das Triketid **154** nicht  $\alpha$ -methyliert. Der durch die Reduktion entstehende  $\beta$ -Alkohol besitzt bei allen drei natürlichen Produkten eine L-Konfiguration, womit MycKRA den KR vom A0-Typ zugeordnet wird.<sup>[60]</sup> Die Werte der relativen Aktivitäten von nur drei SNAC-Substraten überstiegen 100%:  $\kappa$ -EMN (130%),  $\kappa$ -CPMN (114%) und  $\kappa$ -PMBMN (126%).

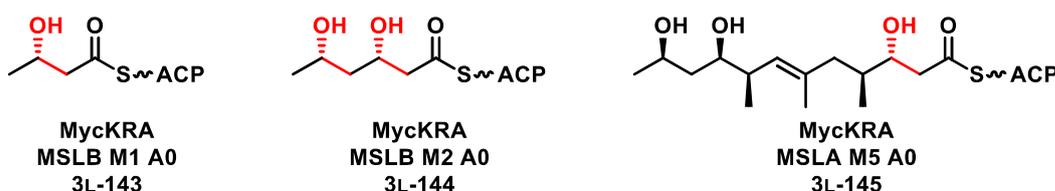


Abbildung 3-27:  $\beta$ -Reduktionsprodukte **153**, **154** und **155**, die in den PKS-Systemen MSLA und MSLB durch die integrierte MycKRA während der Biosynthese von Mycolacton (**44**) dargestellt werden.

Die Reduktionsprodukte **153**, **154** und **155** besitzen alle ein 3L-Motiv und entsprechen damit der Konfiguration, die durch KR des Typs A0 erzeugt wird.<sup>[60]</sup>

Die Daten der Enzymaktivitätstests zeigten einzig für die Reduktion von  $\kappa$ -CPMN einen hohen Diastereomerenüberschuss von 90% (*anti*). Bei allen anderen Substraten lagen die Überschüsse zwischen 4% (H-PiMN) und 60% (H-CHMN). Das Produktgemisch von H-EMN besaß einen *anti*-Überschuss von 42%. Die Studien von WEISSMAN *et al.* konnten damit für  $\kappa$ -EMN (30% *de*) reproduziert und erfolgreich um sieben bisher nicht untersuchte Substrate erweitert werden.<sup>[60]</sup> Die Enantiomerenauflösung der Produktgemische zeigt, dass über alle methylierten Substrate hinweg hauptsächlich die beiden Konfigurationen 2D3L und 2L3L des A-Typs erzeugt wurden. Unabhängig des Polyketidfragments der Substrate nahmen diese somit dieselbe Orientierung innerhalb von MycKRA ein. Die  $\alpha$ -Konfiguration in den Reduktionsprodukten variierte hingegen stark und führte zu den benannten niedrigen *de*-Werten. Dies ist in Hinblick auf die natürlichen Substratreduktion insofern nachvollziehbar, als MycKRA keine  $\alpha$ -methylierten Substrate prozessiert und somit keine Selektion auf diese Konfiguration erfolgt.

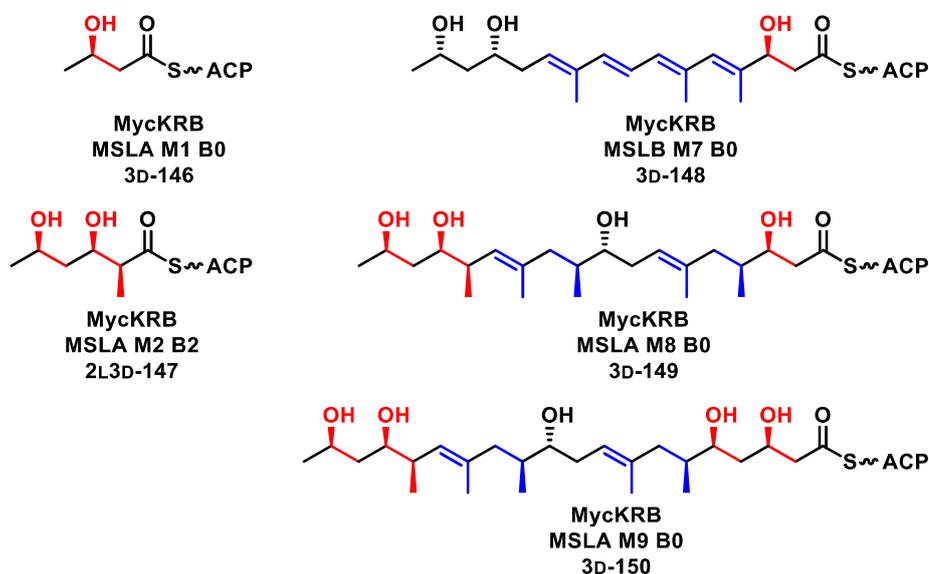
**Tabelle 3-27: Umsätze, Diastereomerenverhältnisse (*dr*), Stereoisomerenverteilung und Enantiomerenverhältnisse (*er*) der  $\beta$ -Hydroxy-Produkte (H-XMN) nach der Reduktion durch MycKRA.**

Produkt	Umsatz <sup>a</sup>	<i>dr</i> <sub>syn:anti</sub> <sup>a</sup>	Stereoisomere <sup>b</sup> [%]				<i>er</i> <sup>b</sup>	
			A1 2D3L	B2 2L3D	B1 2D3D	A2 2L3L	<i>syn</i>	<i>anti</i>
H-MMN	87%	37:63	30	0	0	70	100:0	0:100
H-EMN	86%	29:71	29	0	0	71	100:0	0:100
H-PaMN	57%	39:61	47	0	0	53	100:0	0:100
H-PiMN	45%	48:52	52	1	1	46	98:2	2:98
H-CPMN	72%	5:95	2	0	0	98	100:0	0:100
H-CHMN	13%	20:80	14	0	0	86	100:0	0:100
H-PMBMN	97%	25:75	19	0	2	79	100:0	2:98
H-PEGMN	19%	35:65	-	-	-	-		-

<sup>a</sup> UPLC/MS; <sup>b</sup> chirale HPLC.

### 3.7.7 Enzymaktivitätstests mit MycKRB

MycKRB ist die zweite Domäne mit dem Ursprung in der Mycolacton-Biosynthese. Diese ist ebenfalls in beiden PKS-Systemen zu finden, allerdings in insgesamt 13 Elongationsmodulen. Fünf der erzeugten  $\beta$ -Alkohole bleiben mit einer D-Konfiguration im finalen Naturstoff erhalten. Die anderen acht Stufen werden durch entsprechende Dehydratase-Domänen weiter reduziert. Das einzige natürliche Produkt mit  $\alpha$ -Methylierung und bestehenbleibender Hydroxygruppe ist das Triketid **157** (Abbildung 3-28, S. 99). Das installierte *syn*-Motiv besitzt entsprechend dem B2-Typ eine 2L3D-Konfiguration. Die Reduktion der unverzweigten Substrate entspricht demnach dem B0-Typ (3D).<sup>[60]</sup>



**Abbildung 3-28:  $\beta$ -Reduktionsprodukte 156, 157, 158, 159 und 160, die in den PKS-Systemen MSLA und MSLB durch die integrierte MycKRB während der Biosynthese von Mycolacton (44) dargestellt werden.** Die Reduktionsprodukte 156, 158, 159 und 160 besitzen ein 3D-Motiv und entsprechen damit der Konfiguration, die durch KRs des B0-Typs erzeugt wird. Das Reduktionsprodukt 157 besitzt ein 2L3D- bzw. (2*S*,3*R*)-Motiv und entspricht damit der Konfiguration, die durch KRs des Typs B2 erzeugt wird. In blau markiert sind die Polyketidkettenabschnitte, die während der Prozessierung von der MycKRB-Domäne reduziert werden, die Hydroxygruppe aber durch eine Dehydratase-Domäne entfernt wird.<sup>[60]</sup>

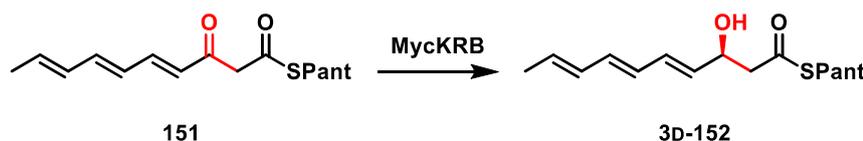
Das Thiophenol-Substrat mit der höchsten relativen Aktivität ist wie bei EryKR6  $\kappa$ -TBSMP mit 8%. Die höchsten, relativen Aktivitäten bei den SNAC-Substraten finden sich für  $\kappa$ -PaMN (212%) und  $\kappa$ -PiMN (86%).

Tabelle 3-28: Umsätze, Diastereomerenverhältnisse (*dr*), Stereoisomerenverteilung und Enantiomerenverhältnisse (*er*) der  $\beta$ -Hydroxy-Produkte ( $\kappa$ -XMN) nach der Reduktion durch MycKRB.

Produkt	Umsatz <sup>a</sup>	<i>dr</i> <sub>syn:anti</sub> <sup>a</sup>	Stereoisomere <sup>b</sup> [%]				<i>er</i> <sup>b</sup>	
			A1 2D3L	B2 2L3D	B1 2D3D	A2 2L3L	<i>syn</i>	<i>anti</i>
H-MMN	19%	4:96	0	0	0	100	-	0:100
H-EMN	12%	6:94	0	0	50	50	-	50:50
H-PaMN	93%	1:99	1	0	99	0	-	100:0
H-PiMN	72%	4:96	1	1	98	1	-	99:1
H-CPMN	57%	4:96	0	1	97	1	-	99:1
H-CHMN	52%	5:95	0	2	98	0	-	100:0
H-PMBMN	61%	2:98	1	0	99	0	-	100:0
H-PEGMN	10%	16:84	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> UPLC/MS; <sup>b</sup> chirale HPLC.

$\kappa$ -PaMN und  $\kappa$ -PiMN waren bei MycKRB ebenfalls die Substrate mit den höchsten Umsätzen von 93 bzw. 72%.  $\kappa$ -PEGMN wurden nur zu 10% reduziert und besitzt den geringsten Umsatz einhergehend mit dem geringsten Diastereomerenüberschuss von 68%. Die Produkte aller anderen Substrate zeigten entsprechende Überschüsse von 88 bis 98%, allerdings für die *anti*-Produkte. Es wurden hauptsächlich die 2L3L- und 2D3D-Enantiomere (A2 bzw. B1) nachgewiesen. Die Verteilung dieser beiden Enantiomere ist dabei abhängig von der Größe des Substrats bzw. dessen Polyketidteils. Das kleinste methylierte Substrat  $\kappa$ -MMN wurde ausschließlich zum 2L3L-Enantiomere reduziert ( $\geq 99\%$  *ee*). Wird das Polyketidfragment um eine Methylengruppe verlängert ( $\kappa$ -EMN), so besteht das Reduktionsprodukt aus einem 1:1-Gemisch des 2L3L- und 2D3D-Enantiomeres. Die längere Alkylkette von  $\kappa$ -PaMN sorgte anscheinend für eine vollständige Umkehr der A-Typ-Orientierung bei  $\kappa$ -MMN zur B-Typ-entsprechenden Orientierung. Dabei zeigten die Produkte H-PaMN, H-PiMN zusammen mit den Produkten H-CPMN und H-CHMN hohe Enantiomerenüberschüsse von  $\geq 98\%$  für das jeweilige 2D3D-Isomer.



**Schema 3-19: Verwendetes Polyen-Substrat 161 und das erhaltene D-Hydroxy-Produkt 162 in den MycKRB-Studien von WUNDERLICH *et al.*<sup>[152]</sup>**

Die in der Biosynthese benötigte Substratorientierung erfolgt somit bei SNAC-Substraten ab einer bestimmten Substratlänge. Allerdings wurde bei keinem dieser korrekt orientierten Substrate die Konfiguration der  $\alpha$ -Position alterniert. WUNDERLICH *et al.* konnte zeigen, dass die MycKRB-Reduktion des Pentaketids **161** ebenfalls mit hoher Stereoselektivität zum D-Hydroxy-Produkt **162** führt (99% *ee*, Schema 3-19, S. 101).<sup>[152]</sup> Diese und die zuvor beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Orientierung im rekombinanten Domäne durch die Substratgröße mit beeinflusst wird. In PKS-Systemen dürfte hingegen primär die Interaktion mit der ACP die Ausrichtung des Substrats bestimmen.<sup>[60]</sup>

Die rekombinante MycKRB zeigt damit eine meist hohe Stereoselektivität, die abhängig vom Substrat zu unterschiedlichen Konfigurationen führte.

### 3.7.8 Enzymaktivitätstests mit $\kappa$ -MPeMN und $\kappa$ -MPeDN

Die strukturellen Besonderheiten und die Einordnung zu verschiedenen Polyketid-Naturstoffen des Substratgemisches von  $\kappa$ -MPeMN **130** und  $\kappa$ -MPeDN **132** sind in Kapitel 3.6.2 (S. 80) bereits beschrieben. An dieser Stelle soll nun auf die Konfigurationen des Startmaterials, die der möglichen Produkte und den zugehörigen Enzymaktivitätstests eingegangen werden.  $\kappa$ -MPeMN und  $\kappa$ -MPeDN sind die einzigen Substrate, die ein Chiralitätszentrum innerhalb des Polyketidteils besitzen. Dieses befindet sich in  $\zeta$ -Position und betrifft die Methoxygruppe. Die Syntheseroute war nicht stereoselektiv, sodass von einem racemischen Gemisch ausgegangen wurde. Die  $\zeta$ -Position unterliegt keiner Keto-Enol-Tautomerie, wie die  $\alpha$ -Position von  $\kappa$ -MPeMN.<sup>[110]</sup>



Abbildung 3-29: Strukturformeln der beiden Substrate  $\kappa$ -MPeMN 130 und  $\kappa$ -MPeDN 132 mit Chiralitätszentrum innerhalb des Polyketidteils.

Die Reduktion der  $\beta$ -Position bei  $\kappa$ -MPeMN erzeugte in der Theorie ein Produktgemisch aus acht Stereoisomeren (Abbildung 3-30, S. 102). Die chemische Reduktion erzeugte allerdings nur drei Enantiomerenpaare von H-MPeMN (Tabelle 3-29, S. 103; Abbildung 8-32, S. 312). Bei der chemischen Reduktion von  $\kappa$ -MPeDN wurden hingegen die beiden erwarteten Enantiomerenpaare nachgewiesen (Abbildung 3-30, S. 102; Abbildung 8-32, S. 312). Die enzymatischen Reaktionen führten zur Reduktion von  $\kappa$ -MPeMN durch jede untersuchte KR-Domäne, allerdings in stark unterschiedlichen Quantitäten (Tabelle 3-29, S. 103). Das  $\alpha$ -dimethylierte Substrat  $\kappa$ -MPeDN wurde hingegen von keiner KR-Domäne als Substrat akzeptiert (Abbildung 8-32, S. 312).

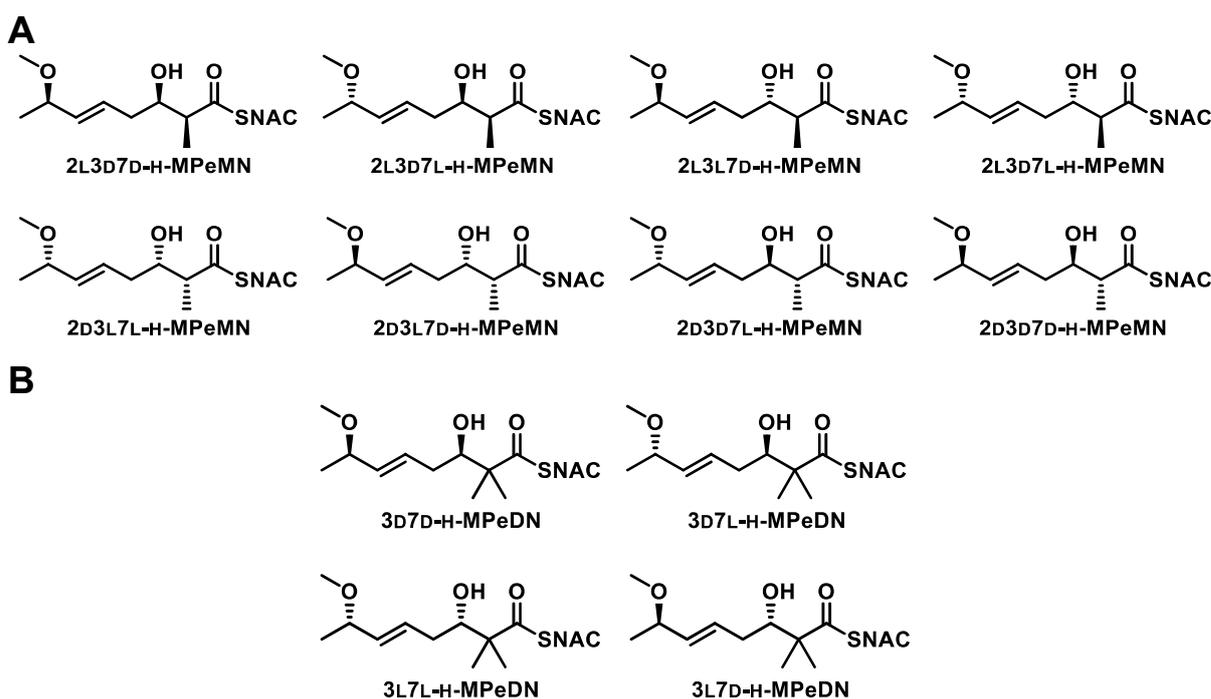


Abbildung 3-30: Strukturformeln möglicher Reduktionsprodukte.

A) Strukturformeln aller Stereoisomere des  $\beta$ -Hydroxyprodukts H-MPeMN 131 bei der  $\beta$ -Reduktion von  $\kappa$ -MPeMN 130 und B) aller Stereoisomere des  $\beta$ -Hydroxyprodukts H-MPeDN 133 nach der  $\beta$ -Reduktion von  $\kappa$ -MPeDN 132. Die zu einem Enantiomerenpaar gehörenden Stereoisomere befinden sich übereinander.

Die Konfigurationen der Produkte wurden nicht identifiziert, daher werden die Enantiomerenpaare entsprechend der Reihenfolge der Retentionszeiten nummeriert.

AmpKR2 zeigte mit 90% den höchsten Umsatz von  $\kappa$ -MPeMN und eine hohe Stereoselektivität mit einem Diastereomerenüberschuss von 94% des ersten Enantiomerenpaares. Auch EryKR6 erzeugte bevorzugt dieses Enantiomerenpaar, allerdings mit geringerem Umsatz (41%) und niedrigerem Überschuss (52%).  $\geq 99\%$ ige Überschüsse des zweiten  $\text{H-MPeMN}$ -Enantiomerenpaares bewirkten die Domänen AmpKR1, EryKR1-H und EryKR1-P, allerdings nur mit sehr geringen Umsätzen (3 bis 28%). Im Fall von TylKR1 wurden 85% des Substrats  $\kappa$ -MPeMN umgesetzt, mit einer bevorzugten Bildung des zweiten Enantiomerenpaares (72% *de*). Die Domänen EryKR1, MycKRA und MycKRB zeigten keine signifikanten Stereoselektivitäten. Diese drei Domänen stellten zusätzlich auch das dritte und MycKRA auch das vierte  $\text{H-MPeMN}$ -Enantiomerenpaar dar.

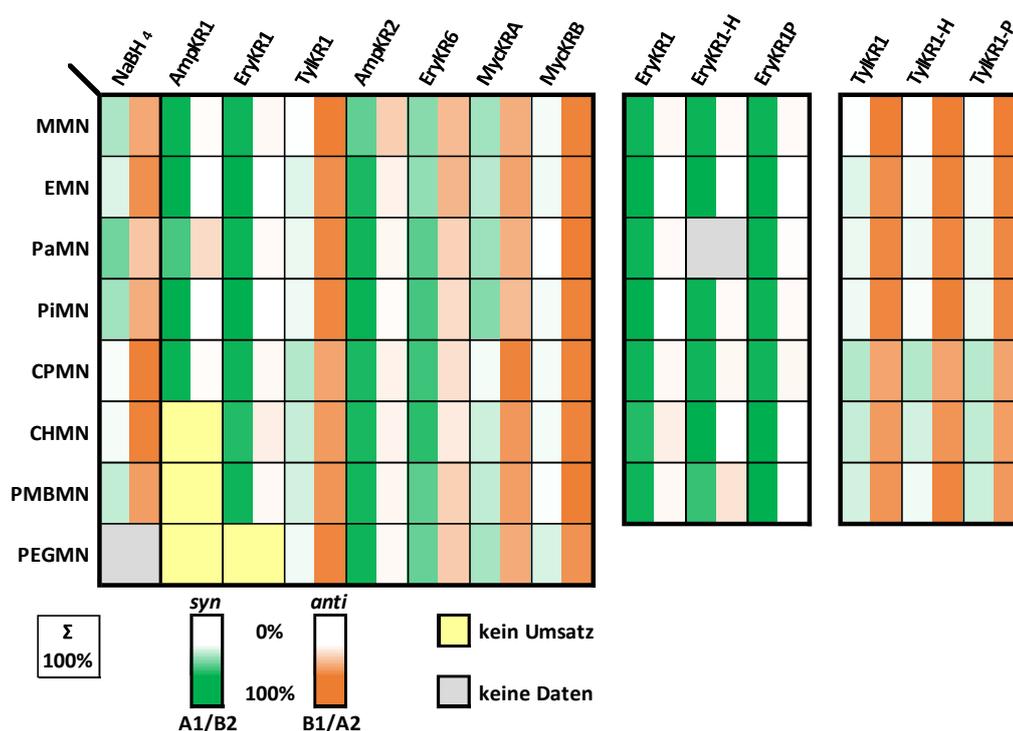
**Tabelle 3-29: Umsätze und Anteile der Enantiomerenpaare von  $\text{H-MPeMN}$  nach enzymatischer oder chemischer Reduktion von  $\text{H-MPeMN}$ .**

Enzym	Umsatz <sup>a</sup>	Enantiomerenpaare <sup>a</sup> [%]			
		1	2	3	4
AmpKR1	5%	0	100	0	0
EryKR1	7%	25	38	38	0
TylKR1	85%	14	86	0	0
AmpKR2	90%	97	0	0	3
EryKR6	41%	76	18	0	6
MycKRA	54%	24	19	38	19
MycKRB	76%	0	57	43	0
EryKR1-H	3%	0	100	0	0
EryKR1-P	28%	0	100	0	0
TylKR1-H	82%	5	89	6	0
TylKR1-P	82%	15	80	5	0
NaBH <sub>4</sub>	70% <sup>b</sup>	16	0	42	42

<sup>a</sup> UPLC/MS; <sup>b</sup> Ausbeute<sup>[110]</sup>. Das EP 1 besitzt die niedrigste Retentionszeit (Abbildung 8-32, S. 312).

### 3.7.9 Zusammenfassung der Enzymaktivitätstests

Die Ergebnisse der Enzymaktivitätstests zeigen, dass die untersuchten KR-Domänen übergreifende Tendenzen mit Bezug auf die Stereoselektivität bei unterschiedlichen Substraten besitzen. Mit Hinblick auf die verschiedenen Typen der KRs zeigen sich diese Tendenzen in Domänen-spezifischer Weise. Eine Übersicht der Diastereomeren- und der Enantiomerenverteilungen für alle Enzym-Substrat-Kombinationen befindet sich in den Abbildung 3-31 (S. 104) und Abbildung 3-32 (S. 105).



**Abbildung 3-31:** Alle Enzym-Substrat-Kombinationen mit Diastereomerenanteile im Reduktionsprodukt. Die Daten für die chemische Reduktion sind in Tabelle 8-5 (S. 309) aufgeführt.

Die Domäne EryKR1 zeigte für die untersuchten Substrate eine hohe spezifische Stereoselektivität und hinterlässt beinahe ausschließlich das 2L3D-Motiv des B2-Typs ( $\geq 94\%$  *de*,  $\geq 99\%$  *ee*). Die Hauptprodukte der Reduktion durch TylKR1 entsprachen mit einer hohen Selektivität der Konfiguration des B1-Typs (2D3D,  $\geq 94\%$  *ee*). Moderate Stereoselektivität fanden sich bei den Reduktionen durch AmpKR2, wobei die erhaltenen Hauptisomere linearer Substrate die 2D3L-Konfiguration (A1-Typ,  $\geq 80\%$  *de*,  $\geq 84\%$  *ee*) besaßen.  $\kappa$ -MMN scheint zu klein für eine spezifische Positionierung in den aktiven Zentren von TylKR1 und AmpKR2 gewesen zu sein, wodurch im Fall von TylKR1 ein anderes Hauptisomer (2L3L, 98% *de*, 40% *ee*) und für AmpKR2 niedrige Selektivitäten resultierten. Dies wurde für

TylKR1 bereits von KEATINGE-CLAY *et al.* und LÜDEKE *et al.* beschrieben (Kapitel XX, Abbildung, S. XX).<sup>[57,58]</sup> AmpKR1 zeigte zwar hohe Selektivitäten, aber nicht die in der Literatur beschriebene 2L3L-Konfiguration des A2-Typs, sondern 2L3D-Motiv (B2). Zusammen mit den sehr niedrigen Umsatzraten kann allerdings von einer fehlerhaften Rückfaltung ausgegangen werden.

Die A1-Typ EryKR6 besaß im Gegensatz zu den bisher genannten Domänen nur geringe Selektivitäten, welche abhängig vom Substrat unterschiedliche Konfigurationen erzeugten (5 bis 78% *de*, 10 bis  $\geq 99\%$  *ee*). Auffällig war bei den drei Domänen TylKR1, AmpKR2 und EryKR6, dass auch 2L3D-konfigurierte Isomere (B2) gebildet wurden und dies vor allem bei den Substraten  $\kappa$ -CPMN und  $\kappa$ -CHMN. EryKR6 zeigte bei diesen beiden Substraten die höchsten Selektivitäten (2L3D,  $\geq 52\%$  *de*,  $\geq 94\%$  *ee*). Die sterisch-anspruchsvollen, tertiären Strukturen in  $\kappa$ -CPMN und  $\kappa$ -CHMN direkt neben dem zu reduzierenden Keton scheinen einen Einfluss auf die Interaktion der Aminosäuren nahe dem aktiven Zentrum zu haben und einhergehend die bevorzugte Substratorientierung zu beeinflussen.

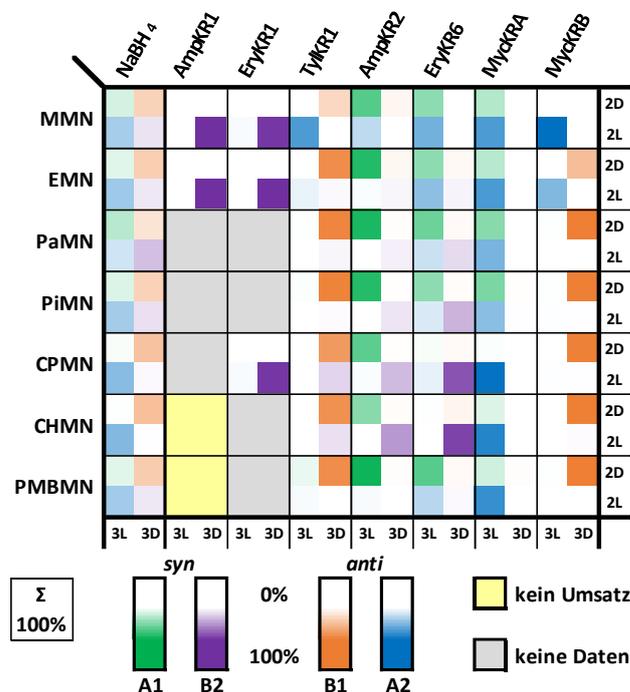


Abbildung 3-32: Alle Enzym-Substrat-Kombinationen mit der Stereoisomerenanteile im Reduktionsprodukt.

Die Daten für die chemische Reduktion sind in Tabelle 8-5 (S. 309) aufgeführt.

MycKRA reduzierte in der entsprechenden Biosynthese nur  $\alpha$ -unverzweigte Substrate zu 3L-Produkten (A0). Die untersuchten  $\alpha$ -methylierten Substrate positionierten sich entsprechend vorzugsweise in der A-Typ-Orientierung ( $\geq 98\%$ ). Da MycKRA in der Biosynthese evolutionär nicht auf  $\alpha$ -methylierten Polyketidketten selektiert wurde, besitzt diese Domäne bei den meisten Substraten keine hohen Diastereoselektivität (4 bis 60% *de*). Die Enantioselektivität war über alle Substrate hinweg hoch ( $\geq 96\%$  *ee*).

MycKRB hingegen besaß insgesamt eine hohe Stereoselektivität (88% *de*,  $\geq 98\%$  *ee*). Die Konfiguration des Produkts war dabei abhängig vom Substrat. Ist das Substrat klein, wie  $\kappa$ -MMN, so entstand das 2L3L-Enantiomer (A2,  $\geq 99\%$  *ee*). Bei Substraten ab einer Größe entsprechend dem Substrat  $\kappa$ -PaMN drehte sich die Orientierung im aktiven Zentrum offensichtlich um und es wurde das 2D3D-Motiv installiert (B1,  $\geq 98\%$  *ee*).  $\kappa$ -EMN liegt in diesem Größenvergleich dazwischen und das Produktgemisch enthält das B1- und A2-Enantiomer im Verhältnis 1:1. Die Konfiguration des B2-Typs, zu welchem MycKRB ebenfalls zählt, wurde bei keinem Produkt gefunden.

Die untersuchten KR-Domänen zeigten für viele Enzym-Substrat-Kombinationen hohe Selektivitäten. Die höchsten Stereoselektivitäten waren bei den Kombinationen zu finden, bei denen das Surrogat dem natürlichen Substrat sehr ähnlich war. Damit einher gingen meist ebenfalls hohe relative Aktivitäten, die zu hohen Umsätzen führten. Gleichzeitig besaßen alle Domänen eine breite Akzeptanz für die getesteten SNAC-Derivate, auch wenn in einigen Fällen die Umsätze und Selektivitäten niedrig ausfielen. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die KR-Domänen generell fähig sind ein breites Spektrum an Substraten umzusetzen. Je strukturell näher diese dem natürlichen Substrat waren, desto höher waren Aktivität und Stereoselektivität der KR-Domäne. Umsetzungen von nicht-natürlichen Substraten konnten teilweise ebenfalls hohe Stereoselektivitäten aufzeigen. Die resultierende Produktkonfiguration zeigte in diesen Fällen teilweise eine veränderte Substratorientierung an.

Eine der wichtigsten Einflussgrößen für die Stereoselektivität in PKS-Systemen bleibt weiterhin die Interaktion zwischen der ACP und der KR (Schema 1-8, S. 11).<sup>[63]</sup> Allerdings unterstützt auch die Struktur des Substrats zusammen mit der Umgebung der aktiven

---

Tasche die Interaktion und kann ohne dirigierende ACP ebenfalls zu hohen Selektivitäten führen, wie in den vorliegenden Studien erfolgreich gezeigt werden konnte. Die evolutionären Anpassungen der KR-Domänen erfolgten demnach jeweils spezifisch für ein Hauptisomer innerhalb der Biosynthesen.

## 4. Zusammenfassung

Ausgangspunkt für die vorliegenden Studien zu PKS-Ketoreduktase-Domänen waren die  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -methyl-Strukturelemente verschiedener Polyketid-Naturstoffe. Über mehrere Validierungsstufen wurde eine Auswahl von Ketoreduktase-Domänen getroffen, die das Spektrum reduktionsaktiver Ketoreduktase-Typen abdeckte und Domänen früher, wie auch später Module umfasste (Tabelle 4-1, S. 108). Die MS/MS-Proteinidentifizierung bestätigte anschließend die erfolgreiche Genexpression und Isolierung der korrekten Proteindomänen. Insgesamt standen somit sieben rekombinante KR-Domänen mit insgesamt elf Derivaten für die Enzymaktivitätstests zur Verfügung.

**Tabelle 4-1: Einbezogene Ketoreduktase-Domänen mit natürlicher Produktkonfiguration.**<sup>[6,22,26,30,60,90,91]</sup>

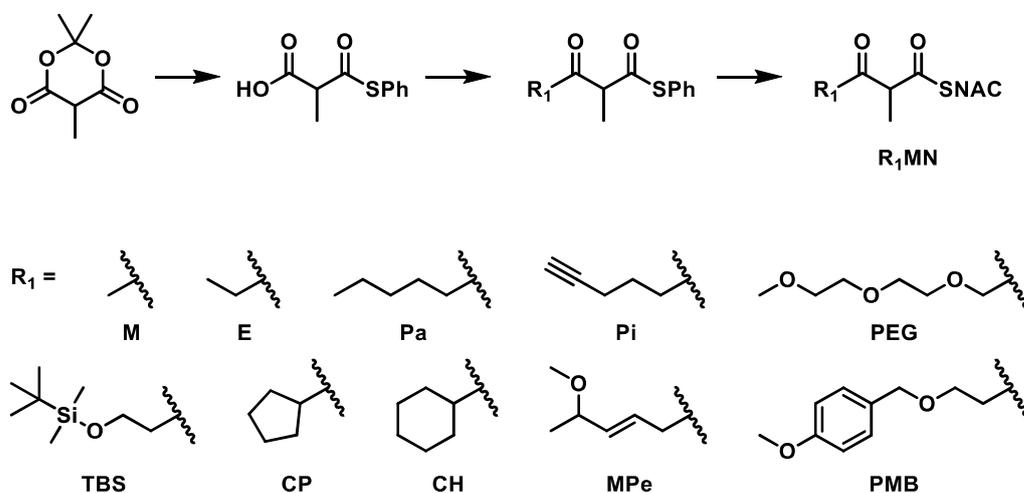
KR-Typ	A0 3L	A1 2D3L	A2 2L3L	B0 3D	B1 2D3D	B2 2L3D
<b>frühes Modul</b>	MycKRA <sup>a</sup>	AmpKR2	AmpKR1	-	TyIKR1	EryKR1 MycKRB <sup>a</sup>
<b>spätes Modul</b>	MycKRA <sup>a</sup>	EryKR6	-	-	-	MycKRB <sup>a</sup>

<sup>a</sup> ist in mehreren PKS-Modulen der Mycolacton-Biosynthese vorhanden.

Die für die Studien benötigten  $\beta$ -Keto- $\alpha$ -methyl-Substrate sollten über eine Route mit möglichst direktem Zugang zu einem breiten Spektrum an Derivaten dargestellt werden. Die effektivste der untersuchten Synthesestrategien basiert im Schlüsselschritt auf einer decarboxylativen CLAISEN-Kondensation nach MASAMUNE *et al.*<sup>[109]</sup> Diese biomimetische Synthesestrategie ermöglichte die Darstellung verschiedener Derivate auf der vorletzten Stufe (Schema 4-1, S. 109). Insgesamt waren 14  $\beta$ -Keto- $\alpha$ -methyl-Derivate zugänglich, wobei der Fokus auf den SNAC-Thioestern lag.

Der nächste Schritt beinhaltete die Etablierung eines geeigneten photometrischen Messverfahrens für die Reaktionsverfolgung. Diese erfolgte über den NADPH-Verbrauch während der enzymatischen Reduktion. Zur Validierung dieser Methode wurden die Versuche zu einer Reihe an KR-Domänen von WEISSMAN *et al.* erfolgreich reproduziert.<sup>[147]</sup>

Hierauf basierend, wurden die relativen Aktivitäten für alle Enzym-Substrat-Kombinationen ermittelt und weiterführend die Reduktionsprodukte auf den Umsatz und die Konfiguration des  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -methyl-Motivs hin untersucht (Abbildung 4-1, S. 110).



**Schema 4-1: Finale Synthesestrategie mit decarboxylativer CLAISEN-Kondensation im zweiten Schritt.**

Die Ketoreduktase-Domänen mit den höchsten relativen Aktivitäten über das gesamte SNAC-Substratspektrum waren TylKR1, AmpKR2, sowie MycKRA. Die anderen Domänen zeigten eine stärker ausgeprägte substratabhängige Reduktionsaktivität. Je strukturell näher das Surrogat allerdings dem natürlichen Substrat war, desto höher waren die Aktivität und die Stereoselektivität. EryKR1 reduzierte mit hoher relativer Aktivität die kleinen Substrate  $\kappa$ -MMN und  $\kappa$ -EMN. Wohingegen EryKR6 und MycKRB die höchsten Werte bei den etwas größeren, linearen Substraten  $\kappa$ -PaMN und  $\kappa$ -PiMN aufwiesen. Die absolute Produktkonfiguration wurde anschließend mittels einer Kombination aus NMR-Untersuchungen der  $\beta$ -Hydroxy-Reduktionsprodukte und der entsprechenden 9-AMA-Ester bestimmt.

Die Stereoselektivitäten der KR-Domänen waren insgesamt sehr hoch, jedoch teilweise auch abhängig von der betrachteten Enzym-Substrat-Kombination. Die Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum während der Katalyse ist dabei von zentraler Bedeutung. Je bevorzugter eine katalytisch aktive Orientierung eingenommen wird, desto stärker sollte dies in einer höheren Stereoselektivität resultieren. Mit den vorliegenden Ergebnissen konnten einerseits Studien von KEATINGE-CLAY, LÜDEKE und WEISSMAN reproduziert und bestätigen werden (Vergleiche Abbildung 1-5, S. 13, mit Abbildung 4-1, S. 110)<sup>[57-60]</sup> sowie andererseits das Spektrum an Enzym-Substrat-Kombinationen um Surrogate mit natürlichen und nicht-natürlichen Polyketidstrukturen vergrößert werden. Dabei zeigte

sich, je ähnlicher die Polyketidstruktur der Surrogate denen der natürlichen Substrate war, desto höher waren die Stereoselektivitäten. Die Produktkonfigurationen entsprachen hierbei den in der Natur vorkommenden. Nicht-natürliche Substrate führten teilweise zu einer Abkehr von diesen Konfigurationen.

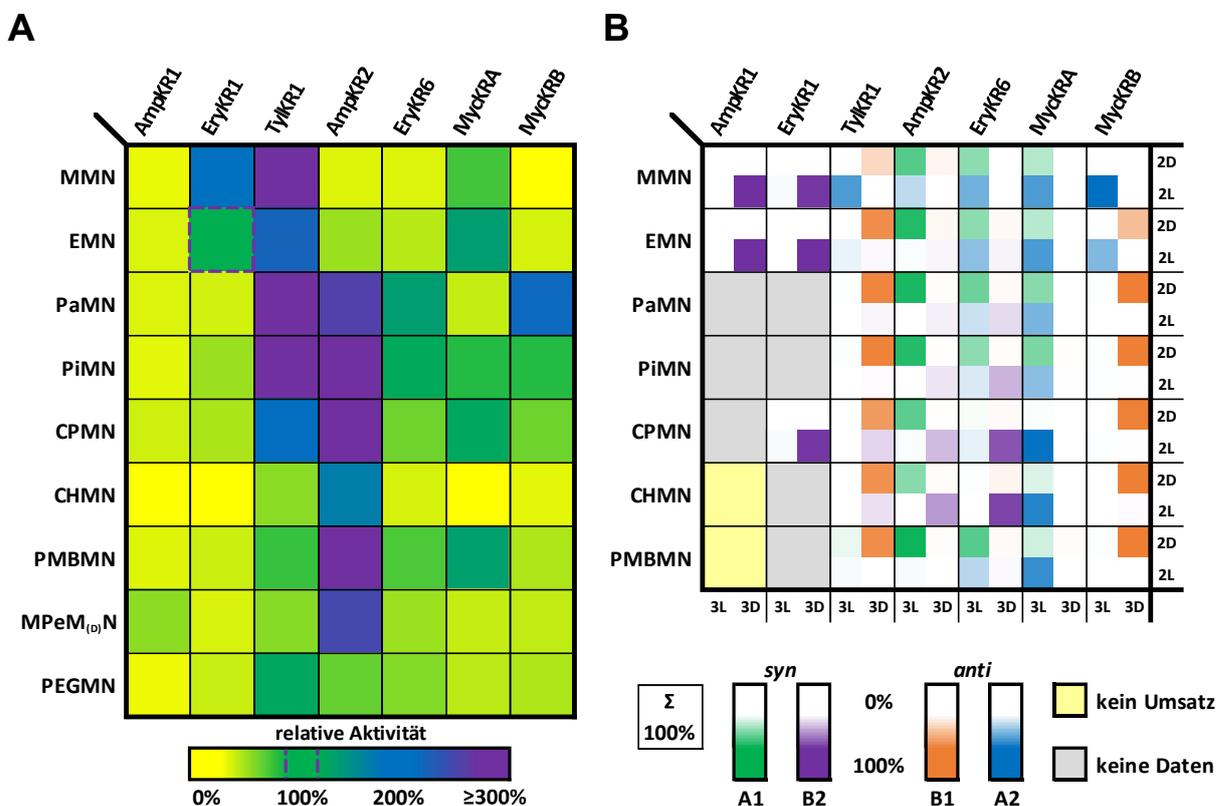


Abbildung 4-1: Übersicht aller Enzym-Substrat-Kombinationen mit SNAC-Derivaten.

A) Relative Aktivitäten (violett, gestrichelt: Bezugsmessung = 100%); B) Enantiomerenverteilungen der Produkte.

Die gezeigten, signifikanten Wirkungen von kleinen *tags*, wie z. B. His<sub>6</sub>, auf die Aktivität der Ketoreduktase-Domäne unterstreichen dabei, dass Interaktionen mit Distanz zum aktiven Zentrums ebenfalls Einfluss auf dieses nehmen können.

Unmittelbar relevant für die Stereoselektivität sind aber die Interaktion der KR mit anderen Domänen, insbesondere der ACP über Protein-Protein-Wechselwirkungen, und die Protein-Substrat-Wechselwirkungen. Ein erstmaliger Einblick in den Einfluss von nicht-natürlichen Substraten und Surrogaten bei KR-Domänen später PKS-Module konnte in dieser Arbeit gezeigt werden.

---

## Ausblick

Aufbauend auf dem in dieser Arbeit etablierten Zugang zu Ketoreduktase-Domänen, der Synthesestrategie und den Analysemethoden können in weiteren Studien komplexere Surrogate einbezogen werden. Solche sich den natürlichen Substraten annähernden Surrogate wurden vor allem bei Domänen aus späteren Modulen bisher nicht getestet.

Die Informationen aus diesen Studien sollen weitere Einblicke in die Interaktionsebenen der Ketoreduktase-Domänen liefern, wobei der Fokus bei rekombinanten Domänen auf die Substratstruktur und die direkten AS-Interaktionspartner liegt. Erweitert werden könnte dies unter Einbezug von isolierten ACPs und dem Aufzeigen von Unterschieden bei der Bindung von freien und ACP-gebundenen Substraten.

Weitere Ansätze liegen in strukturellen Studien zu Ketoreduktase-Domänen mittels Proteinkristallographie oder –NMR-Spektroskopie; vorzugsweise in Kombination mit einem Substrat oder Inhibitor. Die Verknüpfung der zusätzlichen Strukturdaten mit den Erkenntnissen aus den Enzymaktivitätstests kann die Basis für rationale Ansätze der gerichteten Mutagenese liefern, sodass Ketoreduktase-Domänen auf ein ausgewähltes Substrat und eine angestrebte Produktkonfiguration hin angepasst werden könnten.

Die möglichen Anwendungsgebiete des gerichteten Protein-*Engineerings* von modul-eingebundenen Domänen in PKS-Systemen erstrecken sich von der gezielten Herstellung von Feinchemikalien über die *in vitro* bis hin zur *in vivo* Darstellung von Polyketid-derivaten.

## 5. Summary

The starting point for the presented studies on PKS-ketoreductase domains were the structural  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -methyl elements of various natural polyketide compounds. A selection of ketoreductase domains was made over several validation stages, which covered the spectrum of reduction-active ketoreductase types and comprised domains earlier and later modules (Table 5-1, p. 112). The MS/MS protein identification confirmed the successful gene expression and isolation of the correct protein domains. In the end there were seven recombinant KR domains with a total number of eleven derivatives available for the enzyme activity tests.

**Table 5-1: Included ketoreductase domains with the configuration of the natural product.**<sup>[6,22,26,30,60,90,91]</sup>

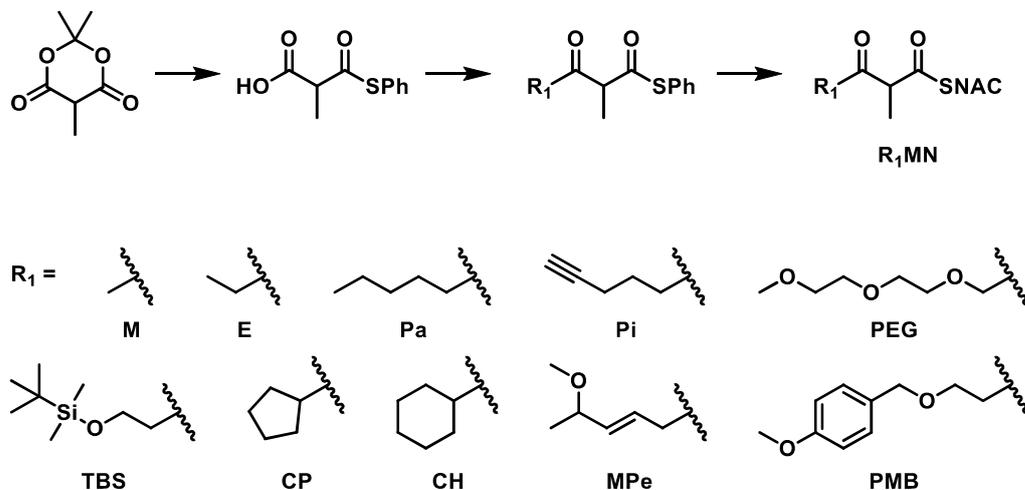
<b>KR-type</b>	<b>A0 3L</b>	<b>A1 2D3L</b>	<b>A2 2L3L</b>	<b>B0 3D</b>	<b>B1 2D3D</b>	<b>B2 2L3D</b>
<b>early modul</b>	MycKRA <sup>a</sup>	AmpKR2	AmpKR1	-	TyIKR1	EryKR1 MycKRB <sup>a</sup>
<b>late modul</b>	MycKRA <sup>a</sup>	EryKR6	-	-	-	MycKRB <sup>a</sup>

<sup>a</sup> is present in several PKS-modules of the mycolacton biosynthesis.

The  $\beta$ -keto- $\alpha$ -methyl substrates required for the studies were planned to be synthesized by a route with direct access to a wide range of derivatives. The most effective of the investigated synthetic strategies is based on a decarboxylative CLAISEN condensation according to MASAMUNE *et al.* as the key step.<sup>[109]</sup> This biomimetic synthesis strategy enabled the synthesis of various derivatives at the second to last stage (Scheme 5-1, p. 113). In total 14  $\beta$ -keto- $\alpha$ -methyl derivatives were accessible, the focus being on the SNAC thioesters.

The next step included the establishment of a suitable photometric measurement method for reaction monitoring. This was done via the NADPH consumption during the enzymatic reduction. A number of experiments by WEISSMAN *et al.* were successfully reproduced to validate this method.<sup>[147]</sup> Based on this, the relative activities of all enzyme-substrate-

combinations were determined and the reduction products were further examined for the conversion and the configuration of the  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -methyl motif (Figure 5-1, p. 114).



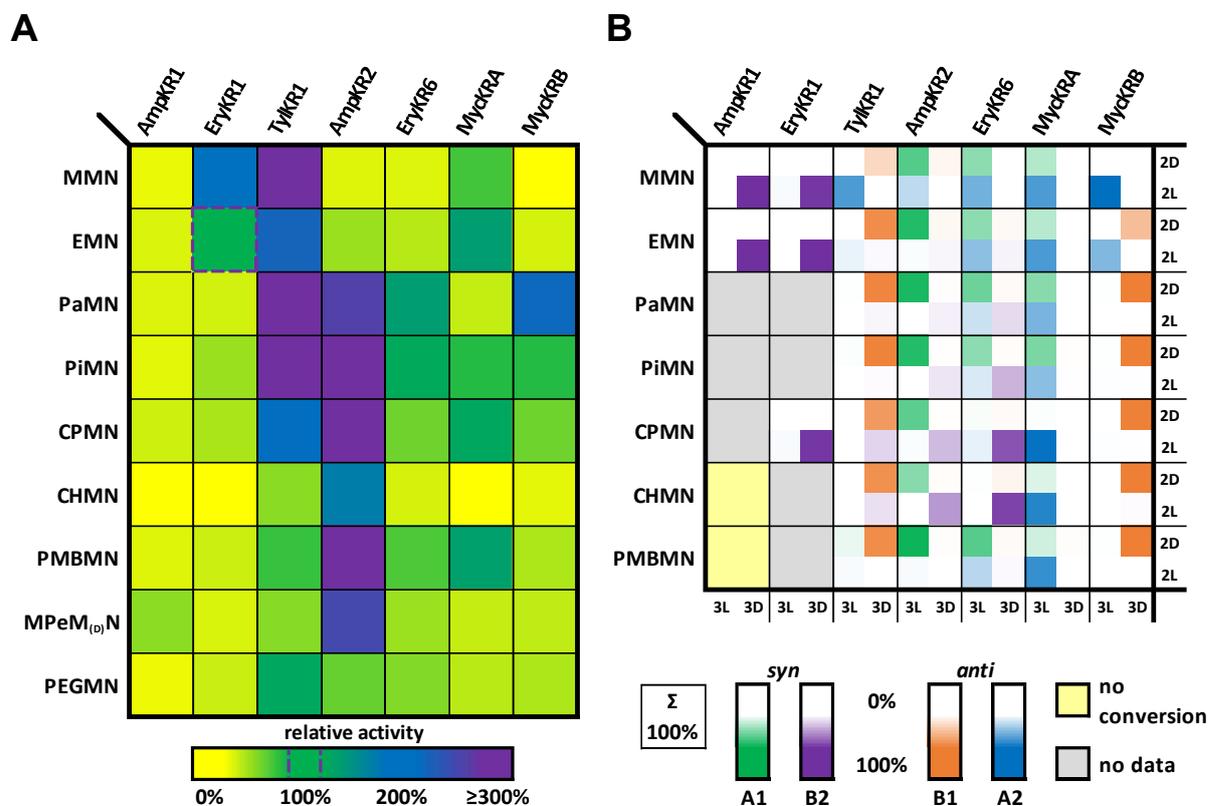
**Scheme 5-1: Final synthesis strategy with the decarboxylative CLAISEN condensation in the second step.**

The ketoreductase domains with the highest relative activities throughout the entire SNAC substrate spectrum were TylKR1, AmpKR2 and MycKRA. The other domains showed a more pronounced substrate-dependent reduction activity.

However, the closer the surrogate's structure to the natural substrate, the higher its activity and stereoselectivity. EryKR1 reduced the small substrates  $\kappa$ -MMN and  $\kappa$ -EMN with high relative activity. Whereas EryKR6 and MycKRB had the highest values for the larger, linear substrates  $\kappa$ -PaMN and  $\kappa$ -PiMN. The absolute product configuration was then determined using a combination of NMR studies of the  $\beta$ -hydroxy reduction products and the corresponding 9-AMA esters.

The stereoselectivities of the KR domains were overall very high, but also dependent on the enzyme-substrate combination considered. The orientation of the substrate in the active site during catalysis is of central importance. The more preferred a catalytically active orientation is, the more should this result in a higher stereoselectivity. On the one hand, the present results could reproduce and confirm the studies of KEATINGE-CLAY, LÜDEKE and WEISSMAN (see Figure 1-5, p. 13, and Figure 5-1, p. 114).<sup>[57-60]</sup> On the other hand, the spectrum of enzyme-substrate-combinations with surrogates with natural and non-natural polyketide structures could be enlarged. It was shown that the more similar the polyketide structure of the surrogates was to that of the natural substrates, the higher was the stereoselectivities. The product configurations in those cases corresponded to the ones

found in nature. Non-natural substrates led, in part, to a shift away from these configurations.



**Figure 5-1: Overview of all enzyme-substrate-combinations with SNAC derivatives.**

A) Relative activities (purple, dashed: reference = 100%); B) Enantiomeric distributions of the products.

The shown, significant effects of small tags, e.g. His<sub>6</sub>, on the activity of the ketoreductase domain underline that even distant interactions can have an influence on the active site. However, the interaction of the KR with other domains, in particular the ACP via protein-protein-interactions, and the protein-substrate-interactions are directly relevant for stereoselectivity. Within this work a first insight into the influence of non-natural substrates and surrogates on KR domains of late PKS modules could be shown.

---

## Outlook

Building on the established access to ketoreductase domains, the synthesis strategy and the analysis methods, more complex surrogates can be included in further studies. Such surrogates, which are close to the natural substrates, have not been tested so far, especially for domains of later modules.

The information from these studies should provide further insights into the interaction levels of ketoreductase domains, focusing on recombinant domains on the substrate structure and the direct AS-interaction partners. This could be expanded to include isolated ACPs and show differences in the binding of free and ACP-bound substrates.

Further approaches lie in structural studies of ketoreductase domains using protein crystallography or protein NMR spectroscopy, preferably in combination with a substrate or inhibitor. The combination of the additional structural data with the findings of the enzyme activity assays may provide the basis for rational approaches to site-directed mutagenesis, so that ketoreductase domains could be adapted to a selected substrate and a desired product configuration.

The possible areas of application for directed protein engineering of module-integrated domains in PKS systems range from the production of fine chemicals to *in vitro* and *in vivo* synthesis of polyketide derivatives.

## 6. Experimenteller Teil

### 6.1 Materialien und Geräte

**Tabelle 6-1: Zum Einsatz gekommener Geräte inklusive Bezugsquellen.**

Geräte	Bezugsquelle
Analysenwaage AES-200-4C	Kern®
Chemie-Membranpumpe VP-100C	Vacuubrand
Chromatographiesystem ÄKTA PURE 25 PROTEIN PURIFICATION SYSTEM, Probenschlaufe 50 mL SUPERLOOP; Säule HISTRAP FF 5 mL, UV-Detektor U9-L, Leitfähigkeitsdetektor C9, Fraktionensammler F-9R, Kühlzelle UNICHROMAT 900 (15 °C, UNIEQUIP), Software UNICORN 6.3	GE Healthcare
Chromatographiesystem WATERS ACQUITY™ UPLC®, BEH C18 Säulen Partikelgr. 1.7 µm, Durchm. 2.1 µm, Länge 50 mm; Single Quadrupole Massenspektrometer, Stickstoffgenerator NMG 11 (CMC INSTRUMENTS)	Waters
Digitalwaage HAT-3000	A&D
Drehschieberpumpe RZ 6 mit Vakuummessgerät DCP-3000 + Sensor VSP-3000	Vacuubrand
Elektrophoresespannungsquelle peqPOWER 300	PeqLab
Elektrophoresesystem (horiz.) PERFECTBLUE™, Midi S	PeqLab
Elektrophoresesystem (horiz.) PERFECTBLUE™, Mini M	PeqLab
Elektrophoresesystem (horiz.) PERFECTBLUE™, Mini S	PeqLab
Elektrophoresesystem (vertik.) PERFECTBLUE™, Twin M	PeqLab
Gefrierschrank (-20 °C) GNP 2666-20	Liebherr
Geldokumentationsanlage Gel iX 20 IMAGER	Intas
Geldokumentationsanlage LTF Labortechnik	LTF Labortechnik
Inkubationsschüttler MAXQ 6000	ThermoFisher Scientific
Kühlzelle TECTOCELL COMPACT, KÜBA DFAE 031 (4 °C)	Viessmann / Kelvion
Laborabzug VARIOLAB MOBILIEN W90	Waldner
Labor-Kühl-Gefrierkombination (ex-geschützt) LCExV 4010	Liebherr
Laborreinigungs- und Desinfektionsautomat PG 8583	Miele
Magnetrührer HEI-STANDARD	Heidolph
Magnetrührer HEI-TEC, Temperaturfühler PT-1000	Heidolph
Magnetrührer RCT <i>basic</i>	IKA
12-Mehrkanal-Pipette	Braun
Mikroplattenlesegerät VARIOSKAN™ LUX	ThermoFisher Scientific

<b>Geräte</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Mikrowelle R322STWE	Sharp
Minizentrifuge SPROUT®	Sprout®
PCR-/Thermo-Cycler peqSTAR	PeqLab
pH-Meter LAB 855	SI Analytics
Pipetten Pipetman® Classic	Gilson
Pipetten Research® Plus	Eppendorf
Pipettierhilfe PIPETUS®	Hirschmann
Präzisionswaage EW-200-3NM	Kern®
Rotationsverdampfer HEI-VAP PRECISION ML/G3	Heidolph
Schlenk-Linie	Goldmann
Schüttler RS-VA 10	Phoenix Instrument
Schüttler VORTEX-GENIE 2	Scientific Industries
Sicherheitswerkbank MSC ADVANTAGE 1.8	ThermoFisher Scientific
Standautoklav VX-65	Systemc
Sterilfiltrationsanlage MILLIPORE® XX1504700	Merck
THERMOMIXER® C, SMARTBLOCK™ 24× 1.5 mL, Deckel	Eppendorf
Ultraschallbad SONOREX RK 106	Bandelin
Ultraschall-Homogenisator SONOPLUS HD 3100, Sondenspitze MS-73, Lärmschutzbox LS 8	Bandelin
Ultratiefkühlschrank (-80 °C) U410	Eppendorf
Vakuumkonzentrator CONCENTRATOR PLUS, Rotor F45-48-11, Rotor F-35-6-30	Eppendorf
Vakuumpumpe Rotavac Valve Control	Heidolph
Vakuumpumpe SOGEVAC SV40 BI	Leybold
Wärmeschrank U-SEIRE UN160	Memmert
Wippschüttler RK-1D	Witeg
Zelldichte-Messgerät ULTROSPEC™ 10 Cell	GE Healthcare
Zentrifuge CENTRIFUGE 5804 R, Rotor FA-45-6-30, Rotor S-4-72	Eppendorf
Zentrifuge MICRO STAR 17R, Mikrozentrifugenrotor 75003424	ThermoFisher Scientific

Tabelle 6-2: Verwendete Materialien.

Materialien	Bezugsquelle
µDROP™ Platte für Plattenlesegerät	ThermoFisher Scientific
96er Mikrotiterplatten F für Plattenlesegerät	Sarstedt
Analysengefäße für die Massenspektrometrie SF/label (1.5 mL)	Macherney-Nagel
AMICON® Ultra 15 mL Zentrifugenfilter (MWCO: 10000 kDa und 30000 kDa)	Merck
CRYOPURE Röhrchen (2 mL)	Sarstedt
Desinfektionslösung SPITACID	EcoLab®
Dialysegefäße (2/3/5 L)	VitLab®
Dialysemembran MEMBRA-CEL® (MWCO 14000 kDa)	Carl Roth
DURAN® Glasflaschen (25/50/100/250/500/1000 mL)	Schott
DURAN® Kultivierkolben mit/ohne Spirale (50/250/500 mL)	Schott
DURAN® Glaskolben (5/10/50/100 mL), Bechergläser (50/100 mL)	Lenz Laborglas
Einmalspritzen INJEKT® F Tuberkulin (1 mL)	Braun
Einmalspritzen INJEKT® Luer Solo (2/5/10/20 mL)	Braun
Halbmikro Einmal-Küvetten (1.5 mL)	Brand
Indikatorpapier Spezialindikator (pH 6.5-10 und pH 4-7)	Merck
Membranfilter Cellulosenitrat WHATMAN™ (0.45 µm)	GE Healthcare
Messzylinder (50/100/250/1000 mL)	Isolab Laborgeräte
Molekularsieb (3 Å)	Grüssing
Ni-NTA-Affinitätschromatographie-Säulen HisTrap FF 5 mL	GE Healthcare
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit	Macherney-Nagel
Orange-Gel	Grüssing
Pasteurpipetten (150/230 mm)	Brand
PCR-Reaktionsgefäß MULTIPLY®-PRO (0.2 mL)	Sarstedt
Petrischalen	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0.5/1.5/2 mL)	Sarstedt
Reaktionsgefäße CELLSTAR® TUBES (15/50 mL)	Greiner Bio-One
Sequenzier-Kit MIX2SEQ	Eurofins Genomics
Serologische Pipetten (10/25 mL)	Sarstedt
Spritzenfilter CHROMAFIL® O-20/15 MS (0.20 µm)	Macherney-Nagel
Spritzenfilter CHROMAFIL® XTRA PTFE-45/13 (0.45 µm)	Macherney-Nagel
Spritzenfilter ROTILABO® CA, steril (0.45 µm)	Carl Roth
Spritzenkanülen STERICAN® (0.6 x 80 mm, 0.6 x 30 mm, 0.8 x 50 mm, 0.8 x 120 mm, 0.4 x 20 mm, 0.9 x 0.4 mm)	Braun

## 6.2 Stämme, Plasmide, Gene und rekombinante Proteine

### 6.2.1 Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme wurden kommerziell erworben (s. Tabelle 6-3), in Eigenproduktion vermehrt und zu transformationskompetenten Bakterien überführt (Kapitel 6.3.4, S. 128). Die Plasmidpräparation wurde mit dem *E. coli* TOP10 durchgeführt. Die Expression der verwendeten Gene erfolgte im *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3).

Tabelle 6-3: Verwendeten Bakterienstämme.

E. coli Stamm	Genotyp	Resistenz	Bezugsquelle
One Shot® TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> -( <i>strR</i> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i> $\lambda$ -	Str <sup>R</sup>	INVITROGEN™
BL21™ (DE3)	F- <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> ( <i>rB-mB</i> -) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3) [= <i>lacI</i> <i>lacUV5-T7</i> <i>gene1</i> <i>ind1</i> <i>sam7</i> <i>nin5</i> ]	-	NOVAGEN™

### 6.2.2 Plasmide

Tabelle 6-4: Relevante Plasmide, die als Ausgangs- oder Zielvektor dienen.

Plasmid	Eigenschaften	Resistenz	Größe	Bezugsquelle
pET28a(+)	pBR322-Ursprung, Thrombinspaltsequenz, MCS, Tags: 5'-His6, 3'-His6	Kan <sup>R</sup>	5369 bp	unbekannt
pUC57	pBR322-Ursprung	Kan <sup>R</sup>	2710 bp	Genewiz
pMK	pUC57-Derivat	Kan <sup>R</sup>	2393 bp	Genewiz

Tabelle 6-5: Kommerziell erhaltene oder durch Klonierung erzeugte Plasmide. CH/CP: tag-Zusatz, CH: 3'-His6, CP: 3'-Pro5.

Plasmid	Größe [bp]	Gen	Größe [bp]	tag
pET28a(+)_ambKR6_CP <sup>a</sup>	6641	ambKR6	1377	5'-His6, 3'-Pro5
pUC57_ampKR1 <sup>b</sup>	-	ampKR1	1461	-
pET28a(+)_ampKR1 <sup>c</sup>	6794	ampKR1	1527	5'-His6
pET28a(+)_ampKR1_CH <sup>c</sup>	6793	ampKR1_CH	1587	5'-His6, 3'-His6
pET28a(+)_ampKR1_CP <sup>c</sup>	6791	ampKR1_CP	1599	5'-His6, 3'-Pro5
pMK_ampKR2 <sup>b</sup>	-	ampKR2	1425	-
pET28a(+)_ampKR2 <sup>d</sup>	6758	ampKR2	1491	5'-His6
pMK_eryKR1 <sup>b</sup>	-	eryKR1	1460	-
pET28a(+)_eryKR1 <sup>c</sup>	6791	eryKR1	1524	5'-His6
pET28a(+)_eryKR1_CH <sup>c</sup>	6790	eryKR1_CH	1584	5'-His6, 3'-His6
pET28a(+)_eryKR1_CP <sup>d</sup>	6788	eryKR1_CP	1596	5'-His6, 3'-Pro5
pMK_eryKR6 <sup>b</sup>	-	eryKR6	1356	-
pET28a(+)_eryKR6 <sup>c</sup>	6689	eryKR6	1422	5'-His6
pMK_mycKRA <sup>b</sup>	-	mycKRA	1557	-
pET28a(+)_mycKRA <sup>c</sup>	6890	mycKRA	1623	5'-His6
pMK_mycKRB <sup>b</sup>	-	mycKRB	1557	-
pET28a(+)_mycKRB <sup>c</sup>	6890	mycKRB	1623	5'-His6
pMK_tyIKR1 <sup>b</sup>	-	tyIKR1	1469	-
pET28a(+)_tyIKR1 <sup>c</sup>	6800	tyIKR1	1533	5'-His6
pET28a(+)_tyIKR1_CH <sup>c</sup>	6799	tyIKR1_CH	1593	5'-His6, 3'-His6
pET28a(+)_tyIKR1_CP <sup>a</sup>	6797	tyIKR1_CP	1605	5'-His6, 3'-Pro5

Erstellt von: <sup>a</sup> Timm Ensfelder; <sup>b</sup> GENEWIZ; <sup>c</sup> Marius Schröder; <sup>d</sup> Franziska Hemmerling

## 6.2.3 Rekombinante Proteine

Tabelle 6-6: Rekombinante Ketoreduktase Domänen mit einer Auswahl an Eigenschaften.

Protein	tag	Größe [AS]	M [kDa]	pI <sup>a</sup>	Molarer Extinktions- koeffizient <sup>1</sup> [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
AmpKR1	N-His <sub>6</sub>	508	54.0	5.27	74940
AmpKR1_CH	N-His <sub>6</sub> , C-His <sub>6</sub>	528	56.2	5.47	74940
AmpKR1_CP	N-His <sub>6</sub> , C-Pro <sub>5</sub>	532	56.7	5.44	74940
AmpKR2	N-His <sub>6</sub>	496	51.3	5.31	59470
EryKR1	N-His <sub>6</sub>	507	53.2	5.23	69440
EryKR1_CH	N-His <sub>6</sub> , C-His <sub>6</sub>	527	55.4	5.46	69440
EryKR1_CP	N-His <sub>6</sub> , C-Pro <sub>5</sub>	531	55.9	5.42	69440
EryKR6	N-His <sub>6</sub>	473	49.3	5.63	55460
MycKRA	N-His <sub>6</sub>	540	57.3	5.45	89950
MycKRB	N-His <sub>6</sub>	540	57.7	6.23	47440
TyIKR1	N-His <sub>6</sub>	510	53.1	5.63	60960
TyIKR1_CH	N-His <sub>6</sub> , C-His <sub>6</sub>	530	55.3	5.85	60960
TyIKR1_CP	N-His <sub>6</sub> , C-Pro <sub>5</sub>	534	55.8	5.42	60960

<sup>a</sup> berechnet mit dem ProtParam Programm von ExPASy (2019).<sup>[153,154]</sup>

## 6.3 Molekularbiologische Arbeiten

### 6.3.1 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragments wird die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. Die Spezifität wird durch DNA-Primer sichergestellt, die die Zielsequenz eingrenzen und als Ausgangspunkte für die Vervielfältigung durch die hitzebeständige DNA-Polymerase dienen. In jedem durchgeführten Zyklus von Denaturierung, Primerhybridisierung (*Annealing*) und Elongation werden zuvor dargestellte Fragmente ebenfalls als neue Matrizen für Primer und Polymerase verwendet, sodass es zu einer exponentiellen Amplifikation kommt.

#### Standard-PCR

Das Standard-Programm zur Amplifikation eines Zielgens ist in Tabelle 6-7 und die Zusammensetzung des hierfür zusammengestellten Ansatzes in Tabelle 6-8 (S. 123) aufgeführt. Die verwendeten Primer sind unter Tabelle 6-13 (S. 126) gelistet.

**Tabelle 6-7: Standard-PCR-Programm zur Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten.**

Schritt	Temperatur	Zeit
(1) Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
(2) Denaturierung	98 °C	15 s
(3) Annealing	primerspezifisch	30 s
(4) Elongation	72 °C	30 s (30 s/ 1000 bp)
(5) Finale Elongation	72 °C	5 min
(6) Lagerung	4 °C	bis zur Entnahme
Schritt (2) - (4): 30 Zyklen		

**Tabelle 6-8: Probenzusammensetzung für die Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten.**

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Volumen</b>
5x Phusion-HF Puffer	1x	4.0 µL
dNTP-Mix (10 mM)	200 µM	0.4 µL
fwd-Primer (10 µM)	0.5 µM	1.0 µL
rev-Primer (10 µM)	0.5 µM	1.0 µL
DNA Template	-	0.1 µL
MPW	-	<i>ad</i> 20 µL
Phusion-HF DNA Polymerase (2 U/µL)	0.02 U/µL	0.2 µL

### **Gradienten-PCR**

Die für eine PCR verwendeten Primer besitzen je nach Sequenz unterschiedliche Hybridisierungs-/Annealing-Temperaturen. Zur Ermittlung einer praktikablen Annealing-Temperatur wird eine Gradienten-PCR durchgeführt. Diese erfolgt entsprechend dem Standard-Programm allerdings mit einem Temperaturgradienten über die Fläche des PCR-Heizblocks hinweg. Der Gradient wird über einen Temperaturbereich um eine simulierte Annealing-Temperatur untersucht.

### **Kolonie-PCR**

Die zu testenden Kolonien werden gepickt und ein Abstrich auf einer 2TY-Sicherungsplatte mit entsprechendem Selektionsmarker erstellt. Die restlichen Zellen der Kolonie werden in einen bereitgestellten PCR-Ansatz gegeben. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das verwendete PCR-Programm sind in den Tabelle 6-9 und Tabelle 6-10 (beide S. 124) aufgeführt.

Tabelle 6-9: Kolonie-PCR-Programm zur Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten.

Schritt	Temperatur	Zeit
(1) Initiale Denaturierung	98 °C	300 s
(2) Denaturierung	98 °C	30 s
(3) Annealing	primerspezifisch	30 s
(4) Elongation	72 °C	45 s (30 s / 1000 bp)
(5) Finale Elongation	72 °C	300 min
(6) Lagerung	4 °C	bis zur Entnahme
Schritt (2) - (4): 30 Zyklen		

Tabelle 6-10: Probenzusammensetzung zur Durchführung einer Kolonie-PCR.

Komponente	Endkonzentration	Volumen
10x FD Green Buffer	1x	1.0 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4.5 mM	1.6 µL
dNTP-Mix (10 mM)	200 µM	0.2 µL
fwd-Primer (10 µM)	0.5 µM	0.5 µL
rev-Primer (10 µM)	0.5 µM	0.5 µL
Bakterienkolonie	1x	-
MPW	-	ad 10 µL
Taq DNA Polymerase (1 U/µL)	0.02 U/µL	0.2 µL

### Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese (*Site-directed Mutagenesis*, SDM) ist eine PCR Methode, die durch die Wahl spezieller Primer die Einführung von regiospezifischen Mutationen ermöglicht. Mit der SDM können Insertionen, Deletionen und Substitutionen erzeugt werden, wobei die Größe des jeweiligen Bereichs nur durch die Stabilität der Primer und der Plasmidgröße limitiert ist. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das verwendete PCR-Programm sind in den Tabelle 6-11 und Tabelle 6-12 (beide S. 125) aufgeführt. Die verwendeten Primer sind unter Tabelle 6-13 (S. 126) gelistet.

Jeder 25 µL SDM-PCR-Ansatz wurde nach Abschluss des Hauptprogramms mit 1 µL Dpn I (1 U/µL, 37 °C, 1.5 h) versetzt, um das Template bakteriellen Ursprungs abzubauen.

Die Inaktivierung von Dpn I erfolgte bei 60 °C für 10 min. Die PCR-Produkte wurden ohne Reinigungsschritt direkt für eine Transformation mit TOP 10 eingesetzt.

**Tabelle 6-11: Mutagenese-PCR-Programm zur Einfügung einer Mutation in ein bestehendes Konstrukt.**

Schritt	Temperatur	Zeit
(1) Initiale Denaturierung	98 °C	2 min
(2) Denaturierung	98 °C	30 s
(3) Annealing	45   50   55   60 °C	30 s
(4) Elongation	72 °C	4 min (30 s / 1000 bp)
(5) Finale Elongation	72 °C	10 min
(6) Lagerung	4 °C	bis zur Entnahme
Schritt (2) - (4): 30 Zyklen		

**Tabelle 6-12: Probenzusammensetzung zur Einfügung einer Mutation in ein bestehendes Konstrukt.**

Komponente	Endkonzentration	Volumen
5x Phusion-HF Puffer	1x	5.0 µL
DMSO	-	1.25 µL
dNTP-Mix (10 mM)	200 µM	0.50 µL
fwd-Primer (10 µM)	0.5 µM	1.25 µL
rev-Primer (10 µM)	0.5 µM	1.25 µL
DNA Template	75-100 ng/µL	0.25 µL
MPW	-	<i>ad</i> 25 µL
Phusion-HF DNA Polymerase (2 U/µL)	0.02 U/µL	0.25 µL

### Verwendete Primer

Die Primer (1) bis (8) wurden für die Standard-PCR und Kolonie-PCR eingesetzt. Die Primer (9) und (10) wurden für die Sequenzierung oder für die Kolonie-PCR verwendet. Die Primer (11) bis (22) wurden für SDM genutzt. In der Tabelle 6-13 (S. 126) sind genutzte Restriktionsschnittstellen kursiv, genutzte Start- und Stoppcodons unterstrichen und die angestrebten Insertionen fett dargestellt.

**Tabelle 6-13: Verwendete Primer für Sequenzierung und die verwendeten PCR-Varianten.**

Nr.	Primerbezeichnung	[bp]	Sequenz (5' -> 3')
(1)	ambKR6_F	34	AAAAAACAT <u>ATG</u> CTGGGTCTGATGGTGAAGTGG
(2)	ambKR6_R	31	AAAAAGAATTCGATGCTGCACGACGTGCCG
(3)	ampKR1_F	27	AAAAAACAT <u>ATG</u> CCGGGCCTGGCCAG
(4)	ampKR1_R	27	AAAAAGAATTCGGCACGATCGGCCA
(5)	tylKR1_F	27	AAAAAACAT <u>ATG</u> AGCCCGACCGATGC
(6)	tylKR1_R	27	AAAAAGAATTCGCGGTCAGGGCTT
(7)	mycKRA_F	23	AAAAAACAT <u>ATG</u> GCCGAGAACG
(8)	mycKRA_R	23	AAAAAGAATTC <u>CTA</u> ACTTTTCG
(9)	pET28_Seq_fwd	20	TAATACGACTCACTATAGGG
(10)	pET28_Seq_rev	18	GCTAGTTATTGCTCAGCG
(11)	ampKR1_6583insTAA_F	29	GGCCGATCGTGCC <u>TAA</u> GAATTCGAGCTCC
(12)	ampKR1_6583insTAA_R	29	GGAGCTCGAATTC <u>TTA</u> GGCACGATCGGCC
(13)	ampKR1_6583insGC_F	28	GGCCGATCGTGCC <u>GCG</u> GAATTCGAGCTCC
(14)	ampKR1_6583insGC_R	28	GGAGCTCGAATTC <u>GCG</u> GGCACGATCGGCC
(15)	eryKR1_6592insTAA_F	33	GCTGCAGAACCTCGT <u>TAA</u> GAATTCGAGCTCCGT
(16)	eryKR1_6592insTAA_R	33	ACGGAGCTCGAATTC <u>TTA</u> ACGAGGTTCTGCAGC
(17)	eryKR1_6592insGC_F	32	GCTGCAGAACCTCGT <u>GCG</u> GAATTCGAGCTCCGT
(18)	eryKR1_6592insGC_R	32	ACGGAGCTCGAATTC <u>GCG</u> CACGAGGTTCTGCAGC
(19)	tylKR1_6601insTAA_F	31	AAGCCCTGACCGCAT <u>TAA</u> GAATTCGAGCTCCG
(20)	tylKR1_6601insTAA_R	31	CGGAGCTCGAATTC <u>TTA</u> TGCGGTCAGGGCTT
(21)	tylKR1_6601insGC_F	30	AAGCCCTGACCGCAG <u>GCG</u> GAATTCGAGCTCCG
(22)	tylKR1_6601insGC_R	30	CGGAGCTCGAATTC <u>GCG</u> TGCGGTCAGGGCTT

### 6.3.2 Restriktion von Plasmid-DNA

Die eingesetzten DNA-Fragmente und Zielvektoren werden mit dem in Tabelle 6-14 aufgeführten Ansatz der Restriktion unterzogen. Die Restriktionsansätze werden für 2 h bei 37 °C und 350 UpM im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Restriktionsenzyme durch eine Denaturierung bei 65 °C über 20 min inaktiviert.

**Tabelle 6-14: Zusammensetzung des Restriktionsansatzes.**

Komponente	Endkonzentration	Volumen
Vektor   Insert	~ 50 ng/μL   ~ 10 ng/μL	angepasst
10x FD Puffer	1x	6.0 μL
FD <i>EcoRI</i> (1 U/μL)	0.025 U/μL	1.5 μL
FD <i>NdeI</i> (1 U/μL)	0.025 U/μL	1.5 μL
MPW	-	ad 60 μL

Die Überprüfung erfolgt mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 6.3.10, S. 131). Der verbleibende Teil der Proben wurde mit Hilfe des NUCLEOSPIN® GEL AND PCR CLEAN-UP Kits (MACHEREY-NAGEL; Kapitel 6.3.7, S. 130) und die linearisierten Fragmente isoliert. Die erhaltenen DNA-Fragmente werden bei -20 °C gelagert oder direkt für weitere Schritte eingesetzt.

### 6.3.3 Ligation von linearisierter DNA

Die Ligation von linearisiertem Zielvektor und linearisierten Insert-Fragmenten erfolgt bei Raumtemperatur über drei Stunden hinweg. Der entsprechende Ansatz ist in Tabelle 6-15 aufgeführt.

**Tabelle 6-15: Zusammensetzung des Ligationsansatzes.**

Komponente	Endkonzentration	Volumen
Vektor	5.0 ng/μL	angepasst
Insert	5x molarer Überschuss	angepasst
10x T4 Ligasepuffer	1x	2.0 μL
T4 DNA-Ligase (5 U/μL)	0.05 U/μL	0.2 μL
MPW	-	ad 20 μL

### 6.3.4 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen

2TY-Medium	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Natriumchlorid
Kompetenzpuffer I	50 mM Calciumchlorid, 10 mM Kaliumacetat, pH 6.2
Kompetenzpuffer II	50 mM Calciumchlorid, 10 mM Kaliumacetat, 20% (v/v) Glycerin, pH 6.2

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen beginnt mit der Inokulation einer Vorkultur von 5 mL 2TY-Medium (15 mL-Reaktionsgefäß) mit dem gewünschten *E. coli*-Stamm und der Inkubation bei 37 °C und 180 UpM über Nacht. 1 mL dieser Kultur wird in einen mit 50 mL 2YT-Medium gefüllten 250 mL-Kultivierkolben mit Edelstahlspirale überführt und für 3 h bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Im Anschluss wird die Kultur für 10 min bei 4 °C und 3500 ×g zentrifugiert und das Pellet bei 0 °C für einen kurzen Zeitraum gelagert. Das Resuspendieren des Zellpellets erfolgt vorsichtig in 50 mL eiskaltem Kompetenzpuffer I, gefolgt von 1 h Inkubation bei 0 °C. Die Zellsuspension wird für 10 min bei 4 °C und 3500 ×g zentrifugiert, das Pellet vorsichtig in 5 mL eiskaltem Kompetenzpuffer II resuspendiert und die Suspension während der Aliquotierung auf Eis gelagert. Jedes Aliquot enthält ein Volumen von 50 µL Zellsuspension und wird direkt in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

### 6.3.5 Transformation chemisch kompetenter Bakterienzellen

SOC-Medium	2.0% (w/v) Trypton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM Natriumchlorid, 25 mM Kaliumchlorid, 25 mM Magnesiumchlorid x H <sub>2</sub> O, 1.0% (w/v) Glukose, pH 7.0
2TY-Agar	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Natriumchlorid, 16 g/L Agar
Kanamycin	60 mg/mL Kanamycin-Monosulfat in MPW

Ein Aliquot (50 µL) chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wird mit 1 µL gereinigter Plasmid-Lösung oder 2 – 5 µL eines Ligationsansatzes versetzt und vorsichtig mechanisch durchmischt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis erfolgt ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s. Die Zellen werden direkt für 10 min auf Eis gelagert. Im Anschluss werden diese mit 500 µL vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C und 350 UpM inkubiert. Die Zellsuspension wird daraufhin für 30 s bei 5000 ×g zentrifugiert und 400 µL Überstand verworfen. Die verbliebenen 100 µL werden vorsichtig resuspendiert, auf einer 2YT-Agarplatte mit entsprechender Antibiotikaresistenz ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

---

### 6.3.6 Stammhaltung

Die Lagerung der erworbenen und erzeugten Stämme erfolgt als Cryo- bzw. Gefrierkulturen. Hierfür wird eine 5 mL Vorkultur mit einem Stamme inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 180 UpM inkubiert wurde. 500 µL dieser Vorkultur werden mit 500 µL einer 50% (w/v) Glycerin-Lösung vermischt (Endkonzentration 25% (w/v) Glycerin) und in bei -80 °C gelagert.

### 6.3.7 Isolierung von Plasmid-DNA

#### Alkalische Lyse

Lösung I	50 mM TRIS, 10 mM EDTA, pH 8.0
Lösung II	200 mM Natriumhydroxid, 1% (w/v) SDS
Lösung III	3 M Kaliumacetat (pH 5.5)
RNase I-Lösung	10 mg/mL RNase I in MPW

Ausgangssituation ist eine Vorkultur von 5 – 6 mL 2TY-Medium und entsprechendem Selektionsmarker, die bei 37 °C und 180 UpM über Nacht inkubiert wird. Diese Übernachtskultur wird für 5 min bei 10000 ×g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 mL Lösung I resuspendiert und 10 µL RNase I-Lösung zugegeben. Die Zellsuspension wird für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 2 mL Lösung II vermischt und weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird 1.5 mL Lösung III und 500 µL Chloroform hinzugegeben, kurz vermischt und für 10 min bei 4 °C und 10000 ×g zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und mit 3.5 mL Isoopropanol versetzt. Die folgende Zentrifugation wird für 30 min bei 4 °C und 13000 ×g durchgeführt und der Überstand verworfen. Das verbleibende farblose Pellet wird mit 70% (v/v) absolutem Ethanol (2× 1 mL) gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Abschließend wird das Pellet in 100 – 300 µL MPW aufgenommen.

Das erhaltene Material eignet sich für die längerfristige Lagerung (-20 °C), Klonierungsarbeiten und Transformationen. Sequenzierungen des isolierten Materials weisen oft keine oder Ergebnisse minderer Qualität auf.

### Plasmid-Kit

Die Plasmidisolierung wird mit dem NUCLEOSPIN® GEL AND PCR CLEAN-UP Kit von MACHEREY-NAGEL durchgeführt. Wichtig ist, dass die Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt werden um das Kristallisieren der Salze in den verwendeten Pufferlösungen zu verhindern. Dieser Punkt ist nicht in der Anleitung hervorgehoben, mindert die Qualität und Quantität des Isolierten Materials allerdings deutlich.

Das erhaltene Isolierte Material eignet sich für die längerfristige Lagerung (-20 °C), Klonierungsarbeiten, Transformationen und Sequenzierungen.

### 6.3.8 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die photometrische Analyse von linearisierter und zirkulärer DNA erfolgt bei  $\lambda = 230$  nm, 260 nm und 280 nm am Mikrotiterplattenlesegerät VARIOSKAN™ LUX (THERMOFISHER SCIENTIFIC™) unter Verwendung der  $\mu$ DROP™ Platte. Die Konzentration wird über  $A_{260}$  ermittelt; die Reinheit über die Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  und  $A_{230}/A_{260}$ .

### 6.3.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung isolierter Plasmid-DNA erfolgt durch die Firma EUROFINS GENOMICS unter Verwendung des Sequenzierkits MIX2SEQ. Dem Firmen-Protokoll folgend werden 15  $\mu$ L gereinigte Plasmid-DNA-Lösung mit einer Konzentration von 50 – 100 ng/ $\mu$ L vorgelegt und mit 2  $\mu$ L des Sequenzierprimers versetzt. Jedes Konstrukt wird zweimal präpariert; einmal für die Vorwärts- (*forward*/fwd-Primer) und einmal für die Rückwärtssequenzierung (*reverse*/rev-Primer). Die Primer sind in Tabelle 6-13 (S. 126) gelistet.

---

### 6.3.10 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer	40 mM TRIS/Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0
6x Probenpuffer	10 mM TRIS/HCl, 60% (v/v) Glycerin, 0.03% (w/v) Bromphenolblau, 0.03% (w/v) Xylencyanol FF, 60 mM EDTA, pH 7.6
Farbstoff	MIDORI GREEN ADVANCE®, BIOZYM
DNA-Standard	GENERULER 1 kb DNA LADDER, THERMOFISHER SCIENTIFIC™

Einzel- oder doppelsträngige DNA-Fragmente werden bei der Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Da die DNA ein Polyanion ist, wandert diese in dem angelegten elektrischen Feld in Richtung der Anode. Die polymerisierte Agarose bildet je nach Konzentration des Gels ein entsprechend dichtes Netzwerk aus, durch welches große DNA-Fragmente langsamer wandern als kleine.

Die verwendeten Agarosegele enthalten 1% Agarose, welches in erhitztem TAE-Puffer gelöst wurde. Darüber hinaus wird der abgekühlten Lösung der Fluoreszenz-Farbstoff MIDORI GREEN ADVANCE® (1 µL/10 mL Gel) zugegeben. Der Farbstoff lagert sich an das Phosphat-Rückgrat der DNA an und ermöglicht eine Detektion unter UV-Licht (254 nm). Als Referenz der verschiedenen Laufstrecken wird ein Standard (5 µL GENERULER 1 kb DNA LADDER) als zusätzliche Probe aufgetragen, der Polynukleotide definierter Länge enthielt.

Die DNA-Proben werden mit 6× Probenpuffer versetzt und auf das verfestigte Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wird in TAE-Puffer mit einer angelegten Spannung von 50 V für 10 min ausgeführt und anschließend 100 V für 60 min bis die unterste Farbstoffbande etwa zwei Drittel der Gellänge zurückgelegt hat.

## 6.4 Proteinbiochemische Arbeiten

### 6.4.1 Vorkultur

2TY-Medium	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Natriumchlorid
Kanamycin	60 mg/mL Kanamycin-Monosulfat in MPW

Eine Vorkultur dient der Anzucht einer Bakterienkultur in einem kleinen Volumen ausgehend von einer Cryokultur oder einer Kultur auf einer Agarplatte.

Die in dieser Arbeit genutzten Vorkulturen besaßen ein Volumen von 5 – 8 mL 2TY- oder LB-Medium mit Kanamycin A als Selektionsmarker. Hierfür wurden 0.1% (v/v) des Kulturvolumens eingesetzt. Die Inokulation erfolgt mit einer geringen Menge an Bakterien (Mikropipettenspitze). Die Vorkulturen wurden bei 37 °C und 180 UpM über Nacht inkubiert. Die Vorkultur konnte im Anschluss zur Inokulation einer Expressionskultur (Hauptkultur), der Erstellung einer Cryokultur oder der Plasmidisolation genutzt werden. Die Bestimmung der Bakteriendichte erfolgte indirekt über die photometrische Ermittlung der OD<sub>600</sub>.

### 6.4.2 Expressionskultur

LB-Medium	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Natriumchlorid
2TY-Medium	16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Natriumchlorid
Kanamycin	60 mg/mL Kanamycin-Monosulfat in MPW

Eine Expressions- bzw. Hauptkultur dient der Erzeugung einer großen Anzahl von Bakterien und der Verwendung dieser zur heterologen Expression der Gene auf den zuvor transformierten Plasmiden.

Die Expressionskulturen besaßen ein Volumen von 50 – 200 mL 2TY-Medium versetzt mit 0.1% (v/v) Selektionsmarker. Das Kulturvolumen entspricht dabei 40% des Volumens der Erlenmeyer-Kulturkolben mit Metallspirale. Das Kulturmedium wird ausgehend von einer Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0.05 inokuliert und anschließend bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.4-0.6 bei 37 °C und 180 UpM inkubiert. Die heterologe Genexpression wird durch die Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) initiiert und erfolgt bei 16 °C und 180 UpM

---

über 22 h. Abschließend wird mittels Zentrifugation (10 min, 4 °C, 5000 ×g) das Medium abgetrennt und die erhaltenen Zellpellets werden bei -20 °C gelagert.

### 6.4.3 Zellaufschluss

Der Aufschluss der zuvor kultivierten Bakterien setzt die dargestellten, rekombinanten Proteine in das umgebende Medium frei, welche durch heterologe Genexpression hergestellt werden.

Das Zellpellet wird hierfür in einem für die weiteren Arbeiten geeigneten Puffer resuspendiert; für 0.1 g Pellet wurden 1 mL Puffer zugesetzt. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallsonde (BANDELIN, Sonde MS73). Die resuspendierten Zellen wurden bei 0 °C über 10 min hinweg Ultraschall ausgesetzt; à zehn Zyklen von 30 s Puls (Amplitude 45%, 0.02 kJ/s) und 30 s Pause. Die löslichen Proteine und Bestandteile (Überstand bzw. Zelllysate) wurden anschließend von den unlöslichen Bestandteilen, Organellen und Zelltrümmern (Pellet) durch Zentrifugation (30 min, 4 °C, 10000 ×g) getrennt. Die Fraktion von Interesse, Pellet oder Zelllysate, wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### 6.4.4 Proteinrückfaltung

Lysepuffer	50 mM TRIS/HCl, 100 mM Natriumchlorid, 5 mM EDTA, 0.1% (w/v) Natriumazid, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, pH 8.5
Denaturierungspuffer	50 mM TRIS/HCl, 8 M Urea, pH 8.5
Dialysepuffer	50 mM TRIS/HCl, pH 8.5

Die Rückfaltung von Proteinen ist eine Methode, die es ermöglicht unlöslich produzierte Proteine in eine lösliche Form zu überführen. Ausgangspunkt ist die Annahme, dass unlösliche rekombinante Proteine nach der Biosynthese nicht in ihrer nativen Faltungsstruktur vorliegen. Mit einem geeigneten Puffersystem wird zunächst die unlösliche Faltungsstruktur aufgelöst und die linearisierte Aminosäurekette anschließend langsam in das native Faltungsmuster überführt.

Der Zellaufschluss erfolgt für die Rückfaltung in Lysepuffer (1 mL pro 0.1 g Zellpellet). Die löslichen und nicht-löslichen Bestandteile werden mittels Zentrifugation nach dem Zellaufschluss (Kapitel 6.4.3, S. 133) getrennt. Der Überstand wird verworfen, das Pellet im selben Volumen Lysepuffer resuspendiert und zentrifugiert (30 min, 4 °C, 10000 ×g). Das erhaltene Pellet wird für den Schritt der Denaturierung in 1 mL Denaturierungspuffer je 0.1 g ursprünglichem Zellpellet suspendiert. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur für 60 min und war gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt (30 min, 4 °C, 10000 ×g). Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit Dialysepuffer auf 5 M Harnstoff verdünnt. Die darauffolgende Rückfaltung wurde mittels Dialyse durchgeführt. Die Proteinlösung wurde in einen Dialyseschlauch (MWCO 14 kDa, CARL ROTH) überführt und verschlossen. Die Dialyse erfolgte bei 4 °C über Nacht gegen ein circa 200faches Volumen Dialysepuffer, unter leichtem Rühren. Am nächsten Tag wird der Inhalt des Dialyseschlauchs in ein geeignetes Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

#### 6.4.5 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

Waschpuffer I	30 mM TRIS/HCl, 500 mM Natriumchlorid, 10% (v/v) Glycerin
Waschpuffer II	30 mM TRIS/HCl, 500 mM Natriumchlorid, 10 mM Imidazol, 10% (v/v) Glycerin
Elutionspuffer	30 mM Tris/HCl, 500 mM Natriumchlorid, 500 mM Imidazol, 10% (v/v) Glycerin

Die Nickel-Nitrilotriessigsäure(NTA)-Affinitätschromatographie wird zur Isolierung von Fusionsproteinen verwendet, die einen Histidin-*tag* (*His-tag*) am *N*- oder *C*-Terminus besitzen. Bei dieser Methode wird die Stabilität von zweiwertigen Metallionen in Verbindung mit chelatisierenden Liganden genutzt. Das auf einer Sepharose-Matrix immobilisierte NTA bildet mit zweiwertigen Nickelionen einen stabilen Komplex, indem vier der sechs Koordinationsstellen von der NTA belegt werden. Die verbleibenden zwei freien Koordinationsstellen können von einem *His-tag* besetzt werden und entsprechende Fusionsproteine an der Matrix binden. Die Elution der Proteine erfolgt mit Imidazol, welches den *His-tag* aus der Koordination am Nickel verdrängt.

Das Zelllysate wird filtriert (CA, 0.45 µm) von restlichen unlöslichen Bestandteilen befreit. Die Reinigung der His-markierten Proteine erfolgte mit dem ÄKTA PURE 25 PROTEIN PURIFICATION SYSTEM. Die Methode basiert auf einem linearen Gradienten, bei welchem die Anteile des Imidazol-haltigen Elutionspuffer erhöht werden (Tabelle 6-16).

**Tabelle 6-16: Programm für die Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit linearem Gradienten.**

Durchflussvolumen [mL]	Waschpuffer [%]	Elutionspuffer [%]
0	100	0
X <sup>a</sup>	100	0
X + 25	0	100
X + 30	0	100
X + 35	100	0
X + 40	100	0

<sup>a</sup> Durchflussvolumen bis die UV-Absorption einen Wert unter 50 mAU aufweist.

#### 6.4.6 Pufferaustausch mittels Größenausschlussäule

HEPES-Puffer            150 mM HEPES, 100 mM Natriumchlorid, 10% (w/v) Glycerin, pH 7.5

Enzymaktivitätstests erfordern zumeist andere Puffersysteme als bei der Freisetzung, Rekonstituierung oder Affinitätschromatographie Anwendung finden. Der Pufferaustausch kann mittels Größenausschlussäule erfolgen. Die Ausschlussgrenze muss unter der Molekularmasse des enthaltenen Proteins liegen.

Die Proteinlösungen aus Abschnitt 6.4.5 wird einem Pufferaustausch mittels PD-10 Entsalzungssäulen (MWCO 5 kDa, GE HEALTHCARE) gegen den Glycerin-haltigen HEPES-Puffer unterzogen. Der Vorgang wurde bei 4 °C nach Herstellerangaben gravimetrisch durchgeführt. Die erhaltenen Proteinlösungen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 6.4.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

12% Trenngel	40% (v/v) Acrylamid-Bisacrylamidlösung 19:1 (30%), 390 mM TRIS/HCl (pH 8.8), 0.1% (w/v) SDS, 0.04% (v/v) TEMED, 0.1% (w/v) APS
5% Sammelgel	17% (v/v) Acrylamid-Bisacrylamidlösung 19:1 (30%), 62.5 mM TRIS/HCl (pH 6.8), 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (v/v) TEMED, 0.1% (w/v) APS
4x Probenpuffer	20 mM DTT, 200 mM TRIS/HCl, 20% (w/v) Glycerin, 8% (w/v) SDS, 0.8% (w/v) Coomassie Blue R-250
Fixierlösung	50% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Eisessig
Färbelösung	5% (v/v) Ethanol, 7.5% (v/v) Eisessig
Coomassielösung	7.75 mM Coomassie Blue R-250

Die Analyse der Expressionen und darauffolgenden Prozessen erfolgte durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI.<sup>[155]</sup> Die entfaltenen Proteine liegen aufgrund des angelagerten SDS als Polyanion vor und wandern durch das Polyacrylamid-Netzwerk Richtung Anode. Größere Aminosäureketten (entfaltete Proteine) wandern schneller als kleinere.

Die Proteinproben für die Gelelektrophorese wurden mit Probenpuffer versetzt und anschließend bei 95 °C für 10 min denaturiert. Die Polyacrylamidgele wurden mit dem PERFECTBLUE™ System von PEQLAB hergestellt. Die SDS-PAGE erfolgte bei einer konstanten Spannung von 125 V für 10 min und anschließend bei konstanten 175 V für 1.5 h. Neben den Proteinproben wurden 5 µL PAGERULER™ PRESTAINED PROTEIN LADDER der Firma THERMOFISHER SCIENTIFIC als Größenstandard aufgetragen. Nach abgeschlossener Proteinauftrennung wurde das Trenngel mit Fixierlösung überschichtet und für 30 s in der Mikrowelle erhitzt, gefolgt von 5 min Inkubation auf einer Wippschüttelplatte. Anschließend wurde das Gel mit 50 mL Färbelösung und 200 µL Coomassie-Lösung überschichtet, bei 30 s in der Mikrowelle erhitzt und über 20 – 60 min auf der Wippschüttelplatte gefärbt. Die Entfärbung des Gels wurde in MPW über Nacht auf der Wippschüttelplatte vollzogen.

---

## 6.4.8 Protein LCMS/MS-Analysen

MS/MS-Puffer I	10 mM DTT, 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat, pH 8.5
MS/MS-Puffer II	55 mM 2-Iodacetamid, 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat, pH 8.5
MS/MS-Puffer III	100 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (pH 8.5) plus Acetonitril (1:1)
MS/MS-Puffer IV	25 mM Ammoniumhydrogencarbonat, pH 8.5
UPLC Laufmittel A	70% (v/v) Acetonitril, 0.1% (v/v) Trifluoressigsäure
UPLC Laufmittel B	Wasser, 0.1% (v/v) Trifluoressigsäure

Die eindeutige Identifizierung von Proteinen wird mittels LCMS/MS-Analyse sichergestellt. Die zu untersuchenden Proteine werden einem tryptischen Verdau unterzogen (Schnittstellen nach Lysin oder Arginin) und die resultierenden Peptide über eine Gesamtmassen-Analyse und eine Fragmentmassen-Analyse identifiziert. Die erhaltenen Daten werden mit einer Protein-Datenbank abgeglichen, woraufhin eine Zuordnung des Proteins ermöglicht wurde.

Die zu untersuchenden Proteine werden aus einem SDS-Gel erhalten. Die Proteinbanden werden ausgeschnitten, zerteilt ( $1 \times 1$  mm), in ein 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt und zusammen mit 500  $\mu$ L Acetonitril für 10 min inkubiert. Der Überstand wird verworfen. Die Gelstücke werden mit 50  $\mu$ L MS/MS-Puffer I bedeckt und für 30 min bei 56 °C inkubiert. Anschließend werden die abgekühlte Probe mit 500  $\mu$ L Acetonitril versetzt und erneut für 10 min inkubiert. Der Überstand wird verworfen, die Gelstücke mit 50  $\mu$ L MS/MS-Puffer II überschichtet und diese für 20 min im Dunkeln inkubiert. Der Überstand wird verworfen. Durch die Zugabe von 100  $\mu$ L MS/MS-Puffer III erfolgt die Entfärbung der Gelstücke. Ein mehrfacher Wechsel der Lösung gefolgt von kurzen Inkubationsphasen sorgt für eine vollständige Entfärbung. Die lösungsbefreiten Gelstücke wurden erneut mit 500  $\mu$ L Acetonitril inkubiert bis diese eine weiße Färbung annehmen. Der tryptische Verdau der Proteine in den Gelstücke erfolgt durch Zugabe von 50  $\mu$ L MS/MS-Puffer IV, 1  $\mu$ L Trypsin-Lösung (100 ng/ $\mu$ L) und Inkubation von 90 min bei 4 °C. Anschließend werden 20  $\mu$ L MS/MS-Puffer IV hinzugegeben um die Gelproben mit Flüssigkeit bedeckt zu halten. Die Hauptphase des Verdaus erfolgt über Nacht bei 37 °C. Am nächsten Tag wird das Reaktionsgefäß zentrifugiert (10 min, 4 °C, 10000  $\times$ g) und der Überstand für die Analyse in ein neues 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt.

Die LCMS/MS-Analyse der Peptidproben erfolgt an einer PROMINECE UPLC (SHIMADZU) mit einem nachgeschalteten TRIPLE TOF 5600+ Massenspektrometer. Die Trennung der Fragmente findet über eine HYPERSIL™ ODS C-18 Säule (5 µm Partikelgröße, 200 Å Porengröße, THERMOFISHER SCIENTIFIC) mit einem Gradienten von 0 – 40% Laufmittel A in 20 min, 40 – 95% Laufmittel A in 2 min, 95% Laufmittel A für 2 min und 0% Laufmittel A für 6 min bei einer Flussrate von 70 µL/min statt. Die Ionisierung erfolgte über eine TURBO V™ Ionenquelle (SCIEX) mit 5500 V Ionisationsspannung, 35 V Gegenstromgas, 4 V Quellengas, einer Proben temperatur von 350 °C und einer Kollisionsenergie von 43 V. Die Detektion für das Massenspektrum erfolgte in einem Bereich von 400 bis 1250 *m/z*. Dem Scan des Peptidvorläufers für 0.25 s folgten bis zu 20 MS/MS-Scans zwischen 100 – 2000 *m/z*. Die Selektion der Fragmente erfolgte dabei über einen Ladungszustand von +2 bis +5 mit über 150 Detektionen pro Sekunde und einer Massentoleranz von 0.05 Da.

Die erhaltenen Rohdaten wurden mit BYONIC™ (PROTEIN METRICS 2.8.2) prozessiert. Bezogen auf den tryptischen Verdau wurden zwei ausgelassene Lysin- bzw. Argininschnittstellen toleriert. Die Massentoleranz des Vorläuferpeptids wurde mit 2 Da, die des Peptidfragments mit 0.6 Da festgelegt. Weiterhin wurden gängige Modifikationen wie Oxidationen, Methylierungen, Acetylierungen und Carbamidomethylierungen berücksichtigt.

---

## 6.5 Enzymaktivitätstests

### 6.5.1 NADPH-Kalibrierung

HEPES-Puffer I	150 mM HEPES, 100 mM Natriumchlorid, 10% (w/v) Glycerin, pH 7.5
HEPES-Puffer II	150 mM HEPES, 100 mM Natriumchlorid, 10% (w/v) Glycerin, 6% (v/v) DMSO, pH 7.5 (Ziel: 3% (v/v) DMSO)

Die Analysen der Enzymaktivitätstests basieren auf der photometrischen Vermessung der Umsetzung von NADPH zu NADP<sup>+</sup> durch das Enzym. Der Kofaktor NADPH dient bei der Enzymreaktion als Reduktionsmittel und besitzt ein lokales Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 340$  nm. Die oxidierte Form NADP<sup>+</sup> absorbiert in diesem Wellenlängenbereich nicht.<sup>[143]</sup> Um die erhaltenen Extinktionswerte in entsprechende Konzentrationen umzurechnen, wird eine Kalibrierung für die Umrechnung vorgenommen. Die Kalibrierung erfolgt für sechs definierte Konzentrationen an NADPH in HEPES-Puffer (3% (v/v) DMSO) im Triplikat unter Anwesenheit einer rekombinanten Ketoreduktase-Domäne (ohne Enzym: kein Meniskus; mit Enzym: konkaver Meniskus).

### 6.5.2 Relative Enzymkinetiken

HEPES-Puffer I	150 mM HEPES, 100 mM Natriumchlorid, 10% (w/v) Glycerin, pH 7.5
HEPES-Puffer II	150 mM HEPES, 100 mM Natriumchlorid, 10% (w/v) Glycerin, 6% (v/v) DMSO, pH 7.5 (Ziel: 3% (v/v) DMSO)
Enzym-Lösungen	30 – 120 $\mu$ M Enzym, HEPES-Puffer I (Ziel: 5.0 $\mu$ M Enzym)
NADPH-Lösung	10 mM NADPH, HEPES-Puffer I (Ziel: 1.0 mM NADPH)
Substrat-Lösung	20 mM Substrat, HEPES-Puffer II (Ziel: 5.0 mM Substrat)

Relative Enzymkinetiken ermöglichen den Vergleich verschiedener Enzym-Substrat-Kombinationen unter definierten, gleichbleibender Reaktionsbedingungen, wie zum Beispiel einer konstanten Enzym- oder Substrat-Konzentrationen. Die untersuchte Startphase sollte eine konstante Reaktionsrate besitzen. Eine Reaktionskomponente muss hierfür im mehrfachen Überschuss vorliegen. Diese Komponente sollte bevorzugt am geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt beteiligt sein.

Die durchgeführten Enzymreaktionen werden mit dem Mikrotiterplattenlesegerät VARIOSKAN™ LUX (THERMOFISHER SCIENTIFIC) verfolgt. Die photometrische Detektion erfolgt je Messung für 100 ms bei 340 nm ( $\lambda_{\text{max}}$  von NADPH) und wird für jede Reaktion und Referenz im Triplikat von jeweils 100  $\mu\text{L}$  bei 25 °C durchgeführt. Referenzmessungen erfolgen mit HEPES-Puffer sowie HEPES-Puffer inklusive Enzym und NADPH. Die zweite Referenz diente der Detektion der Oxidation von NADPH durch Sauerstoff in der Atmosphäre oberhalb der Reaktionslösung. Die Zusammenführung aller Einzelkomponenten erfolgt in einer 96er Mikrotiterplatte, wobei darauf geachtet wurde, dass die finale DMSO-Konzentration überall 3% (v/v) beträgt.

Die zuerst pipettierten Komponenten sind HEPES-Puffer I und II, gefolgt von der NADPH-Lösung (final: 1 mM) und der Enzym-Lösung (final: 5  $\mu\text{M}$ ). Eine Vorinkubationsphase von 20 min bei 600 UpM mit einer Messung pro Minute folgt.

Die Zugabe der Substrat-Lösung (25  $\mu\text{L}$ , final: 5 mM) erfolgt mittels geräteinternem Dispenser (Dispensiergeschwindigkeit: Medium) und wurde direkt gefolgt von einer Schüttelphase von 30 s bei 600 UpM. Die Platte verlässt daraufhin das Gerät und eine Schutzfolie wird manuell über die Mikrotiterplatte geklebt um ein Austrocknen der Reaktionslösungen zu verhindern. Sobald die Platte sich wieder im Gerät befindet, wird eine Messung durchgeführt. Die Reaktion wird für 2 h bei 600 UpM mit einer Messung pro Minute verfolgt. Anschließend wurden die Enzymreaktionen optional für weitere 22 h mit einer Messung pro fünf Minuten beobachtet. Die Auswertung der Anfangsgeschwindigkeiten erfolgt für den Zeitraum ausgehend von der Substratzugabe bis zur zehnten Minute.

Alle Reaktionsproben werden abschließend extrahiert. Hierfür werden alle Triplikate ( $3 \times 100 \mu\text{L}$ ) in einem 2.0 mL Reaktionsgefäß überführt, jede Position mit 100  $\mu\text{L}$  MPW gewaschen und diese Volumina mit den Reaktionslösungen vereinigt. Die Extraktion erfolgt mit Ethylacetat ( $3 \times 600 \mu\text{L}$ ). Die Phasentrennung wird mittels Zentrifugation (5 min, 4 °C, 5000  $\times g$ ) unterstützt. Die organischen Phasen werden in einem 2.0 mL Reaktionsgefäß vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Lagerung der trockenen Proben erfolgt bei -20 °C oder -80 °C.

Die Proben wurden für die Analyse mittels UPLC-MS in 350  $\mu\text{L}$  *n*-Hexan/Isopropanol (85:15 v/v) aufgenommen. 50  $\mu\text{L}$  werden in ein 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt und das

---

Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 1 mL Acetonitril/Wasser (1:1 v/v) gelöst und in ein geeignetes Probengefäß filtriert (PTFE, 0.2  $\mu\text{m}$ ) und bei 4 °C bis zur zeitnahen Messung gelagert.

### 6.5.3 Enzymkinetiken

HEPES-Puffer I	150 mM HEPES, 100 mM Natriumchlorid, 10% (w/v) Glycerin, pH 7.5	
HEPES-Puffer II	150 mM HEPES, 100 mM Natriumchlorid, 10% (w/v) Glycerin, 6% (v/v) DMSO, pH 7.5	(Ziel: 3% (v/v) DMSO)
Enzym-Lösungen	30 – 120 $\mu\text{M}$ Enzym, HEPES-Puffer I	(Ziel: 5.0 $\mu\text{M}$ Enzym)
NADPH-Lösung	10 mM NADPH, HEPES-Puffer I	(Ziel: 1.0 mM NADPH)
Substrat-Lösung	10 mM Substrat, HEPES-Puffer II	(Ziel: 1.0-5.0 mM Substrat)

Enzymkinetiken ermöglichen die Berechnung der Enzymaktivität ( $K_m$ ), der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{\text{max}}$ ) und der katalytischen Effizienz ( $k_{\text{cat}}$ ) eines Enzyms. Diese Größen lassen sich unabhängig von der verwendeten Enzym- oder Substratkonzentration bestimmen. Die Durchführung der Enzymkinetiken entspricht bis auf die Substrat-Konzentration dem Versuchsaufbau der Relativen Kinetiken (Kapitel 6.5.2, S. 139). Es werden Messungen mit fünf verschiedenen Substrat-Konzentrationen im Triplikat durchgeführt. Die photometrische Detektion wird nach 2 h beendet und es erfolgt keine Extraktion.

Die Auswertung basiert auf den Anfangsgeschwindigkeiten der Enzymumsetzung und die Kinetik-Parameter werden in einer direkt-linearen Auftragung mittels nichtlinearer Regression in Origin OEM ermittelt.

### 6.5.4 Semipräparative Enzymreaktionen

HEPES-Puffer I	150 mM HEPES, 100 mM Natriumchlorid, 10% (w/v) Glycerin, pH 7.5	
HEPES-Puffer II	150 mM HEPES, 100 mM Natriumchlorid, 10% (w/v) Glycerin, 6% (v/v) DMSO, pH 7.5	(Ziel: 3% (v/v) DMSO)
Enzym-Lösungen	30 – 120 $\mu$ M Enzym, HEPES-Puffer I	(Ziel: 5.0 $\mu$ M Enzym)
NADPH-Lösung	60 mM NADPH, HEPES-Puffer I	(Ziel: 6.0 mM NADPH)
Substrat-Lösung	15 – 20 mM Substrat, HEPES-Puffer II	(Ziel: 5.0 mM Substrat)

Die Umsetzung von Substraten im semipräparativen Maßstab ermöglicht die Darstellung von Produktmengen im Bereich von 0.1-0.6 mg (0.5-1.5  $\mu$ mol), die geeignet sind für Analysen mittels chiraler HPLC. Die Durchführung der Reaktionen entspricht bis auf die NADPH-Konzentration dem Versuchsaufbau der Relativen Kinetiken (Kapitel 6.5.2, S. 139). NADPH liegt mit 120% der Substratstoffmenge im Überschuss vor, sodass über 24 h hinweg eine möglichst vollständige Umsetzung des Substrats erreicht wird. Alle Abläufe von Geräteverwendung bis zur Extraktion und Lagerung wurden wie unter 6.5.2 (S. 139) beschrieben durchgeführt.

Die Proben werden für die Analyse mittels chiraler HPLC in 350  $\mu$ L *n*-Hexan/Isopropanol (85:15 v/v) aufgenommen. 300  $\mu$ L werden in ein 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 150  $\mu$ L *n*-Hexan/Isopropanol (85:15 v/v) gelöst und zentrifugiert (20 min, 4 °C, 5000  $\times$ g). Die oberen 100  $\mu$ L der Probe wurden in ein geeignetes Probengefäß überführt und bei -20 °C bis zur zeitnahen Messung gelagert.

---

### 6.5.5 Präparative Enzymreaktionen

HEPES-Puffer	150 mM HEPES, 100 mM Natriumchlorid, 10% (w/v) Glycerin, pH 7.5	
HEPES-Puffer II	150 mM HEPES, 100 mM Natriumchlorid, 10% (w/v) Glycerin, 6% (v/v) DMSO, pH 7.5	(Ziel: 3% (v/v) DMSO)
Enzym-Lösungen	30 – 120 $\mu$ M Enzym, HEPES-Puffer I	(Ziel: 5.0 $\mu$ M Enzym)
NADPH-Lösung	60 mM NADPH, HEPES-Puffer I	(Ziel: 6.0 mM NADPH)
Substrat-Lösung	10 mM Substrat, HEPES-Puffer II	(Ziel: 5.0 mM Substrat)

Die Umsetzung von Substraten im präparativen Maßstab ermöglicht die Darstellung von Produktmengen im Bereich von 5.0 – 10.0 mg (25 – 30  $\mu$ mol), die geeignet sind für Analysen mittels NMR- und VCD-Spektroskopie sowie eine präparativ-handhabbare, synthetische Umsetzung zu ermöglichen. Die Durchführung der präparativen Enzymreaktionen entspricht den semipräparativen Enzymreaktionen (Kapitel 6.5.4, S. 142), wobei erstgenannte in 1.5 mL Reaktionsgefäßen, größeren Gesamtvolumina und ohne photometrische Reaktionsverfolgung durchgeführt werden. Die Volumina wurden entsprechend der umzusetzenden Substratmenge in einer entsprechenden Anzahl von 1.5 mL Reaktionsgefäßen aufgeteilt, wobei die Füllhöhe nicht 1.2 mL überschritt.

Nach 24 h bei 25 °C und 600 UpM werden die aufgeteilten Fraktionen vereinigt und dreimal mit einem 1:1 Volumen an Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittels wird im Vakuum entfernt. Die Lagerung der Proben erfolgt bei -20 °C.

## 6.6 Allgemeine Hinweise zu chemischen Synthesen

### Reagenzien und Lösungsmittel

Alle kommerziell erhältlichen Ausgangssubstanzen wurden bei SIGMA ALDRICH, ACROS ORGANICS, MERCK, CARL ROTH, ALFA AESAR, FLUKA, CARBOLUTION, TCI, oder ABCR erworben und ohne weitere Reinigung verwendet. Das in Synthesereaktionen genutzte Wasser wurde aus der Hausanlage über Leitungen als vollentsalztes Wasser (VE-Wasser) bezogen. Alle Puffer und Lösungen für molekularbiologische und proteinbiochemische Arbeiten sowie Enzymreaktionen wurden mit membranfiltrierten und entmineralisiertem Wasser (MPW) dargestellt.

Alle weiteren Lösungsmittel wurden in analysenreiner Qualität von FISHER CHEMICALS und VWR CHEMICALS erworben. Trockene (wasserfreie) Lösungsmittel wurden von SIGMA ALDRICH, ACROS ORGANICS oder TCI bezogen und unter Argon und über Molekularsieb gelagert.

### Bedingungen der Synthesereaktionen

Alle Reaktionen, die mit absoluten Lösungsmittel durchgeführt wurden, fanden in unter Vakuum ausgeheizten Glasgeräten unter Stickstoffatmosphäre statt, wenn nicht anders beschrieben. Die Zugabe von Feststoffen erfolgte im Stickstoffgegenstrom; die Zugabe von Lösungen und Flüssigkeiten mittels mit Inertgas gespülten Spritzen und Kanülen. Alle Schritte ohne Temperaturangabe wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie wurde mit einer mit Kieselgel 60 F254 beschichteten Aluminium- oder Kunststoffolie der Firma MACHEREY-NAGEL durchgeführt. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht (254 nm) oder mit einer von verschiedenen Färbelösungen. Die verwendeten Färbelösungen basierten auf Kaliumpermanganat (15 g/L Kaliumpermanganat, 100 g/L Kaliumcarbonat, 2.5 g/L Natriumhydroxid in Wasser, Tauchbad, Erhitzen) oder Vanillin (60 g/L Vanillin, 10 mL/L konzentrierter Schwefelsäure in Ethanol).

---

## Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel 60 (Porengröße 0.040-0.063 mm) von der Firma MACHEREY-NAGEL unter Verwendung von manueller Druckluft durchgeführt.

## Darstellung von Kupfersulfat-imprägniertem Silika

Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat (1.00 g, 4.00 mmol) wurde in einer wässrigen Schlämme von 9 g Kieselgel 60 (Porengröße 0.040-0.063 mm) der Firma MACHEREY-NAGEL gelöst und das Wasser im Vakuum bei 60 °C entfernt.

## NMR-Spektroskopie

<sup>1</sup>H NMR- und <sup>13</sup>C NMR-Spektren wurden an den Geräten DP× 200, DP× 400 oder Avance III 500 HD der Firma BRUKER aufgenommen. Als Lösungsmittel wurden deuteriertes Chloroform (CDCl<sub>3</sub>; <sup>1</sup>H: 7.26 ppm, <sup>13</sup>C: 77.16 ppm), Wasser (D<sub>2</sub>O; <sup>1</sup>H: 4.79 ppm) oder Acetonitril (CD<sub>3</sub>CN; <sup>1</sup>H: 1.94 ppm, <sup>13</sup>C: 1.32 ppm) verwendet. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind in *parts per million* (ppm) und mit Bezug zu dem Signal der Restprotonierung des Lösungsmittels angegeben.<sup>[156]</sup>

Die Kopplungskonstanten  $J$  sind in Hertz (Hz) in den <sup>1</sup>H NMR-Spektren angegeben. Die Signalmultiplizitäten sind durch folgende Abkürzungen gekennzeichnet: s = Singulett, bs = breites Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett.

Die Daten der <sup>13</sup>C NMR-Spektren enthalten die Angaben der Phasen von DEPT-Messungen mit positiv „+“ (CH/CH<sub>3</sub>), negativ „-“ (CH<sub>2</sub>) und C<sub>q</sub> (quartäre C).

Die Auswertung der Spektren erfolgte digital mit Hilfe des Programms MESTRENOVA der Firma MESTRELAB RESEARCH statt.

## Massenspektrometrie

Die Aufnahme der hochauflösenden Massenspektren (HRMS) erfolgten an einem MICROMASS LCT mit Lock-Spray Einheit mit Injektion der Proben im Loop Modus am Gerät ALLIANCE 2695 (WATERS) oder am Gerät THERMO SCIENTIFIC Q EXACTIVE (THERMOFISHER SCIENTIFIC) mit Direkteinlass mit oder ohne LC-Trennung. Die Ionisierung erfolgte durch

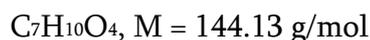
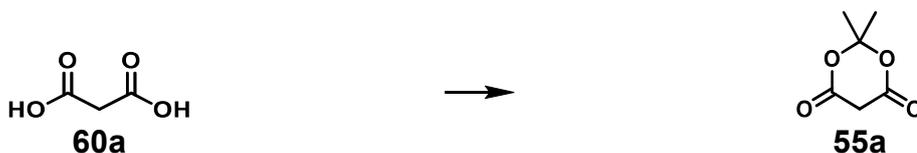
Elektrospray-Ionisation (ESI+) oder chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI). Angegeben sind die gefundene und die berechnete Masse.

### **Drehwerte**

Die spezifischen optischen Rotationen  $[\alpha]$  wurden bei der angegebenen Temperatur mit einem Polarimeter Typ 241 von PERKIN-ELMER in einer 10 cm Quarzglasküvette bei  $\lambda = 589.3$  nm (Natrium-D-Linie) gemessen. Die Angabe der Drehwerte erfolgt in  $^{\circ}\cdot\text{cm}^2/10$  g, wobei die Konzentration  $c$  definitionsgemäß in 10 mg/mL angegeben ist.

## 6.7 Synthesen für Malonsäurehalbthioester

### 6.7.1 2,2-Dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (55a)



Malonsäure (**60a**) (25.0 g, 240 mmol, 1.0 Äq.) wurde mit Essigsäureanhydrid (45.4 mL, 481 mmol, 2.0 Äq.) versetzt und auf 0 °C gekühlt. Konzentrierte Schwefelsäure (3.75 mL, 26.0 mmol, 10 mol%) wurde zugetropft und die Reaktionslösung für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Aceton (53.0 mL, 710 mmol, 3.0 Äq.) über 10 min bei 0 °C zugetropft und das Reaktionsgemisch erneut für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit Wasser (480 mL) versetzt und die wässrige Phase mit Diethylether (3× 480 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (4× 250 mL) extrahiert und die vereinigten wässrigen Phasen mit 4 M Salzsäure (300 mL) auf einen pH-Wert von 1 – 2 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (6× 500 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (400 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde aus Hexan/Aceton/Diethylether (1:1:1, 20 mL) umkristallisiert und Meldrumsäure **55** (10.3 g, 71.5 mmol, 30%) als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

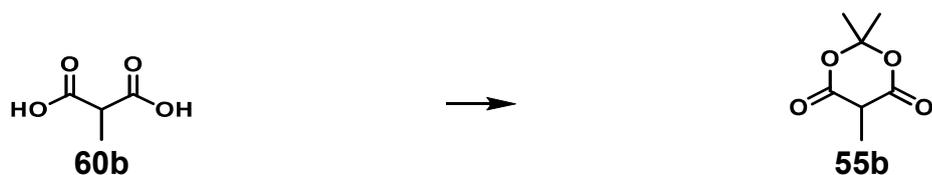
$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.79 (s, 6H,  $CH_3$ ), 3.62 (s, 2H,  $CH_2$ ).

$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 27.8 (+,  $CH_3$ ), 36.3 (–,  $CH_2$ ), 106.4 ( $C_q$ ,  $C(CH_3)_2$ ), 163.0 ( $C_q$ ,  $COO$ ).

UPLC-MS (ESI–):  $m/z$   $[M-H]^-$  143.01 (berechnet 143.04).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[157]</sup>

## 6.7.2 2,2,5-Trimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (55b)



$C_7H_{10}O_4$ ,  $M = 158.15$  g/mol

Methylmalonsäure (**60b**) (26.5 g, 224 mmol, 1.0 Äq.) wurde mit Essigsäureanhydrid (42 mL, 45.4 g, 445 mmol, 2.0 Äq.) versetzt und gerührt. Unter Kühlung auf 0 °C wurde die Suspension mit konzentrierter Schwefelsäure (3.5 mL, 24.3 mmol, 10 mol%) versetzt und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die entstehende Lösung wurde erneut auf 0 °C gekühlt und anschließend über 15 min mit Aceton (49 mL, 38.7 g, 666 mmol, 3.0 Äq.) versetzt. Während der folgenden 2 h Rühren bei Raumtemperatur entstand ein intensiv orangener Niederschlag. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Wasser (450 mL) beendet und mit Diethylether (450 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (3× 450 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (4× 225 mL) extrahiert. Die resultierenden, vereinigten wässrigen Phasen wurden mit 4 M Salzsäure (250 mL) auf einen pH-Wert von 1 – 2 eingestellt und mit Diethylether (5× 400 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (225 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Dichlormethan (250 mL) aufgenommen, erneut filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 2,2,5-Trimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**55b**) (26.7 g, 169 mmol, 75%) wurde als leicht grauer, kristalliner Feststoff erhalten.

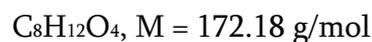
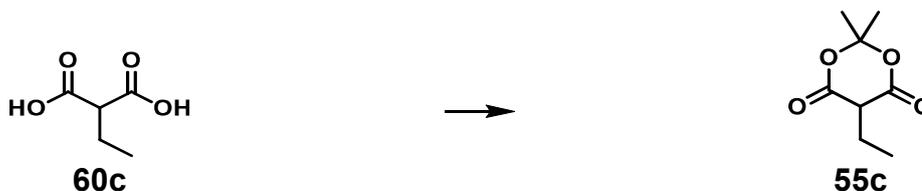
$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.58 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $CHCH_3$ ), 1.77 (d,  $J = 0.5$  Hz, 3H,  $CH_3CCH_3$ ), 1.81 (d,  $J = 0.5$  Hz, 3H,  $CH_3CCH_3$ ), 3.59 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H, CH).

$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 10.9 (+,  $CH_3$ ), 26.6 (+,  $CH_3CCH_3$ ), 28.7 (+,  $CH_3CCH_3$ ), 41.5 (+, CH), 105.0 ( $C_q$ ,  $C(CH_3)_2$ ), 166.2 ( $C_q$ , COO).

UPLC-MS (ESI<sup>-</sup>):  $m/z$   $[M-H]^-$  157.09 (berechnet 157.05).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[158]</sup>

### 6.7.3 5-Ethyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (55c)



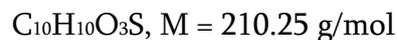
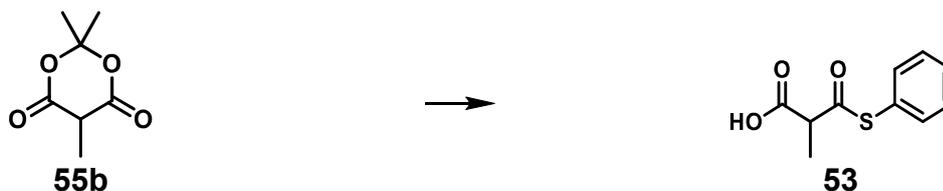
Essigsäureanhydrid (8.0 mL, 8.66 g, 84.8 mmol, 2.0 Äq.) wurden zu Ethylmalonsäure (**60c**) (5.60 g, 42.4 mmol, 1.0 Äq.) gegeben und bei 0 °C gerührt. Es wurde konzentrierte Salzsäure (660 µL, 4.59 mmol, 10 mol%) hinzugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Zugabe von Aceton (9.3 mL, 7.38 g, 127 mmol, 3.0 Äq.) erfolgte über 10 min unter Rühren bei 0 °C und das Reaktionsgemisch wurde erneut für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch Zugabe von Wasser (80 mL) wurde die Reaktion beendet und mit Diethylether (80 mL) versetzt. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (3× 80 mL) extrahiert. Die Extraktion der vereinigten organischen Phasen erfolgte mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (4× 50 mL), die vereinigt und mit 4 M Salzsäure (50 mL) auf einen pH-Wert von 1 – 2 eingestellt wurde. Die wässrige Phase wurde mit Diethylether (5× 80 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (40 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde aus Hexan/Aceton/Diethylether (1:1:1, 20 mL) umkristallisiert und 5-Ethyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**55c**) (4.73 g, 27.5 mmol, 65%) als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.06 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H,  $CH_2CH_3$ ), 1.76 (d,  $J = 0.5$  Hz, 3H,  $CH_3CCH_3$ ), 1.79 (d,  $J = 0.5$  Hz, 3H,  $CH_3CCH_3$ ), 2.18 (qd,  $J = 7.3, 4.9$  Hz, 2H,  $CH_2$ ), 3.49 (t,  $J = 4.9$  Hz, 1H,  $CH$ ).

$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 10.8 (+,  $CH_2CH_3$ ), 20.2 (–,  $CH_2$ ), 27.1 (+,  $CH_3CCH_3$ ), 28.6 (+,  $CH_3CCH_3$ ), 47.3 (+,  $CH$ ), 104.9 ( $C_q$ ,  $C(CH_3)_2$ ), 165.6 ( $C_q$ ,  $COO$ ).

UPLC-MS (ESI–):  $m/z$   $[M-H]^-$  171.09 (berechnet 171.06).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[159]</sup>

6.7.4 2-Methyl-3-oxo-3-(phenylthio)propansäure (**53**)

2,2,5-Trimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**55b**) (25.0 g, 158 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Acetonitril (150 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Die Zugabe von DIPEA (30.3 mL, 22.9 g, 178 mmol, 1.1 Äq.), tropfenweise Trimethylsilylchlorid (22.0 mL, 18.9 g, 174 mmol, 1.1 Äq.) über 15 min, sowie Thiophenol (17.0 mL, 18.2 g, 166 mmol, 1.05 Äq.) erfolgte bei 0 °C unter Rühren. Die Reaktionslösung wurde auf 43 °C erwärmt und über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0.3 M Salzsäure (250 mL) beendet, die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase mit Diethylether (3× 375 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung extrahiert. Der pH-Wert der wässrigen Lösung wurde mit 4 M Salzsäure auf 2 – 3 eingestellt und diese mit Diethylether (3× 375 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (375 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 2-Methyl-3-oxo-3-(phenylthio)propansäure (**53**) (30.3 g, 144 mmol, 91%) wurde als gelbes, viskoses Öl erhalten und kristallisierte über Nacht zu einem sehr harten, leicht gelben Feststoff.

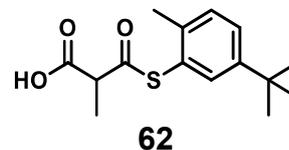
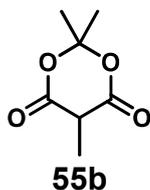
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.55 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.81 (q,  $J = 7.2$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 7.40-7.48 (m, 5H, Ar- $H$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 14.4 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 53.3 (+,  $\text{CH CH}_3$ ), 126.7 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{C-Ar}_1$ ), 129.5 (+,  $\text{C-Ar}_m$ ), 130.0 (+,  $\text{C-Ar}_p$ ), 134.7 (+,  $\text{C-Ar}_o$ ), 174.2 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COOH}$ ), 194.3 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COS}$ ).

**HRMS (APCI+)**:  $m/z$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  233.0243 (berechnet 233.0248).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[112]</sup>

### 6.7.5 3-((5-*tert*-Butyl-2-methylphenyl)thio)-2-methyl-3-oxopropan- säure (62)



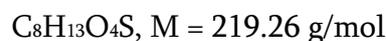
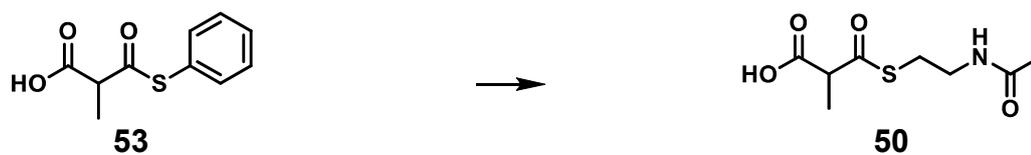
C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>S, M = 280.38 g/mol

2,2,5-Trimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**55b**) (1.00 g, 6.32 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Acetonitril (12 mL) gelöst und das Reaktionsgemisch auf 0 °C gekühlt. DIPEA (1.20 mL, 6.97 mmol, 1.1 Äq.) und Trimethylsilylchlorid (850 µL, 901 mg, 6.63 mmol, 1.05 Äq.) wurden tropfenweise zugegeben und 15 min bei 0 °C gerührt. 5-(*tert*-Butyl)-2-methylthiophenol (**61**) (1.20 mL, 1.18 g, 6.64 mmol, 1.04 Äq.) wurde langsam zugetropft, das Reaktionsgemisch auf 43 °C erwärmt und über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde mit 1 M Salzsäure (7.0 mL) beendet und Diethylether (15 mL) zugegeben. Nach der Phasentrennung wurde die wässrige Phase mit Diethylether (3× 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (2× 50 mL) extrahiert und die vereinigten wässrigen Phasen mit 4 M Salzsäure auf pH 2 eingestellt. Diese wässrige Phase wurde mit Diethylether (3× 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösemittel im Vakuum entfernt. 3-((5-*tert*-Butyl-2-methylphenyl)thio)-2-methyl-3-oxopropansäure (**62**) (1.33 g, 4.74 mmol, 75%/Rohausbeute) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.30 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.56 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 2.30 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 3.82 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H, CHCH<sub>3</sub>), 7.22-7.28 (m, 2H, Ar-*H*), 7.34-7.41 (m, 2H, Ar-*H*).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.4 (+, CHCH<sub>3</sub>), 20.1 (+, ArCH<sub>3</sub>), 31.4 (+, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 34.6 (C<sub>q</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 53.2 (+, CHCH<sub>3</sub>), 125.7 (C<sub>q</sub>, C-Ar<sub>1</sub>), 127.9 (+, C-Ar<sub>p</sub>), 130.7 (+, C-Ar<sub>m</sub>H), 132.8 (+, C-Ar<sub>o</sub>H), 139.2 (C<sub>q</sub>, C-Ar<sub>o</sub>C), 149.9 (C<sub>q</sub>, C-Ar<sub>m</sub>C), 174.8 (C<sub>q</sub>, COOH), 193.8 (C<sub>q</sub>, COS).

UPLC-MS (ESI<sup>+</sup>): *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> 303.21 (berechnet 303.10).

6.7.6 2-Methyl-3-oxopropionsäure(*N*-acetylcysteamin)halbthioester (**50**)

Wasser (10 mL) wurde für 30 min unter Stickstoffeinstrom gerührt. Die Zugabe des Halbthiophenolesters **53** (750 mg, 3.57 mmol, 1.0 Äq.) erfolgte unter Rühren. Natriumhydrogencarbonat (511 mg, 6.09 mmol, 1.7 Äq.) wurde hinzugegeben. Der Stickstoffeinstrom wurde beibehalten und die ausströmende Luft durch eine 5%-ige Wasserstoffperoxid-Lösung geleitet. Die klare Reaktionslösung wurde portionsweise mit *N*-Acetylcysteamin (**58**, HSNAC) (440 mg, 3.69 mmol, 1.0 Äq.) versetzt und die entstehende Suspension für 4 h unter Gaseinstrom gerührt. Die Reaktionssuspension wurde mit 1 M Salzsäure auf pH 2 – 3 eingestellt und mit Dichlormethan (3× 10 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3× 10 mL) extrahiert. Die Ethylacetat-Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 2-Methyl-3-oxopropionsäure(SNAC)halbthioester (**50**) (858 mg, 3.69 mmol, quantitativ) wurde als farbloses Pulver erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.34 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.84 (s, 3H,  $\text{CCH}_3$ ), 3.00 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.29 (dt,  $J = 6.5, 6.5$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.70 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 6.58 (bs, 1H,  $\text{NH}$ ), 9.89 (s, 1H,  $\text{COOH}$ ).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.37 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.92 (s, 3H,  $\text{CCH}_3$ ), 3.12-3.05 (m, 2H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.37 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.85 (q,  $J = 7.2$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ).

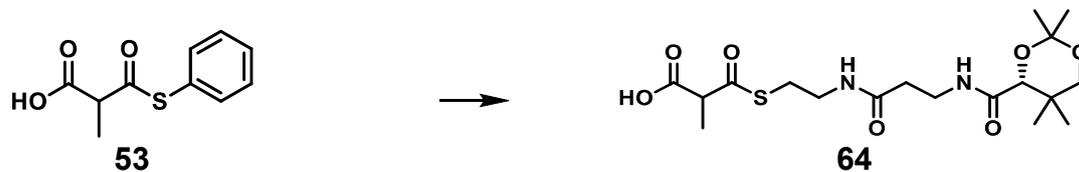
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.48 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.52 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 1.97 (s, 3H,  $\text{CCH}_3$ ), 3.21-3.01 (m, 2H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.50 (dt,  $J = 6.0, 6.0$  Hz, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.71 (q,  $J = 7.2$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 5.89 (bs, 1H,  $\text{NH}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ):  $\delta$  [ppm] = 14.6 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 22.5 (+,  $\text{COCH}_3$ ), 29.2 (–,  $\text{SCH}_2$ ), 39.7 (–,  $\text{NCH}_2$ ), 54.5 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 170.8 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CONH}$ ), 172.5 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COOH}$ ), 197.2 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COS}$ ).

**HRMS (APCI+)**:  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  242.0468 (berechnet 242.0463).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[113]</sup>

### 6.7.7 2-Methyl-3-oxo-3-((2-(3-(2,2,5,5-tetramethyl-1,3-dioxan-4-carbox-amido)propanamido)ethyl)thio)propansäure (**64**)



$C_{18}H_{30}N_2O_7S$ ,  $M = 418.51$  g/mol

Wasser (10 mL) wurde für 30 min unter Stickstoffeinstrom gerührt. Die Zugabe des Malonsäurehalbthiophenolesters **53** (725 mg, 3.45 mmol, 2.4 Äq.) erfolgte unter Rühren. Anschließend wurde Natriumhydrogencarbonat (500 mg, 5.95 mmol, 4.2 Äq.) zugegeben. Der Stickstoffeinstrom blieb erhalten und die ausströmende Luft wurde durch eine 5%-ige Wasserstoffperoxid-Lösung geleitet. Die Reaktionslösung wurde gerührt bis eine klare Lösung vorlag. Danach wurde das *O,O'*-Isopropylidenpantethein **50** (455 mg, 1.43 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und 28 h unter Gaseinstrom gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 1 M Salzsäure auf pH 2 eingestellt und mit Dichlormethan (3× 20 mL) und Ethylacetat (3× 20 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde im Vakuum eingedunstet und der Rückstand mit Acetonitril (3× 10 mL) gewaschen. Die Acetonitril-Phasen wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Malonsäurepantetheinhalbthioester **64** (32.2 mg, 80  $\mu$ mol, 2.2%) wurde als farbloses Öl erhalten.

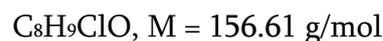
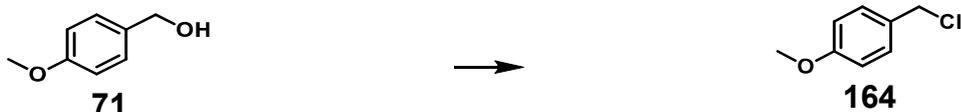
$^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3CN$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.85 (s, 3H,  $CHC(CH_3)_2$ ), 0.88 (s, 3H,  $CHC(CH_3)_2$ ), 1.31 (s, 3H,  $OC(CH_3)_2$ ), 1.34 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $CHCH_3$ ), 1.34 (s, 3H,  $OC(CH_3)_2$ ), 2.38 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H,  $CH_2CO$ ), 3.09-2.93 (m, 2H,  $SCH_2$ ), 3.52-3.26 (m, 6H,  $NCH_2$ ,  $NCH_2$ ,  $OCH_2$ ), 3.71 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H,  $CHCH_3$ ), 3.93 (s, 1H,  $OCH$ ), 7.10 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H,  $NH$ ), 7.66-7.49 (m, 1H,  $NH$ ).

$^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 14.2 (+,  $OC(CH_3)_2$ ), 14.5 (+,  $CHCH_3$ ), 20.7 (+,  $CHC(CH_3)_2$ ), 21.4 (+,  $CHC(CH_3)_2$ ), 29.3 (-,  $SCH_2$ ), 31.2 (-,  $COCH_2$ ), 36.2 (-,  $NCH_2$ ), 38.8 (-,  $NCH_2$ ), 40.0 ( $C_q$ ,  $CHC(CH_3)_2$ ), 54.6 (+,  $CHCH_3$ ), 54.9 ( $C_q$ ,  $OC(CH_3)_2$ ), 70.6 (-,  $OCH_2$ ), 77.4 (+,  $OCH$ ), 170.9 ( $C_q$ ,  $CONH$ ), 171.1 ( $C_q$ ,  $CONH$ ), 172.4 ( $C_q$ ,  $COOH$ ), 197.6 ( $C_q$ ,  $COS$ ).

HRMS (ESI+):  $m/z$  [ $M$ -Aceton+ $H$ ] $^+$  379.1530 (berechnet 379.1533).

## 6.8 Synthesen für Carbonsäurebausteine

### 6.8.1 4-Methoxybenzylchlorid (**164**)



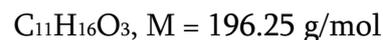
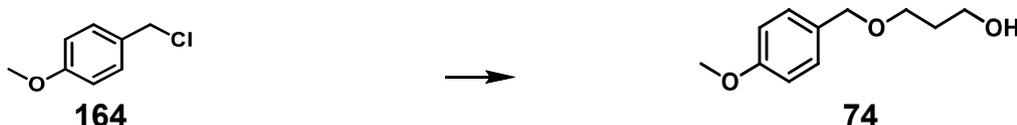
4-Methoxybenzylalkohol (**71**) (12.0 mL, 13.3 g, 96.7 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Dichlormethan (300 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Eine Lösung von Thionylchlorid (8.8 mL, 14.4 g, 121 mmol, 1.25 Äq.) und Benzotriazol (14.4 g, 121 mmol, 1.25 Äq.) in absolutem Dichlormethan (50 mL) wurde tropfenweise unter Rühren zum Alkohol **71** gegeben und 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Ein farbloser Niederschlag entstand, der abfiltriert und mit kaltem Dichlormethan gewaschen wurde. Das Filtrat wurde im Vakuum vom Lösungsmittel befreit wurde. 4-Methoxybenzylchlorid (**164**) (15.0 g, 95.5 mmol, 99%) wurde als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 3.81 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.57 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 6.85-6.92 (m, 2H,  $\text{Ar}_m\text{-H}$ ), 7.28-7.35 (m, 2H,  $\text{Ar}_o\text{-H}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 46.5 (–,  $\text{CH}_2$ ), 55.5 (+,  $\text{CH}_3$ ), 114.3(+,  $\text{C-Ar}_m$ ), 129.8 (+,  $\text{C-Ar}_o$ ), 130.2 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{C-Ar}_1$ ), 159.8 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{C-Ar}_p$ ).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[160]</sup>

### 6.8.2 3-((4-Methoxybenzyl)oxy)-1-propanol (**74**)



Eine Lösung von 1,3-Propandiol (4.2 mL, 4.45 g, 58.5 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem Dimethylformamid (400 mL) wurde auf 0 °C gekühlt und unter Rühren mit Natriumhydrid (60% in Mineralöl, 3.47 g, 86.8 mmol, 1.5 Äq.) in kleinen Portionen versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 1 h bei 0 °C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde auf 0 °C gekühlt, 4-Methoxybenzylchlorid (**164**) (8.7 mL, 10.0 g, 64.2 mmol, 1.1 Äq.)

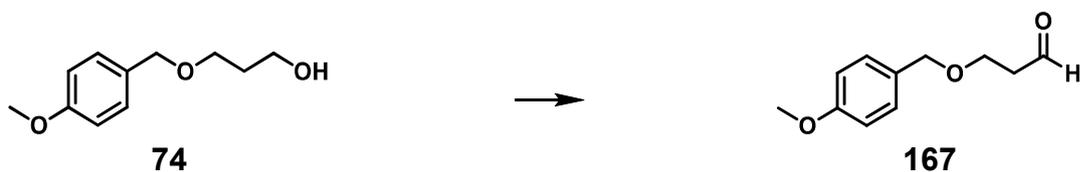
zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (680 mL) beendet und bis zum Ende der Gasentwicklung 1 h gerührt. Die Extraktion der wässrigen Phase erfolgte mit Diethylether (2× 680 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (1× 270 mL), Wasser (2× 270 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (2× 270 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der ölige Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (PE/EE 10:1 -> 5:1 -> 2:1) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde 3-((4-Methoxybenzyl)oxy)-1-propanol (**74**) (5.71 g, 29.1 mmol, 50%) als leicht gelbes Öl erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.85 (tt,  $J = 5.8, 5.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 2.25 (s, 1H, OH), 3.64 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H,  $\text{CHOH}$ ), 3.77 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.80 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.45 (s, 2H,  $\text{CCHO}$ ), 6.82-6.94 (m, 2H,  $\text{Ar}_m\text{-H}$ ), 7.20-7.31 (m, 2H,  $\text{Ar}_o\text{-H}$ ).

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.20 (PE/EE 2:1).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[161]</sup>

### 6.8.3 3-((4-Methoxybenzyl)oxy)-1-propanal (**167**)



$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$ ,  $M = 194.23$  g/mol

Dimethylsulfoxid (3.1 mL, 3.36 g, 42.9 mmol, 4.2 Äq.) wurde in absolutem Dichlormethan (30 mL) vorgelegt und auf  $-78$  °C gekühlt. Oxalylchlorid (1.76 mL, 2.60 g, 20.5 mmol, 2.0 Äq.) wurde über 15 min zugetropft und für 50 min bei  $-78$  °C gerührt. Der primäre Alkohol **74** (2.0 g, 10.2 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Dichlormethan (6.0 mL) gelöst, zum Reaktionsgemisch getropft und 1.5 h bei  $-78$  °C gerührt. Die Zugabe von DIPEA (9.4 mL, 7.09 g, 54.8 mmol, 5.4 Äq.) beendet die Reaktion und die Lösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt. Wasser (50 mL) wurde hinzugegeben und die wässrige Lösung mit Dichlormethan (3× 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (3× 50 mL) und gesättigter

Natriumchlorid-Lösung (1× 50 mL) gewaschen. Danach wurden die organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (H/EE 5:1). 3-((4-Methoxybenzyl)oxy)-1-propanal (**167**) (1.67 g, 8.59 mmol, 84%) wurde als leicht gelbes Öl isoliert.

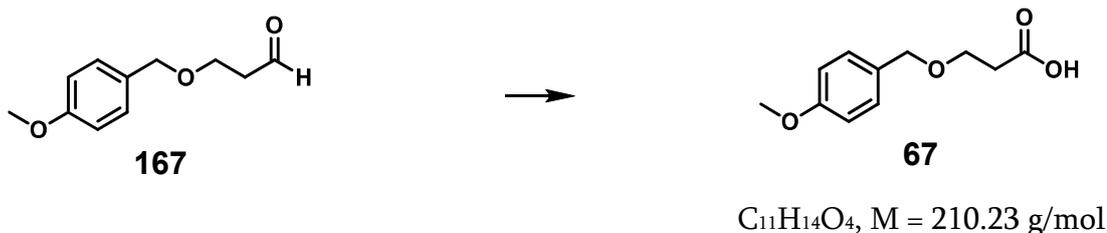
$^1\text{H NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.68 (td,  $J$  = 6.1, 1.8 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 3.78 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.80 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.46 (s, 2H,  $\text{CCH}_2\text{O}$ ), 6.83-6.93 (m, 2H,  $\text{Ar}_m\text{-H}$ ), 7.19-7.31 (m, 2H,  $\text{Ar}_o\text{-H}$ ), 9.78 (t,  $J$  = 1.8 Hz, 1H,  $\text{CHO}$ ).

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.60 (H/EE 1:1).

**UPLC-MS (ESI+):**  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  217.18 (berechnet 217.22).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[162]</sup>

#### 6.8.4 3-((4-Methoxybenzyl)oxy)propansäure (**67**)



Aldehyd **167** (2.27 g, 11.7 mmol, 1. Äq.) wurde in einem Gemisch von *tert*-Butanol (46 mL) und gesättigtem Phosphat-Puffer (11.5 mL, pH 7) gelöst. Nach der Zugabe von 2-Methyl-2-buten (28.0 mL, 18.5 g, 56.0 mmol, 4.8 Äq.) wurde die Lösung auf 0 °C gekühlt und Natriumchlorit (80%, 4.10 g, 36.3 mmol, 3.1 Äq.) unter Rühren hinzugegeben. Die entstandene gelbe Suspension wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Am folgenden Tag wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt und der Rückstand mit 0.2 M Salzsäure (125 mL, 25.0 mmol, 2.1 Äq.) versetzt. Die Extraktion erfolgte mit Ethylacetat (4× 110 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 3-((4-Methoxybenzyl)oxy)propansäure (**67**) (2.47 g, 11.7 mmol, quantitativ/Rohausbeute) wurde als farbloses Öl erhalten.

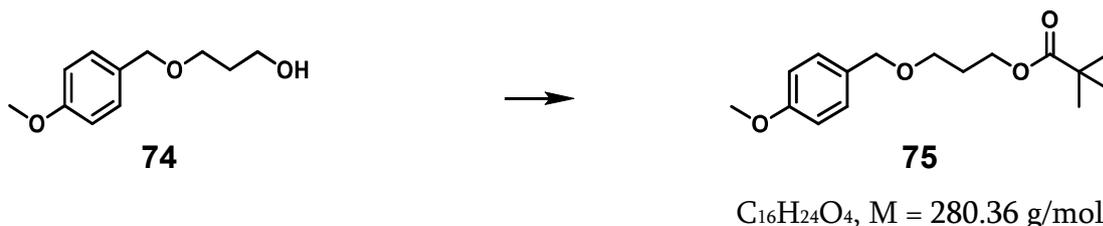
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.65 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 3.72 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.80 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 4.48 (s, 2H,  $\text{CCH}_2\text{O}$ ), 6.91-6.85 (m, 2H,  $\text{Ar}_m\text{-H}$ ), 7.23-7.28 (m, 2H,  $\text{Ar}_o\text{-H}$ ).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 35.0 (–, CH<sub>2</sub>COOH), 55.4 (+, OCH<sub>3</sub>), 65.0 (–, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 73.0 (–, CCH<sub>2</sub>O), 114.0 (+, C-Ar<sub>m</sub>), 129.5 (+, C-Ar<sub>o</sub>), 130.0 (C<sub>q</sub>, C-Ar<sub>1</sub>), 159.4 (C<sub>q</sub>, C-Ar<sub>p</sub>), 177.4 (C<sub>q</sub>, COOH).

R<sub>F</sub>-Wert: 0.28 (H/EE 2:1)

HRMS (ESI–): m/z [M–H]– 209.0807 (berechnet 209.0808).

### 6.8.5 3-((4-Methoxybenzyl)oxy)propylpivalat (75)

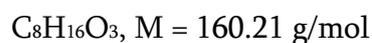
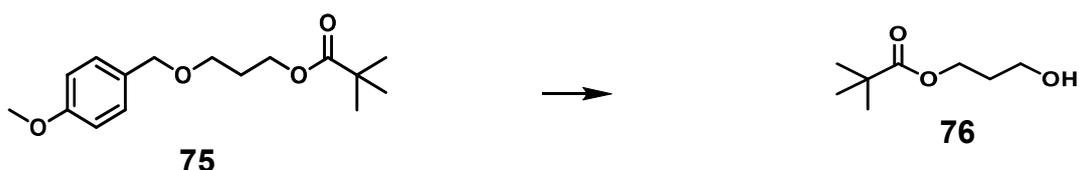


Der primäre Alkohol **74** (840 mg, 4.28 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Pyridin (12 mL) vorgelegt, auf 0 °C gekühlt und unter Rühren tropfenweise mit Pivalinsäurechlorid (540 µL, 529 mg, 4.38 mmol, 1.02 Äq.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 1.5 h bei 0 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Eis beendet und 30 min gerührt. Die Extraktion der Reaktionslösung erfolgte mit Diethylether (3× 10 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 4 M Salzsäure (10 mL), gesättigter Natriumchlorid-Lösung (10 mL), gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 mL) und erneut gesättigter Natriumchlorid-Lösung (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (H/EE: 9:1). 3-((4-Methoxybenzyl)oxy)propylpivalat (**75**) (941 mg, 3.36 mmol, 78%) wurde als farbloses Öl isoliert.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.17 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.92 (tt, *J* = 6.4, 6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.51 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.16 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OOC), 4.43 (s, 2H, CCH<sub>2</sub>O), 6.85–6.89 (m, 2H, Ar<sub>m</sub>-H), 7.23–7.27 (m, 2H, Ar<sub>o</sub>-H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 27.3 (+, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 29.2 (–, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 38.9 (C<sub>q</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 55.4 (+, OCH<sub>3</sub>), 61.6 (–, CH<sub>2</sub>OOC), 66.5 (–, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 72.8 (–, CCH<sub>2</sub>O), 113.9 (+, C-Ar<sub>m</sub>), 129.4 (+, C-Ar<sub>o</sub>), 130.5 (C<sub>q</sub>, C-Ar<sub>1</sub>), 159.3 (C<sub>q</sub>, C-Ar<sub>p</sub>), 178.7 (C<sub>q</sub>, COO).

R<sub>F</sub>-Wert: 0.30 (H/EE 9:1).

6.8.6 3-Hydroxypropylpivalat (**76**)

Der PMB-geschützte Alkohol **75** (800 mg, 2.84 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Dichlormethan (40 mL) gelöst und unter Rühren mit DDQ (1.00 g, 4.41 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. Nach 1 h Rühren wurde Wasser (1.20 mL, 1.20 g, 66.5 mmol, 23 Äq.) zugegeben und 1 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (100 mL) versetzt, die Phasen voneinander getrennt und die wässrige Phase mit Diethylether (3× 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung (2× 100 mL), Wasser (100 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (100 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt (H/EE: 4:1). 3-Hydroxypropylpivalat (**76**) (360 mg, 2.25 mmol, 79%) wurde als farbloses Öl isoliert.

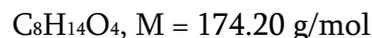
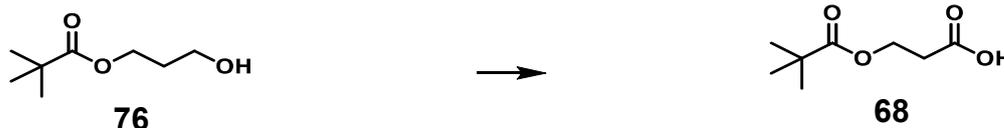
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.20 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.87 (tt,  $J = 6.0, 6.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.98 (s, 1H, OH), 3.67 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 4.23 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{OOC}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 27.3 (+,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 32.0 (–,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 38.9 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 59.3 (–,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 61.3 (–,  $\text{CH}_2\text{OOC}$ ), 179.3 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COO}$ ).

**Re-Wert:** 0.15 (H/EE: 4:1).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[163]</sup>

### 6.8.7 3-(Pivaloyloxy)propansäure (68)

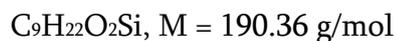
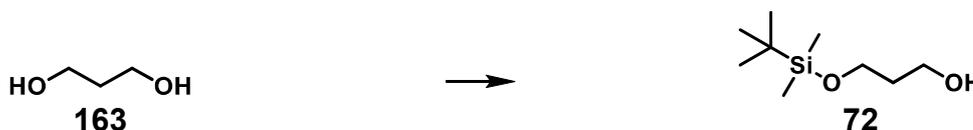


Der primäre Alkohol **76** (410 mg, 2.56 mmol, 1.0 Äq.) wurde in nassem Acetonitril (16 mL, 8 mL/L Wasser) gelöst. 19.5 mL der Reaktionslösung (2.1 mM Chrom(VI)-oxid: 41  $\mu$ mol, 1.6 mol%; 0.49 M Periodsäure: 9.56 mmol, 3.8 Äq.) wurden unter Rühren bei 0 °C über 25 min zugetropft. Die Reaktion wurde nach 2 h durch die Zugabe von gesättigtem Phosphat-Puffer (16 mL, pH 3.5) beendet. Die Reaktionslösung wurde mit Ethylacetat (3x 47 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (3x 16 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. 3-(Pivaloyloxy)propansäure (**68**) (410 mg, 2.35 mmol, 92%/Rohausbeute) wurde als leicht gelbes Öl isoliert.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.18 (s, 9H,  $C(CH_3)_3$ ), 2.70 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $CH_2COOH$ ), 4.33 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $CH_2OOC$ ).

$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 27.2 (+,  $C(CH_3)_3$ ), 33.8 (–,  $CH_2COOH$ ), 38.8 ( $C_q$ ,  $\alpha(CH_3)_3$ ), 59.5 (–,  $CH_2OOC$ ), 176.9 ( $C_q$ ,  $COOH$ ), 178.5 ( $C_q$ ,  $CCOO$ ).

### 6.8.8 3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-1-propanol (72)



Absolutes Tetrahydrofuran (45 mL) wurde vorgelegt und Natriumhydrid (60% in Mineralöl, 1.06 g, 26.5 mmol, 1.0 Äq.) darin suspendiert. 1,3-Propandiol (**163**) (2.00 mL, 2.12 g, 27.9 mmol, 1.1 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben und 45 min gerührt. Die Zugabe von *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (3.90 g, 25.9 mmol, 1.0 Äq.) erfolgte portionsweise und 45 min gerührt. Die Reaktion wurde durch gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (30 mL) beendet und die wässrige Phase mit Diethylether (4x 25 mL) extrahiert. Die

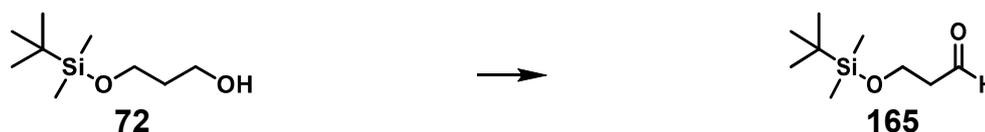
vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (2× 30 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (2× 30 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-1-propanol (**72**) (4.82 g, 25.3 mmol, 98%/Rohausbeute) wurde als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.08 (s, 6H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.90 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.78 (tt,  $J=5.6, 5.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.81 (t,  $J=5.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.84 (t,  $J=5.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{OSi}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = -5.4 (+,  $\text{SiCH}_3$ ), 18.3 ( $\text{C}_q$ , C), 26.0 (+,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 34.3 (-,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 62.7 (-,  $\text{CH}_2\text{OSi}$ ), 63.2 (-,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[164]</sup>

### 6.8.9 3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)propanal (**165**)

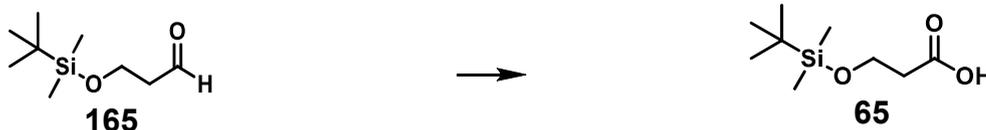


$\text{C}_9\text{H}_{20}\text{O}_2\text{Si}$ ,  $M = 188.34$  g/mol

Dimethylsulfoxid (5.40 mL, 5.94 g, 76.0 mmol, 5.2 Äq.) wurde in absolutem Dichlormethan (20 mL) vorgelegt und auf  $-78$  °C gekühlt. Innerhalb von 15 min wurde Oxalylchlorid (3.00 mL, 4.44 g, 35.0 mmol, 2.4 Äq.) hinzugegeben und für 30 min gerührt. Anschließend erfolgte die Zugabe des mono-geschützten Diols **72** (2.80 g, 14.7 mmol, 1.0 Äq., gelöst in 11.2 mL absolutem Dichlormethan), gefolgt von 1.5 h Rühren bei  $-78$  °C. Die Zugabe von DIPEA (16.8 mL, 98.4 mmol, 6.7 Äq.) beendete die Reaktion und die Lösung wurde auf Raumtemperatur gebracht. Wasser (100 mL) wurde hinzugegeben und die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (3× 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser (3× 100 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (100 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach der Reinigung mittels Säulenchromatographie (H/EE 9:1) wurde 3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)propanal (**165**) (2.50 g, 13.3 mmol, 90%) als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.06 (s, 6H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.88 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.60 (td,  $J = 6.0, 2.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 3.99 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 9.80 (t,  $J = 2.1$  Hz, 1H,  $\text{CHO}$ ). Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[164]</sup>

### 6.8.10 3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)propansäure (**65**)



$\text{C}_9\text{H}_{20}\text{O}_3\text{Si}$ ,  $M = 204.34$  g/mol

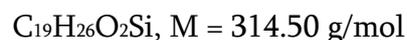
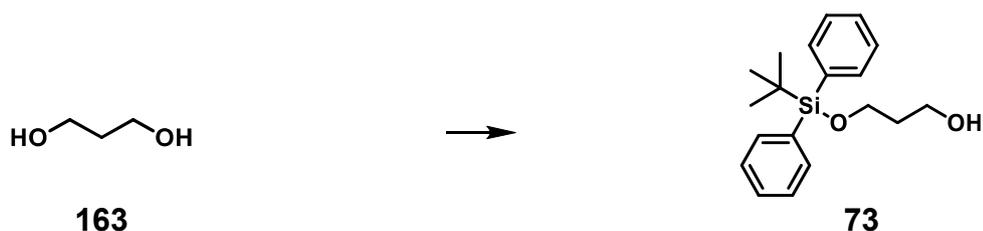
Der Aldehyd **165** (200 mg, 1.06 mmol, 1.0 Äq.) wurde in *tert*-Butanol (4.5 mL) und gesättigtem Phosphatpuffer (1.2 mL, pH 7) vorgelegt. 2-Methyl-2-buten (2.90 mL, 5.80 mmol, 5.5 Äq.) wurde hinzugegeben und die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Nach der Zugabe von Natriumchlorit (380 mg, 4.20 mmol, 4.0 Äq.) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. *Tert*-Butanol wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 0.2 M Salzsäure (10 mL) gelöst und die Lösung mit Ethylacetat (4× 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)propansäure (**65**) (243 mg, 1.06 mmol, quantitativ/Rohausbeute) wurde als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.08 (s, 6H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.89 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 2.58 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 3.91 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = -5.4 (+,  $\text{SiCH}_3$ ), 18.3 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{SiC}$ ), 25.9 (+,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 37.5 (-,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 58.9 (-,  $\text{OCH}_2$ ), 176.0 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COOH}$ ).

**UPLC-MS (ESI-)**:  $m/z$   $[\text{M}-\text{H}]^-$  203.17 (berechnet 203.11).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[73]</sup>

6.8.11 3-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)-1-propanol (**73**)

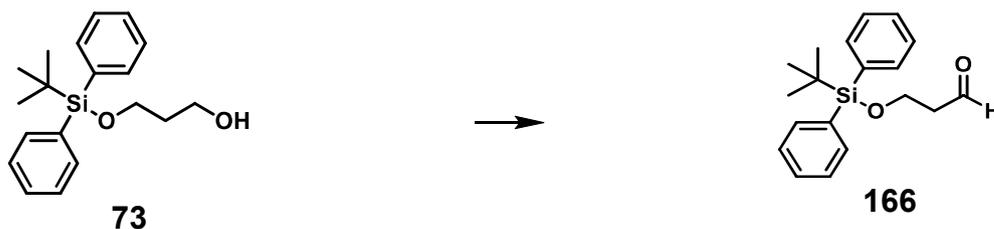
Natriumhydrid (60% in Mineralöl, 1.05 g, 26.3 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Tetrahydrofuran (45 mL) vorgelegt, mit 1,3-Propandiol (**163**) (2.00 mL, 2.12 g, 27.9 mmol, 1.1 Äq.) versetzt und 45 min gerührt. *tert*-Butyldiphenylsilylchlorid (7.00 mL, 7.40 g, 26.9 mmol, 1.0 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben und die Reaktionslösung für 45 min gerührt. Die Reaktion wurde mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (30 mL) beendet und die wässrige Phase mit Diethylether (4× 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurde mit Wasser (2× 25 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (2× 25 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 3-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)-1-propanol (**73**) (8.64 g, 27.4 mmol, quantitativ/Rohausbeute) wurde als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.06 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 1.81 (tt,  $J = 5.7, 5.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.85 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.85 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{OSi}$ ), 7.37-7.47 (m, 6H,  $\text{Ar}_o\text{-H}$ ,  $\text{Ar}_p\text{-H}$ ), 7.66-7.70 (m, 4H,  $\text{Ar}_m\text{-H}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 19.2 ( $\text{C}_q$ , SiC), 27.0 (+,  $\text{CH}_3$ ), 34.3 (-,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 62.2 (-,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 63.5 (-,  $\text{CH}_2\text{OSi}$ ), 127.9 (+,  $\text{C-Ar}_p$ ), 129.9 (+,  $\text{C-Ar}_m$ ), 133.4 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{C-Ar}_1$ ), 135.7 (+,  $\text{C-Ar}_o$ ).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[165]</sup>

### 6.8.12 3-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)propanal (**166**)



$C_{19}H_{14}O_2Si$ ,  $M = 312.48$  g/mol

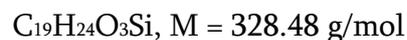
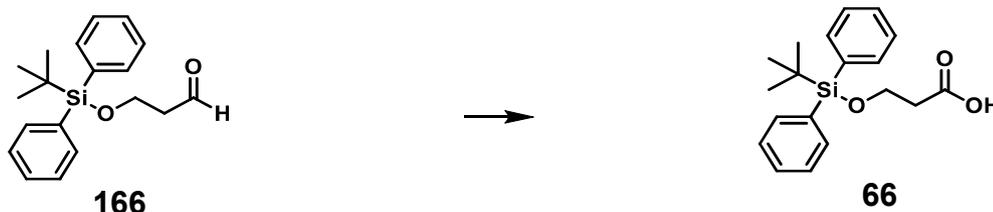
Dimethylsulfoxid (8.20 mL, 115 mmol, 5.2 Äq.) in absolutem Dichlormethan (85 mL) wurde bei  $-78$  °C über 15 min tropfenweise mit Oxalylchlorid (4.60 mL, 53.6 mmol, 2.4 Äq.) versetzt und für 30 min gerührt. Der mono-geschützten Diols **73** (7.00 g, 22.3 mmol, 1.0 Äq., gelöst in 17 mL absolutem Dichlormethan) wurde hinzugegeben und 1.5 h bei  $-78$  °C gerührt. DIPEA (25.5 mL, 149 mmol, 6.7 Äq.) beendete die Reaktion und die Lösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt. Wasser (150 mL) wurde zugesetzt und die Extraktion der wässrigen Phase erfolgte mit Dichlormethan ( $3 \times 100$  mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser ( $3 \times 100$  mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung ( $1 \times 100$  mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 3-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)propanal (**166**) (7.80 g, 24.9 mmol, quantitativ/Rohausbeute) wurde als farbloses Öl erhalten.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.04 (s, 9H,  $CH_3$ ), 2.61 (td,  $J = 6.0, 2.2$  Hz, 2H,  $CH_2CHO$ ), 4.02 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $OCH_2$ ), 7.36-7.47 (m, 6H,  $Ar_o-H$ ,  $Ar_p-H$ ), 7.64-7.68 (m, 4H,  $Ar_m-H$ ), 9.82 (t,  $J = 2.2$  Hz, 1H,  $CHO$ ).

$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 19.3 ( $C_q$ ,  $SiC$ ), 26.9 (+,  $CH_3$ ), 46.5 (–,  $CH_2CHO$ ), 58.4 (–,  $CH_2O$ ), 127.9 (+,  $C-Ar_p$ ), 130.0 (+,  $C-Ar_m$ ), 133.4 ( $C_q$ ,  $C-Ar_1$ ), 135.7 (+,  $C-Ar_o$ ), 202.2 (+,  $CHO$ ).

UPLC-MS (ESI+):  $m/z$   $[M+Na]^+$  335.28 (berechnet 335.47).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[166]</sup>

6.8.13 3-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)propansäure (**66**)

Der Aldehyd **166** (670 mg, 2.14 mmol, 1.0 Äq.) wurde in einem Gemisch aus *tert*-Butanol (8.5 mL) und gesättigtem Phosphatpuffer (2.3 mL, pH 7) gelöst. Nach der Zugabe von 2-Methyl-2-buten (5.30 mL, 10.6 mmol, 2.9 Äq.) wurde die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt. Natriumchlorit (780 mg, 8.62 mmol, 4.0 Äq.) wurde unter Rühren hinzugegeben und die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt. *Tert*-Butanol wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in 0.2 M Salzsäure (20 mL) aufgenommen und die Lösung mit Ethylacetat (4× 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 3-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)propansäure (**66**) (687 mg, 2.09 mmol, 98%/Rohausbeute) wurde als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.04 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 2.61 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 3.95 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 7.36-7.46 (m, 6H,  $\text{Ar}_o\text{-H}$ ,  $\text{Ar}_p\text{-H}$ ), 7.65-7.68 (m, 4H,  $\text{Ar}_m\text{-H}$ ).

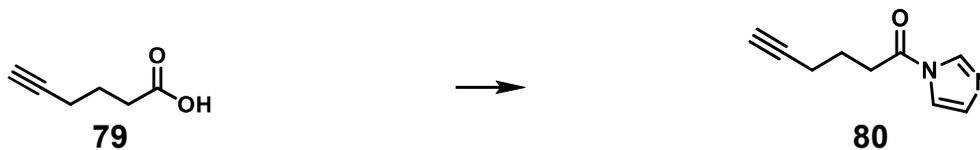
$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 19.3 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{SiC}$ ), 26.99 (+,  $\text{CH}_3$ ), 37.4 (–,  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ), 59.7 (–,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 127.9 (+,  $\text{C-Ar}_p$ ), 130.0 (+,  $\text{C-Ar}_m$ ), 133.2 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{C-Ar}_1$ ), 135.7 (+,  $\text{C-Ar}_o$ ), 176.5 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COOH}$ ).

**UPLC-MS (ESI+)**:  $m/z$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  351.29 (berechnet 351.14).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[167]</sup>

## 6.9 Synthesen für $\beta$ -Ketothiophenolester

### 6.9.1 1-(1*H*-Imidazol-1-yl)hex-5-in-1-on (**80**)



$C_9H_{10}N_2O$ ,  $M = 162.19$  g/mol

5-Hexinsäure (**79**) (109  $\mu$ L, 1.00 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Acetonitril (6.0 mL) gelöst und mit CDI (312 mg, 1.92 mmol, 1.9 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde für 2 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und das Imidazol **80** wurde als farbloses Öl erhalten. Die analysierte Probe enthielt zusätzlich Imidazol und *N,N'*-Carbonyldiimidazol, die beide aus der Reaktion stammten.

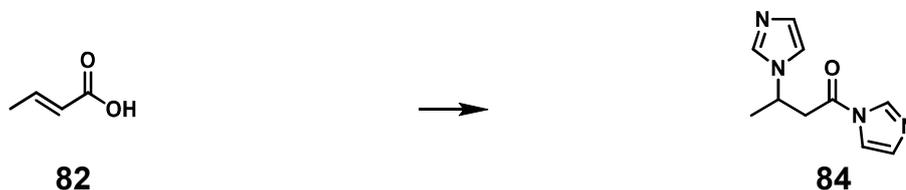
$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.02 (t,  $J = 2.6$  Hz, 1H, CCH), 1.99-2.06 (m, 2H,  $CH_2CH_2CH_2$ ), 2.38 (td,  $J = 6.7, 2.6$  Hz, 2H, CCH<sub>2</sub>), 3.04 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H, CHCO), 7.08–7.15 (m, 1H, CONCHCH), 7.50 (t,  $J = 1.5$  Hz, 1H, CONCHCH), 8.20 (s, 1H, CHNCHN).

$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 17.6 (–, CCH<sub>2</sub>), 18.2 (–,  $CH_2CH_2CH_2$ ), 33.6 (–,  $CH_2CO$ ), 70.2 (+, CCH), 82.7 (C<sub>q</sub>, CCH), 116.2 (+, CONCHCH), 131.1 (+, CONCHCH), 135.1, 136.2 (+, CONCHN), 169.1 (C<sub>q</sub>, CO).

HRMS (ESI+):  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> 163.0864 (berechnet 163.0866).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[168]</sup>

### 6.9.2 1,3-Di(1*H*-imidazol-1-yl)1-butanon (**84**)



$C_{10}H_{12}N_4O$ ,  $M = 204.23$  g/mol

Crotonsäure (**82**) (86.0 mg, 1.00 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Acetonitril (6.0 mL) gelöst und mit CDI (310 mg, 1.91 mmol, 1.9 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde für 2 h gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Untersuchung der Aktivierung der Carbonsäure **82** identifizierte das Diimidazol-Produkt **84** als Hauptbestandteil. Die

analysierte Probe enthielt zusätzlich Imidazol und *N,N'*-Carbonyldiimidazol, die beide aus der Reaktion stammten.

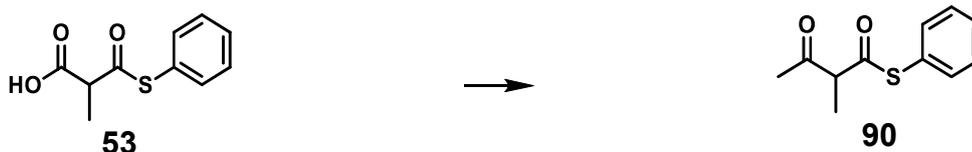
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.69 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.25 (dd,  $J = 17.3, 6.0$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3.34 (dd,  $J = 17.3, 7.0$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 4.94-5.03 (m, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 7.08 (s, 1H,  $\text{CONCHCH}$ ), 7.11 (dd,  $J = 3.4, 2.5$  Hz, 1H,  $\text{CONCHCH}$ ), 7.41 (t,  $J = 1.5$  Hz, 1H,  $\text{CHNCHCH}$ ), 7.53 (t,  $J = 1.5$  Hz, 1H,  $\text{CHNCHCH}$ ), 8.11 (s, 1H,  $\text{CHNCHN}$ ), 8.20 (s, 1H,  $\text{CONCHN}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 22.7 (+,  $\text{CH}_3$ ), 43.5 (-,  $\text{CH}_2$ ), 48.9 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 130.2 (+,  $\text{CHNCHCH}$ ), 131.8 (+,  $\text{CHNCHCH}$ ), 132.2 (+,  $\text{CONCHCH}$ ), 135.0 (+,  $\text{CONCHCH}$ ), 136.0 (+,  $\text{CONCHN}$ ), 138.0 (+,  $\text{CHNCHN}$ ), 166.2 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CO}$ ).

**HRMS (ESI+)**:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  205.1080 (berechnet 205.1084).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[120]</sup>

### 6.9.3 2-Methyl-3-oxobutansäurethiophenolester (90)



$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{S}$ ,  $M = 208.28$  g/mol

Essigsäure (180  $\mu\text{L}$ , 189 mg, 3.05 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Acetonitril (25 mL) vorgelegt. CDI (713 mg, 4.40 mmol, 1.4 Äq.) wurde hinzugegeben und die Lösung A für 2 h gerührt. In einer parallelen Reaktion wurde Methylmalonsäurehalbthiophenolester (**53**) (1.41 g, 6.71 mmol, 2.2 Äq.) in absolutem Acetonitril (25 mL) gelöst und mit Magnesiumbromiddiethyletherat (1.04 g, 4.02 mmol, 1.3 Äq.) versetzt. Diese Reaktionslösung B wurde für 1 h gerührt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand der Reaktion B wurde mit Lösung A versetzt. Die entstehende Suspension wurde 18 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.5 M Salzsäure (40 mL) und Ethylacetat (40 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3 $\times$  40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (40 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet,

filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 2-Methyl-3-oxobutansäurethiophenolester (**90**) (566 mg, 2.72 mmol, 89%) wurde mittels Säulenchromatographie (H/EE 19:1) als farbloses Öl isoliert.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.46 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.98 (s, 3H, Enol,  $\text{CCH}_3$ ), 2.04 (s, 3H, Enol,  $\text{CCH}_3$ ), 2.28 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 3.83 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H,  $\text{CH}$ ), 7.39-7.47 (m, 5H,  $\text{Ar-H}$ ), 13.38 (d,  $J = 0.7$  Hz, 1H, Enol,  $\text{OH}$ ).

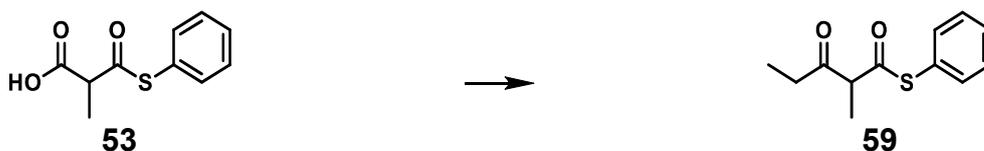
$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 13.8 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 28.6(+,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 61.9 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 126.9 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{C-Ar}_1$ ), 129.5 (+,  $\text{C-Ar}_m$ ), 129.9 (+,  $\text{C-Ar}_p$ ), 134.6 (+,  $\text{C-Ar}_o$ ), 195.2 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CO}$ ), 202.5 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.15 (H/EE 19:1).

**HRMS (ESI+):**  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  209.0628 (berechnet 209.0636).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[169]</sup>

#### 6.9.4 2-Methyl-3-oxopentansäurethiophenolester (**59**)



$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{S}$ ,  $M = 222.30$  g/mol

Propionsäure (**57**) (420  $\mu\text{L}$ , 416 mg, 5.44 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Tetrahydrofuran (54 mL) gelöst und unter Rühren mit CDI (1.05 g, 6.48 mmol, 1.2 Äq.) versetzt. Die Lösung A wurde für 2 h gerührt. Für die Reaktionslösung B wurde Methylmalonsäurehalbthiophenolester (**53**) (2.27 g, 10.8 mmol, 2.0 Äq.) in absolutem Acetonitril (54 mL) gelöst. Magnesiumbromiddiethyletherat (1.67 g, 6.47 mmol, 1.2 Äq.) wurde zugegeben und 1 h gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel der Reaktion A und B im Vakuum entfernt. Der Rückstand A wurde in absolutem Acetonitril (54 mL) gelöst und zum Rückstand B überführt. Die Suspension wurde 18 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.5 M Salzsäure (100 mL) und Ethylacetat (100 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3 $\times$  100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (100 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im

Vakuum entfernt. Nach Reinigung mittels Säulenchromatographie (H/EE 9:1) wurde 2-Methyl-3-oxopentansäurethiophenolester (**59**) (1.23 g, 5.44 mmol, quant.) als farbloses Öl erhalten.

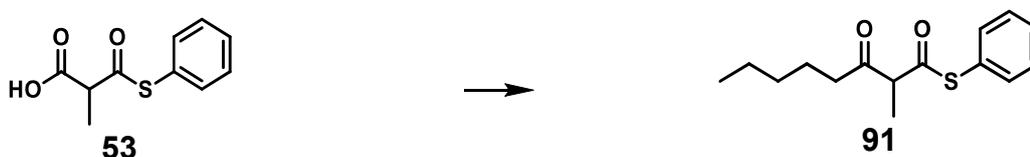
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.09 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.45 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.98 (s, 3H, Enol,  $\text{CCH}_3$ ), 2.34 (q,  $J = 7.6$  Hz, 1H, Enol,  $\text{CHCH}_3$ ), 2.51-2.72 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.86 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 7.39-7.47 (m, 5H, Ar-H), 13.47 (t,  $J = 0.9$  Hz, 1H, Enol, OH).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.9 (+,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 13.9 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 34.9 (-,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 61.0 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 127.0 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{C-Ar}_1$ ), 129.5 (+,  $\text{C-Ar}_m$ ), 129.9 (+,  $\text{C-Ar}_p$ ), 134.6 (+,  $\text{C-Ar}_o$ ), 195.2 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COS}$ ), 205.2 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ).

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.12 (H/EE 9:1).

**HRMS (ESI+):** m/z  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  245.0609 (berechnet 245.0612).

### 6.9.5 2-Methyl-3-oxooctansäurethiophenolester (**91**)



$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{S}$ ,  $M = 264.38$  g/mol

Hexansäure (108  $\mu\text{L}$ , 99 mg, 0.83 mmol, 1.0 Äq.) wurden für Reaktion A in absolutem Acetonitril (6.0 mL) vorgelegt, unter Rühren mit CDI (225 mg, 1.39 mmol, 1.7 Äq.) versetzt und für 2 h gerührt. Für Reaktion B wurde Methylmalonsäurehalbthiophenolester (**53**) (440 mg, 2.09 mmol, 2.5 Äq.) in absolutem Acetonitril (6.0 mL) gelöst und Magnesiumbromiddiethyletherat (310 mg, 1.20 mmol, 1.4 Äq.) zugegeben. Die Suspension B wurde für 1 h gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit der Reaktionslösung A versetzt. Der vereinigte Ansatz wurde 18 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.5 M Salzsäure (8.0 mL) gelöst. Die Lösung wurde mit Ethylacetat ( $4 \times 15$  mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (15 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung mittels

Säulenchromatographie (H/EE 19:1) ergab 2-Methyl-3-oxooctansäurethiophenolester (**91**) (155 mg, 0.59 mmol, 71%) als farbloses Öl.

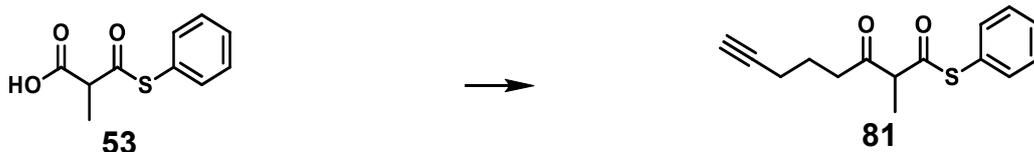
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.89 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.20-1.38 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.44 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.56-1.67 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 1.98 (s, 3H, Enol,  $\text{CCH}_3$ ), 2.26-2.34 (m, 1H, Enol,  $\text{CH}_2\text{CHCO}$ ), 2.58 (qt,  $J = 17.5, 7.3$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.85 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 7.37-7.50 (m, 5H, Ar-H), 13.46 (t,  $J = 1.1$  Hz, 1H, Enol, OH).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 13.8 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 14.1 (+,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 22.6 (-,  $\text{CH}_2$ ), 23.4 (-,  $\text{CH}_2$ ), 31.3 (-,  $\text{CH}_2$ ), 41.5 (-,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 61.3 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 127.0 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{C-Ar}_1$ ), 129.5 (+,  $\text{C-Ar}_m$ ), 129.9 (+,  $\text{C-Ar}_p$ ), 134.6 (+,  $\text{C-Ar}_o$ ), 195.1 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COS}$ ), 204.8 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ).

R<sub>f</sub>-Wert: 0.31 (H/EE 19:1).

HRMS (ESI<sup>+</sup>): m/z [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> 265.1251 (berechnet 265.1262).

### 6.9.6 2-Methyl-3-oxo-7-octinsäurethiophenolester (**81**)



$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{S}$ ,  $M = 260.35$  g/mol

5-Hexinsäure (**79**) (370  $\mu\text{L}$ , 384 mg, 3.32 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Tetrahydrofuran (25 mL) vorgelegt und CDI (701 mg, 4.33 mmol, 1.3 Äq.) hinzugegeben. Die Lösung A wurde für 2 h gerührt. Für Reaktion B wurde absolutes Tetrahydrofuran (25 mL) mit Methylmalonsäurehalbthioester **53** (1.45 g, 6.89 mmol, 2.1 Äq.) und dem Magnesiumbromiddiethyletherat (901 mg, 3.49 mmol, 1.1 Äq.) versetzt. Die Suspension B rührte für 1 h. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand mit die Lösung A versetzt. Die entstehende Suspension wurde 18 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.5 M Salzsäure (40 mL) und Ethylacetat (30 mL) gelöst. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3× 30 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (40 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 2-Methyl-3-oxo-7-octinsäurethiophenolester (**81**) (773 mg,

2.97 mmol, 90%) wurde mittels Säulenchromatographie (H/EE 19:1) als farbloses Öl isoliert.

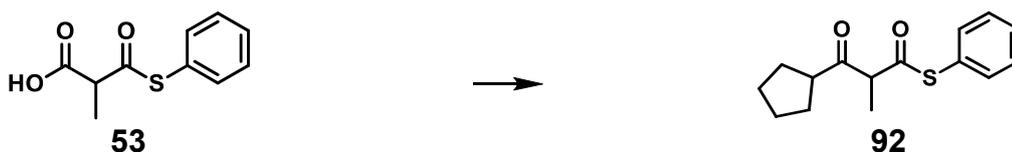
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.46 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.79-1.86 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.96 (t,  $J = 2.7$  Hz, 1H,  $\text{CCH}$ ), 2.24 (tdd,  $J = 6.8, 2.7, 1.6$  Hz, 2H,  $\text{CCH}_2$ ), 2.66-2.83 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.87 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 7.40-7.45 (m, 5H, Ar- $H$ ), 13.44 (t,  $J = 0.9$  Hz, 1H, Enol).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 13.8 (+,  $\text{CH}_3$ ), 17.7 (-,  $\text{CCH}_2$ ), 22.2 (-,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 39.9 (-,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 61.4 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 69.4 (+,  $\text{CCH}$ ), 83.5 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CCH}$ ), 129.5 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{C-Ar}_1$ ), 129.5 (+,  $\text{C-Ar}_m$ ), 129.9 (+,  $\text{C-Ar}_p$ ), 134.6 (+,  $\text{C-Ar}_o$ ), 195.1 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COS}$ ), 204.1 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ).

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.11 (H/EE 19:1).

**HRMS (APCI+):**  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  261.0940 (berechnet 261.0944).

### 6.9.7 3-Cyclopentyl-2-methyl-3-oxopropansäurethiophenolester (92)



$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{S}$ ,  $M = 262.37$  g/mol

Cyclopentansäure (340  $\mu\text{L}$ , 358 mg, 3.23 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Acetonitril (25 mL) gelöst. Dazu wurde CDI (704 mg, 4.34 mmol, 1.4 Äq.) gegeben und die Lösung A für 2 h gerührt. Methylmalonsäurehalbthiophenolester (**53**) (1.43 g, 6.78 mmol, 2.2 Äq.) wurde für Reaktion B in absolutem Acetonitril (25 mL) gelöst und mit Magnesiumbromid-diethyletherat (1.17 g, 4.53 mmol, 1.4 Äq.) versetzt. Die Suspension B wurde für 1 h gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit die Lösung A versetzt. Die Suspension wurde 18 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.5 M Salzsäure (40 mL) und Ethylacetat (40 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3 $\times$  40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (40 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 3-Cyclopentyl-2-methyl-3-oxopropansäurethiophenolester **92** (658 mg, 2.51 mmol, 80%) wurde mittels Säulenchromatographie (H/EE 39:1) als farbloses Öl isoliert.

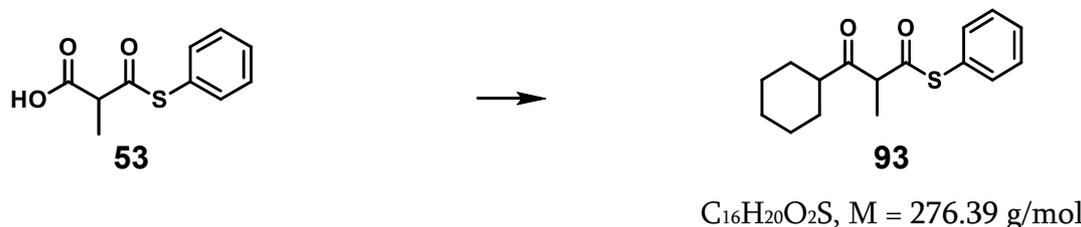
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.45 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.53-1.65 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.64-1.75 (m, 3H,  $\text{CH}_2$ ), 1.75-1.87 (m, 2H,  $\text{CCH}_2$ ), 1.88-1.95 (m, 1H,  $\text{CCH}_2$ ), 2.01 (s, 3H, Enol,  $\text{CH}_3$ ), 3.14 (tt,  $J = 8.2, 7.4$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 3.97 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 7.38-7.46 (m, 5H, Ar- $H$ ), 13.65 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H, Enol,  $\text{OH}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 14.0 (+,  $\text{CH}_3$ ), 26.2 (-,  $\text{CH}_2$ ), 26.2 (-,  $\text{CH}_2$ ), 29.4 (-,  $\text{CH}_2$ ), 30.3 (-,  $\text{CH}_2$ ), 50.7 (+,  $\text{CHCH}_2$ ), 60.7 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 127.1 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{C-Ar}_1$ ), 129.4 ((+,  $\text{C-Ar}_m$ ), 129.8 (+,  $\text{C-Ar}_p$ ), 134.6 (+,  $\text{C-Ar}_o$ ), 194.9 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COS}$ ), 207.4 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ).

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.12 (H/EE 39:1).

**HRMS (ESI+):**  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  263.1101 (berechnet 263.1100).

### 6.9.8 3-Cyclohexyl-2-methyl-3-oxopropansäurethiophenolester (93)



Cyclohexansäure (400 mg, 3.12 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Acetonitril (25 mL) gelöst, mit CDI (720 mg, 4.44 mmol, 1.4 Äq.) versetzt und die Lösung A für 2 h gerührt. Für die Reaktion B wurde Methylmalonsäurehalbthiophenolester (**53**) (1.44 g, 6.83 mmol, 2.2 Äq.) in absolutem Acetonitril (25 mL) gelöst und mit Magnesiumbromiddiethyletherat (1.27 g, 4.92 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. Die Suspension wurde für 1 h gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit die Lösung A versetzt. Die entstehende Suspension wurde 18 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.5 M Salzsäure (40 mL) und Ethylacetat (40 mL) aufgelöst. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3× 40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (40 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (H/EE 19:1) und 3-Cyclohexyl-2-methyl-3-oxopropansäurethiophenolester (**93**) (721 mg, 2.61 mmol, 84%) wurde als farbloses Öl erhalten.

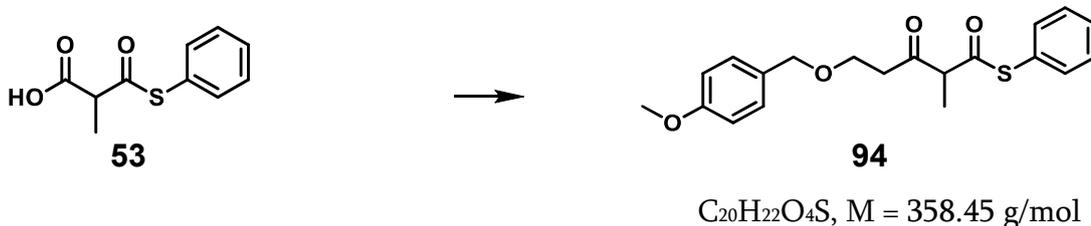
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.15-1.41 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ), 1.43 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.45-1.93 (m, 6H,  $\text{CH}_2$ ), 1.99 (s, 3H, Enol,  $\text{CH}_3$ ), 2.59-2.68 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ), 4.02 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 7.37-7.48 (m, 5H, Ar- $H$ ), 13.63 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H, Enol,  $\text{OH}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 14.1 (+,  $\text{CH}_3$ ), 25.5 (-,  $\text{CH}_2$ ), 25.8 (-,  $\text{CH}_2$ ), 25.9 (-,  $\text{CH}_2$ ), 28.4 (-,  $\text{CH}_2$ ), 29.2 (-,  $\text{CH}_2$ ), 50.4 (+,  $\text{CHCH}_2$ ), 59.4 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 127.1 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{C-Ar}_1$ ), 129.5 (+,  $\text{C-Ar}_m$ ), 129.8 (+,  $\text{C-Ar}_p$ ), 134.6 (+,  $\text{C-Ar}_o$ ), 194.9 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COS}$ ), 207.8 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ).

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.25 (H/EE 19:1).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[108]</sup>

### 6.9.9 5-((4-Methoxybenzyl)oxy)-2-methyl-3-oxopentansäurethiophenol-ester (**94**)



3-((4-Methoxybenzyl)oxy)propansäure (**67**) (670 mg, 3.19 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Acetonitril (25 mL) vorgelegt, CDI (712 mg, 4.39 mmol, 1.4 Äq.) zugegeben und die Lösung A für 2 h gerührt. Methylmalonsäurehalbthiophenolester (**53**) (1.42 g, 6.75 mmol, 2.1 Äq.) wurde für Reaktion B in absolutem Acetonitril (25 mL) gelöst und mit Magnesiumbromiddiethyletherat (1.03 g, 3.97 mmol, 1.2 Äq.) versetzt. Die Suspension B wurde für 1 h gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Lösung A versetzt. Die Suspension wurde 18 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.5 M Salzsäure (40 mL) und Ethylacetat (40 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3× 40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (40 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das PMB-Substrat **94** (768 mg, 2.14 mmol, 67%) wurde mittels Säulenchromatographie (H/EE 9:1) als farbloses Öl isoliert.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.45 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.99 (s, 3H, Enol,  $\text{CCH}_3$ ), 2.05 (s, 3H, Enol,  $\text{CCH}_3$ ), 2.86 (t,  $J = 6.3, 0.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.70-3.77 (m, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.80 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.90 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 4.44 (s, 2H,  $\text{CCH}_2\text{O}$ ), 6.85-6.91

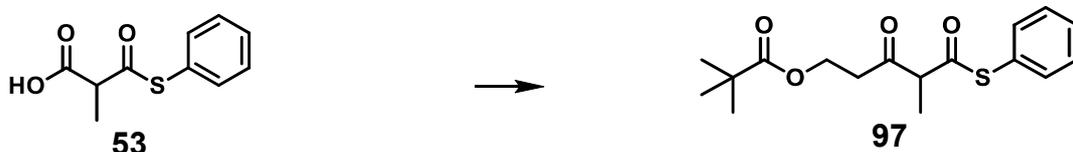
(m, 2H, Ar<sub>m</sub>-H), 7.22-7.28 (m, 2H, Ar<sub>o</sub>-H), 7.38-7.44 (m, 5H, Ar-H), 13.44 (t, *J* = 1.0 Hz, 1H, Enol, OH).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 13.6 (+, CHCH<sub>3</sub>), 41.8 (-, CH<sub>2</sub>CO), 55.4 (+, OCH<sub>3</sub>), 61.6 (+, CHCH<sub>3</sub>), 64.9 (-, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 73.1 (-, OCH<sub>2</sub>C), 113.9 (+, C-Ar<sub>m</sub>), 127.0 (C-SAr<sub>p</sub>), 129.5 (C-SAr<sub>m</sub>), 129.5 (+, C-Ar<sub>o</sub>), 129.9 (C-SAr<sub>1</sub>), 130.2 (C<sub>q</sub>, C-Ar<sub>1</sub>), 134.6 (C-SAr<sub>o</sub>), 159.4 (C<sub>q</sub>, C-Ar<sub>p</sub>), 195.0 (C<sub>q</sub>, COS), 203.1 (C<sub>q</sub>, CH<sub>2</sub>CO).

R<sub>f</sub>-Wert: 0.09 (H/EE 9:1).

HRMS (ESI+): *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> 381.1131 (berechnet 381.1136).

### 6.9.10 4-Methyl-3,5-dioxo-5-(thiophenyl)pentylpivalat (97)



C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>S, M = 322.42 g/mol

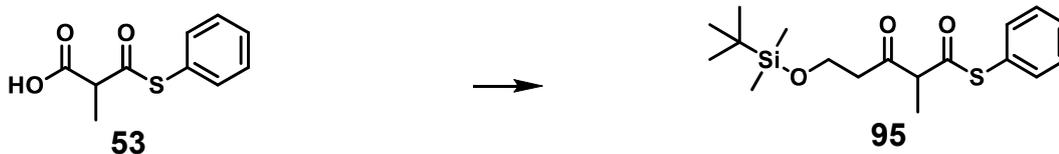
3-(Pivaloyloxy)propansäure (**68**) (93.7 mg, 0.52 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Tetrahydrofuran (4.0 mL) gelöst, mit CDI (121 mg, 0.74 mmol, 1.4 Äq.) versetzt und die Lösung A für 2 h gerührt. Für Reaktion B wurde Methylmalonsäurehalbthiophenol-ester (**53**) (232 mg, 1.10 mmol, 2.1 Äq.) in absolutem Tetrahydrofuran (4.0 mL) gelöst und mit Magnesiumbromiddiethyletherat (151 g, 4.92 mmol, 1.5 Äq.) versetzt. Die Suspension B wurde für 1 h gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit Lösung A versetzt. Die Suspension wurde 18 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, der Rückstand in 0.5 M Salzsäure (4.0 mL) aufgelöst und mit Ethylacetat (4× 3.0 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (4.0 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Ein Reinigungsversuch erfolgte mittels Säulenchromatographie (H/EE 9:1). Das Isolat (68.0 mg) enthält 4-Methyl-3,5-dioxo-5-(thiophenyl)pentylpivalat (**97**) (Anteil 65 mol%, 0.13 mmol, Umsatz 26%) neben dem bromierten Nebenprodukt **88** (Anteil 35 mol%, 0.07 mmol).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.16 (s,  $J = 0.6$  Hz, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.47 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 2.81-3.01 (m, 2H,  $\text{COCH}_2$ ), 3.87 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 4.34 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 7.16-7.21 (m, 1H,  $\text{Ar}_p\text{-H}$ ), 7.27-7.48 (m, 4H,  $\text{Ar}_o\text{-H}$ ,  $\text{Ar}_m\text{-H}$ ), 13.35 (s, 1H, Enol,  $\text{OH}$ ).

**R<sub>F</sub>-Wert:** 0.10 (H/EE 9:1).

**UPLC-MS (ESI+):**  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  345.22 (berechnet 345.11).

### 6.9.11 5-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-methyl-3-oxopentansäurethiophenolester (95)



$\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{SSi}$ ,  $M = 352.16$  g/mol

3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)propansäure (**65**) (626 mg, 2.97 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Tetrahydrofuran (25 mL) gelöst, mit CDI (700 mg, 4.32 mmol, 1.5 Äq.) versetzt und die Lösung A für 2 h gerührt. In Reaktion B wurde Methylmalonsäurehalbthiophenolester (**53**) (2.02 g, 9.61 mmol, 3.2 Äq.) in absolutem Tetrahydrofuran (25 mL) gelöst und Magnesiumbromiddiethyletherat (1.27 g, 4.92 mmol, 1.7 Äq.) hinzugegeben. Die Suspension wurde für 1 h gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit die Lösung A versetzt. Die Suspension wurde 18 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.5 M Salzsäure (40 mL) und Ethylacetat (40 mL) aufgelöst. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3× 40 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (40 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (H/EE 29:1) und 5-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-methyl-3-oxopentansäurethiophenolester (**95**) (566 mg, 1.61 mmol, 54%) wurde als farbloses Öl erhalten.

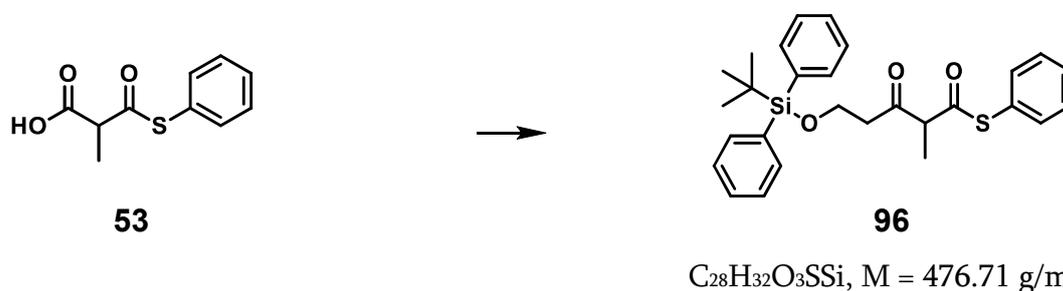
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.05 (s, 3H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.06 (s, 3H,  $\text{SiCH}_3$ ), 0.88 (s,  $J = 3.2$  Hz, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.44 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 2.02 (s, 3H, Enol,  $\text{CH}_3$ ), 2.71-2.86

(m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.91 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.91 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 7.39-7.46 (m, 5H, Ar-H), 13.35 (t,  $J = 1.1$  Hz, 1H, Enol, OH).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = -5.3 (+,  $\text{SiCH}_3$ ), -5.3 (+,  $\text{SiCH}_3$ ), 13.5 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 18.4 ( $\text{C}_q$ , SiC), 26.0 (+,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 44.5 (-,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 58.8 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 61.9 (-,  $\text{OCH}_2$ ), 129.5 ( $\text{C}_q$ , C-Ar<sub>1</sub>), 129.5 (+, C-Ar<sub>m</sub>), 129.9 (+, C-Ar<sub>p</sub>), 134.6 (+, C-Ar<sub>o</sub>), 195.0 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COS}$ ), 203.6 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ).

R<sub>f</sub>-Wert: 0.15 (H/EE 29:1).

### 6.9.12 5-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)-2-methyl-3-oxopentansäurethiophenolester (**96**)



3-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)propansäure (**66**) (997 mg, 2.95 mmol, 1.0 Äq.) wurden in absolutem Tetrahydrofuran (25 mL) vorgelegt, unter Rühren mit CDI (700 mg, 4.32 mmol, 1.5 Äq.) versetzt und die Lösung A für 2 h gerührt. Für Reaktion B wurde Methylmalonsäurehalbthiophenolester (**53**) (1.42 g, 6.77 mmol, 2.3 Äq.) in absolutem Tetrahydrofuran (25 mL) vorgelegt und Magnesiumbromiddiethyletherat (909 mg, 3.52 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben. Die Suspension B wurde für 1 h gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mit der Reaktionslösung A versetzt. Die Suspension wurde 18 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.5 M Salzsäure (40 mL) gelöst. Die Lösung wurde mit Ethylacetat (4× 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (40 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung mittels Säulenchromatographie (H/EE 29:1 -> 19:1 -> 9:1) ergab 5-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)-2-methyl-3-oxopentansäurethiophenolester (**96**) (611 mg, 1.28 mmol, 44%) als farbloses Öl.

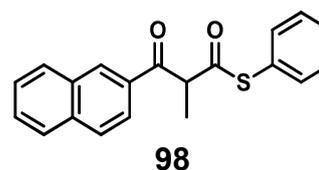
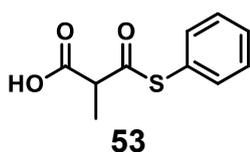
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.03 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.45 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.95 (s, 3H, Enol,  $\text{CCH}_3$ ), 2.58 (t,  $J = 6.3$  Hz, 1H, Enol,  $\text{CH}_2\text{CHCO}$ ), 2.74-2.88 (m, 2H,  $\text{CHCO}$ ), 3.92 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 3.95 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 7.35-7.47 (m, 10H, Ar-H), 7.62-7.74 (m, 5H, Ar-H), 13.32 (s, 1H, Enol, OH).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 13.6 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 19.3 ( $\text{C}_q$ , SiC), 26.9 (+,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 44.2 (-,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 59.5 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 61.8 (-,  $\text{OCH}_2$ ), 127.9 ( $\text{C}_q$ , C-SAr<sub>1</sub>), 127.9 (+, C-Ar<sub>p</sub>), 129.5 (+, C-SAr<sub>m</sub>), 129.9 (+, C-Ar<sub>m</sub>), 129.9 (+, C-SAr<sub>p</sub>), 134.6 (+, C-SAr<sub>o</sub>), 134.9 ( $\text{C}_q$ , C-Ar<sub>1</sub>), 135.7 (+, C-Ar<sub>o</sub>), 194.9 ( $\text{C}_q$ , COS), 203.3 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ).

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.32 (H/EE 9:1).

**UPLC-MS (ESI+):** m/z  $[\text{M}+\text{H}]^+$  477.44 (berechnet 477.18).

### 6.9.13 2-Methyl-3-(naphthalen-2-yl)-3-oxopropansäurethiophenol-ester (98)



$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_2\text{S}$ ,  $M = 320.41$  g/mol

2-Napththoesäure (530 mg, 3.08 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Tetrahydrofuran (25 mL) vorgelegt und CDI (703 mg, 4,34 mmol, 1.4 Äq.) hinzugegeben. Die Lösung A wurde für 3.5 h gerührt. Methylmalonsäurehalbthiophenolester (**53**) (1.47 g, 6.99 mmol, 2.3 Äq.) wurde in absolutem Tetrahydrofuran (25 mL) vorgelegt und mit Magnesiumbromiddiethyletherat (904 mg, 3.50 mmol, 1.1 Äq.) versetzt. Nach 1 h Rühren wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und Lösung A zum Reaktionsrückstand B gegeben. Die Suspension wurde 18 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.5 M Salzsäure (40 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (4× 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (40 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Ein Reinigungsversuch erfolgte mittels Säulenchromatographie (H/EE 9:1). Das Isolat (785 mg) enthielt das Naphthalen-Produkt **98** (Anteil 77 mol%, 1.85 mmol, Umsatz 60%) neben dem bromierte Nebenprodukt **88** (Anteil 23 mol%, 0.55 mmol).

---

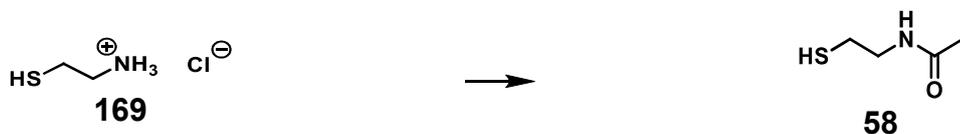
**<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 1.67 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.91 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 1H, CHCH<sub>3</sub>), 7.36 (s, 5H, Ph-*H*), 7.58 (ddd,  $J$  = 8.1, 6.9, 1.3 Hz, 1H, Naph-*H*), 7.63 (ddd,  $J$  = 8.2, 6.9, 1.3 Hz, 1H, Naph-*H*), 7.87-7.95 (m, 2H, Naph-*H*), 8.00 (dd,  $J$  = 8.1, 0.6 Hz, 1H, Naph-*H*), 8.08 (dd,  $J$  = 8.6, 1.8 Hz, 1H, Naph-*H*), 8.58 (d,  $J$  = 1.4 Hz, 1H, Naph-*H*), 13.67 (s, 1H, Enol, OH).

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.25 (H/EE 9:1).

**UPLC-MS (APCI+):** m/z [M+H]<sup>+</sup> 321.0943 (berechnet 321.0944).

## 6.10 Synthesen für $\beta$ -Keto-SNAC-thioester

### 6.10.1 *N*-Acetylcysteamin (**58**)



$C_4H_9NOS$ ,  $M = 119.18$  g/mol

Cysteaminehydrochlorid (**169**) (21.5 g, 189 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Wasser (220 mL) gelöst und bei 0 °C mit Kaliumhydroxid (88.2 g, 1.57 mol, 8.3 Äq.) und Essigsäureanhydrid (55.0 mL, 0.583 mol, 3.1 Äq.) versetzt. Die Lösung wurde für 2 h gerührt. Die Reaktionslösung (pH 12 – 14) wurde mit Dichlormethan (3× 50 mL) gewaschen und mit 4 M Salzsäure (70 mL) auf pH 6 – 7 eingestellt. Die Extraktion erfolgte mit Dichlormethan (3× 210 mL). Die vereinigten Extraktphasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. *N*-Acetylcysteamin (**58**) (20.2 g, 169 mmol, 89%) wurde als farbloses Öl erhalten.

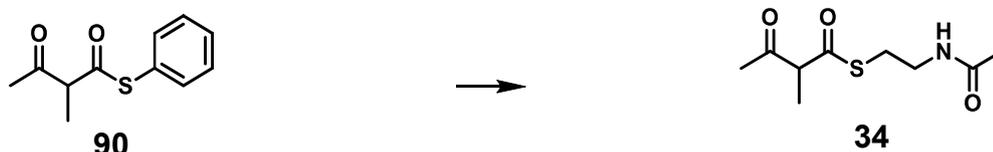
$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.35 (t,  $J = 8.5$  Hz, 1H, *SH*), 2.01 (s, 3H, *CH*<sub>3</sub>), 2.67 (dt,  $J = 8.5, 6.3$  Hz, 2H, *SCH*<sub>2</sub>), 3.43 (q,  $J = 6.3$  Hz, 2H, *NCH*<sub>2</sub>), 5.97 (bs, 1H, *NH*).

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.24 (EE).

**UPLC-MS(+):** m/z [M+H]<sup>+</sup> 120.04 (berechnet 120.05).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[170]</sup>

### 6.10.2 2-Methyl-3-oxobutansäure(*N*-acetylcysteamin)thioester (**34**)



$C_9H_{15}NO_3S$ ,  $M = 217.28$  g/mol

DIPEA (820  $\mu$ L, 621 mg, 4.80 mmol, 4.9 Äq.) wurde zu 2-Methyl-3-oxobutansäurethio-phenolester (**90**) (205 mg, 0.98 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem Acetonitril (9.2 mL) gegeben. Die Lösung wurde mit HSNAC **58** (1.02 g, 8.58 mmol, 8.9 Äq.) versetzt und für 35 min gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von gesättigter Natriumchlorid-Lösung

(20 mL) und Wasser (20 mL) beendet. Die Extraktion erfolgte mit Dichlormethan (4× 15 mL) und die vereinigten organischen Phasen wurden über Kupfersulfat-imprägniertem Silika filtriert (22.0 g zur Lösung, 22.0 g als Filtersäule, 2× 8.80 mmol; 2.1-fache der freien Thiole). Das Filtermaterial wurde mit Dichlormethan (15 mL) und mit Ethylacetat (3× 15 mL) gewaschen. Die Produkt-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstands mittels Säulenchromatographie (Ethylacetat) gereinigt. 2-Methyl-3-oxobutansäure(SNAC)thioester (**34**) (185 mg, 0.85 mmol, 87%) wurde als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.39 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.97 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CON}$ ), 2.24 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{COCH}$ ), 3.02-3.14 (m, 2H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.38-3.51 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.77 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 5.87 (bs, 1H,  $\text{NH}$ ), 13.54 (d,  $J = 0.7$  Hz, 1H, Enol,  $\text{OH}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 13.6 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 23.3 (+,  $\text{CH}_3\text{CON}$ ), 28.7 (+,  $\text{CH}_3\text{COCH}$ ), 29.0 (-,  $\text{SCH}_2$ ), 39.4 (-,  $\text{NCH}_2$ ), 62.0 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 170.7 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 197.1 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CO}$ ), 202.8 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ).

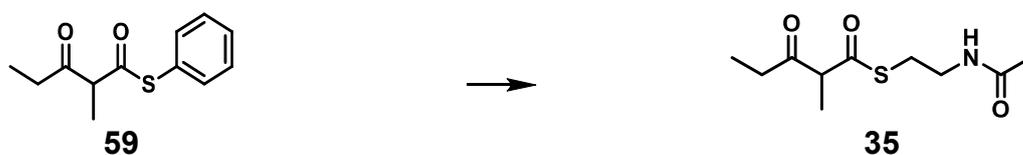
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.24 (EE).

**HRMS (ESI+):**  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  218.0842 (berechnet 218.0845).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[57]</sup>

### 6.10.3 2-Methyl-3-oxopentansäure(*N*-acetylcysteamin)thioester (**35**)

#### A) Transesterifizierung

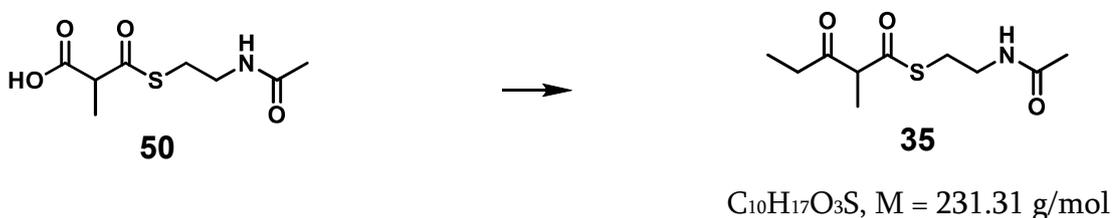


$\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_3\text{S}$ ,  $M = 231.31$  g/mol

2-Methyl-3-oxopentansäurethiophenolester (**59**) (1.01 g, 4.53 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Acetonitril (48 mL) gelöst, DIPEA (3.90 mL, 2.95 g, 22.8 mmol, 5.0 Äq.) und HSNAC (**58**) (5.05 g, 42.4 mmol, 9.4 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von gesättigter Natriumchlorid-Lösung (180 mL) und Wasser (90 mL) beendet. Die Lösung wurde mit Dichlormethan (3× 270 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum auf 500 mL eingengt

und über Kupfersulfat-imprägniertem Silika filtriert (104 g zur Lösung, 104 g als Filtersäule, 2× 41.7 mmol; 2.0-fache der freien Thiole). Das Filtermaterial wurde mit einer Mischung aus Ethylacetat und Methanol (2× 500 mL, 9:1) gespült. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der farblose Feststoff (Silika) mehrfach mit Ethylacetat gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (Ethylacetat) gereinigt. 2-Methyl-3-oxopentansäure(SNAC)thioester (**35**) (973 mg, 4.21 mmol, 93%) wurde als farbloses Öl erhalten.

### B) Decarboxylative CLAISEN-Kondensation



Propionsäure **57** (88.3  $\mu$ L, 87.4 mg, 1.14 mmol, 1.3 Äq.) wurde in absolutem Tetrahydrofuran (7.0 mL) gelöst und CDI (217 mg, 1.34 mmol, 1.5 Äq.) hinzugegeben. Die Lösung A wurde für 2 h gerührt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand in absolutem Acetonitril (11.7 mL) aufgenommen. Für Reaktion B wurde Methylmalonsäure-(SNAC)halbthioester (**50**) (200 mg, 0.91 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem Acetonitril (5.0 mL) gelöst und Magnesiumbromiddiethyletherat (280 mg, 1.08 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben. Die Suspension B wurde 1 h bei 35 °C gerührt. Die Reaktionslösung A wurde zur Reaktion B überführt und der vereinigte Ansatz 18 h bei 35 °C kräftig gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.5 M Salzsäure (10 mL) und Ethylacetat (10 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3× 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 2-Methyl-3-oxopentansäure(SNAC)thioester (**35**) (115 mg, 0.50 mmol, 55%) wurde mittels Säulenchromatographie (PE/EE 1:9) als farbloses Öl isoliert.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.06 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.38 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.96 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2.47-2.65 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.00-3.13 (m, 2H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.37-3.51 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.79 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 5.92 (bs, 1H,  $\text{NH}$ ), 13.64 (t,  $J$  = 0.9 Hz, 1H, Enol,  $\text{OH}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.8 (+,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 13.8 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 23.3 (+,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 29.0 (-,  $\text{SCH}_2$ ), 35.1 (-,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 39.4 (-,  $\text{NCH}_2$ ), 61.1 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 170.5 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 197.2 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COS}$ ), 205.6 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ).

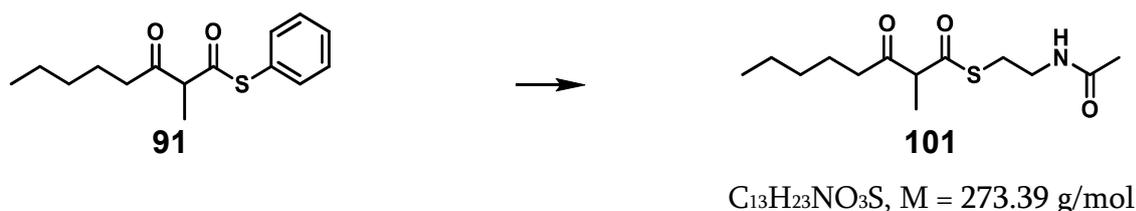
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.24 (Ethylacetat).

**HRMS (ESI+):**  $m/z$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup> 254.0831 (berechnet 254.0827).

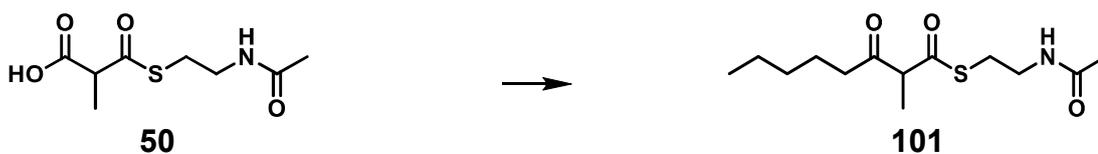
Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[57]</sup>

#### 6.10.4 2-Methyl-3-oxooctansäure(*N*-acetylcysteamin)thioester (**101**)

##### A) Transesterifizierung



2-Methyl-3-oxooctansäurethiophenolester (**91**) (80.0 mg, 0.30 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Acetonitril (5.0 mL) gelöst. DIPEA (260  $\mu\text{L}$ , 197 mg, 1.52 mmol, 5.0 Äq.) und HSNAC (**58**) (325 mg, 2.73 mmol, 9.0 Äq.) wurden hinzugegeben und für 30 min gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von gesättigter Natriumchlorid-Lösung (9.0 mL) und Wasser (6.0 mL) beendet. Die Lösung wurde mit Dichlormethan (4× 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Kupfersulfat-imprägniertem Silika filtriert (6.50 g zur Lösung, 6.50 g als Filtersäule, 2× 2.61 mmol; 1.9-fache der freien Thiole). Das Filtermaterial wurde mit Dichlormethan (10 mL) und mit Ethylacetat (3× 10 mL) gewaschen. Die Produkt-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel entfernt und mittels Säulenchromatographie (H/EE 1:9) gereinigt. 2-Methyl-3-oxooctansäure(*N*-acetylcysteamin)thioester (**101**) (68.0 mg, 0.25 mmol, 82%) wurde als farbloses Öl erhalten.

**B) Decarboxylative CLAISEN-Kondensation**

$C_{13}H_{23}NO_3S$ ,  $M = 273.39$  g/mol

Hexansäure (153  $\mu$ L, 141 mg, 1.18 mmol, 1.3 Äq.) wurde in absolutem Tetrahydrofuran (7.0 mL) vorgelegt und CDI (217 mg, 1.34 mmol, 1.5 Äq.) hinzugegeben. Die Lösung A rührte für 2 h. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in absolutem Acetonitril (12 mL) aufgenommen. Methylmalonsäure(SNAC)halbthioester (**50**) (200 mg, 0.91 mmol, 1.0 Äq.) wurde für Reaktion B in absolutem Acetonitril (5.0 mL) gelöst. Magnesiumbromiddiethyletherat (280 mg, 1.08 mmol, 1.2 Äq.) wurde zugegeben und 1 h bei 35 °C gerührt. Die Reaktionslösung A wurde zur Reaktion B überführt und 18 h bei 35 °C kräftig gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.5 M Salzsäure (10 mL) und Ethylacetat (10 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3 $\times$  10 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 2-Methyl-3-oxooctansäure(SNAC)thioester (**101**) (135 mg, 0.49 mmol, 54%) wurde mittels Säulenchromatographie (PE/EE 1:9) als farbloses Öl isoliert.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.83 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $CH_2CH_3$ ), 1.15-1.29 (m, 4H,  $CH_2CH_2CH_3$ ), 1.32 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $CHCH_3$ ), 1.47-1.56 (m, 2H,  $CH_2CH_2CO$ ), 1.92 (s, 3H,  $CH_3CO$ ), 2.40-2.55 (m, 2H,  $CH_2CO$ ), 2.96-3.08 (m, 2H,  $SCH_2$ ), 3.30-3.46 (m, 2H,  $NCH_2$ ), 3.74 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H,  $CHCH_3$ ), 6.28 (bs, 1H,  $NH$ ), 13.59 (t,  $J = 0.9$  Hz, 1H, Enol,  $OH$ ).

$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 13.7 (+,  $CHCH_3$ ), 14.0 (+,  $CH_2CH_3$ ), 22.5 (-,  $CH_2$ ), 23.3 (+,  $CH_3CO$ ), 23.3 (-,  $CH_2$ ), 29.0 (-,  $SCH_2$ ), 31.3 (-,  $CH_2$ ), 39.5 (-,  $NCH_2$ ), 41.7 (-,  $CH_2CO$ ), 61.4 (+,  $CHCH_3$ ), 170.6 ( $C_q$ ,  $CH_3CO$ ), 197.2 ( $C_q$ ,  $CO$ ), 205.2 ( $C_q$ ,  $CH_2CO$ ).

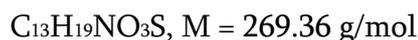
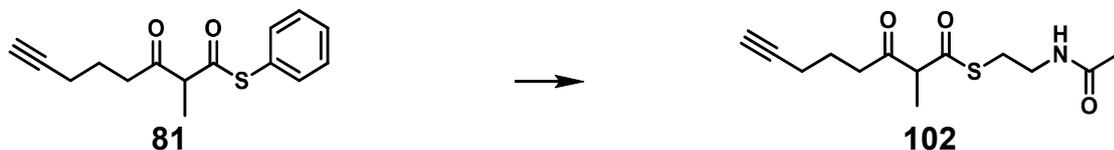
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.28 (H/EE 1:9).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  [ $M+Na$ ]<sup>+</sup> 296.1296 (berechnet 296.1296).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[129]</sup>

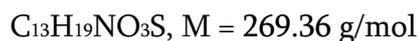
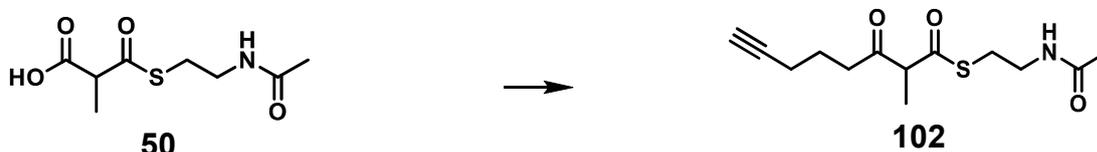
## 6.10.5 2-Methyl-3-oxo-7-octinsäure(*N*-acetylcysteamin)thioester (**102**)

### A) Transesterifizierung



Thiophenolester **81** (410 mg, 1.57 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Acetonitril (16 mL) gelöst. DIPEA (1.20 mL, 908 mg, 7.03 mmol, 4.5 Äq.) und HSNAC (**58**) (1.65 g, 13.9 mmol, 8.8 Äq.) wurden hinzugegeben und für 30 min gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von gesättigter Natriumchlorid-Lösung (60 mL) und Wasser (30 mL) beendet. Die wässrige Lösung wurde mit Dichlormethan (3× 90 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Kupfersulfat-imprägniertem Silika filtriert (32.0 g zur Lösung, 32.0 g als Filtersäule, 2× 12.8 mmol; 1.8-fache der freien Thiole). Das Filtermaterial wurde mit Dichlormethan (90 mL) und mit Ethylacetat (3× 90 mL) gewaschen. Die Produktfraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Ethylacetat) gereinigt. 2-Methyl-3-oxo-7-octinsäure-(SNAC)thioester (**102**) (339 mg, 1.26 mmol, 80%) wurde als farbloses bis rötliches Öl isoliert.

### B) Decarboxylative CLAISEN-Kondensation



5-Hexinsäure **79** (132  $\mu$ L, 137 mg, 1.18 mmol, 1.3 Äq.) wurde in absolutem Tetrahydrofuran (7.0 mL) gelöst. Unter Rühren wurde CDI (217 mg, 1.34 mmol, 1.5 Äq.) hinzugegeben und die Lösung A für 2 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in absolutem Acetonitril (12 mL) aufgenommen. Für Reaktion B wurde

Methylmalonsäure(SNAC)halbthioester (**50**) (200 mg, 0.91 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem Acetonitril (5.0 mL) gelöst und Magnesiumbromiddiethyletherat (280 mg, 1.08 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben und 1 h bei 35 °C gerührt. Die Reaktionslösung A wurde zur Reaktion B überführt und 18 h bei 35 °C kräftig gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.5 M Salzsäure (10 mL) und Ethylacetat (10 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat (3× 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 2-Methyl-3-oxo-7-octinsäure(SNAC)thioester (**102**) (150 mg, 0.56 mmol, 61%) wurde mittels Säulenchromatographie (PE/EE 1:9) als farbloses Öl erhalten.

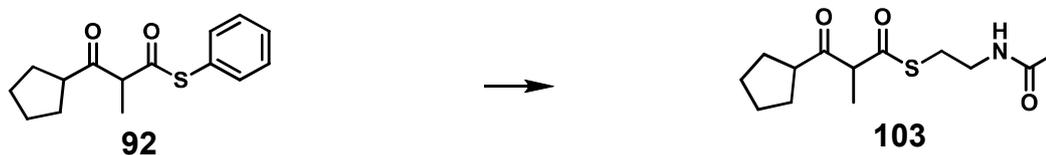
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.40 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.80 (dt,  $J$  = 6.9, 6.9 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.97 (t,  $J$  = 2.6 Hz, 1H,  $\text{CCH}$ ), 1.98 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2.20-2.26 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CCH}$ ), 2.70 (qt,  $J$  = 18.1, 7.1 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 3.01-3.15 (m, 2H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.38-3.53 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.80 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 5.87 (bs, 1H,  $\text{NH}$ ), 13.62 (t,  $J$  = 0.9 Hz, 1H, Enol,  $\text{OH}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 13.7 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 17.7 (-,  $\text{CH}_2\text{CCH}$ ), 22.1 (-,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 23.3 (+,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 29.1 (-,  $\text{SCH}_2$ ), 39.5 (-,  $\text{NCH}_2$ ), 40.0 (-,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 61.5 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 69.5 (+,  $\text{CCH}$ ), 83.5 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CCH}$ ), 170.6 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 197.1 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COS}$ ), 204.5 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ).

$R_f$ -Wert: 0.26 (Ethylacetat).

HRMS (ESI+):  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  292.0970 (berechnet 292.0978).

### 6.10.6 3-Cyclopentyl-2-methyl-3-oxopropansäure(*N*-acetylcysteamin)-thioester (**103**)



$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}_3\text{S}$ ,  $M = 271.38$  g/mol

DIPEA (1.50 mL, 1.14 g, 8.79 mmol, 4.9 Äq.) wurde zu einer Lösung von 2-Methyl-3-oxobutansäurethiophenolester (**92**) (470 mg, 1.79 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem Acetonitril (9.2 mL) gegeben. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von HSNAC **58** (1.98 g, 16.6 mmol, 9.3 Äq.). Die Reaktionslösung wurde für 12 h gerührt. Die Reaktion wurde

durch die Zugabe von gesättigter Natriumchlorid-Lösung (70 mL) und Wasser (35 mL) beendet. Die Extraktion erfolgte mit Dichlormethan (4× 105 mL) und die vereinigten organischen Phasen wurden über Kupfersulfat-imprägniertem Silika filtriert (40.0 g zur Lösung, 40.0 g als Filtersäule, 2× 16.0 mmol; 1.9-fache der freien Thiole). Das Filtermaterial wurde mit Dichlormethan (105 mL) und mit Ethylacetat (3× 105 mL) gewaschen. Die Produktenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstands mittels Säulenchromatographie (Ethylacetat) gereinigt. 3-Cyclopentyl-2-methyl-3-oxopropansäure(SNAC)thioester (**103**) (361 mg, 1.33 mmol, 74%) wurde als farbloses Öl erhalten.

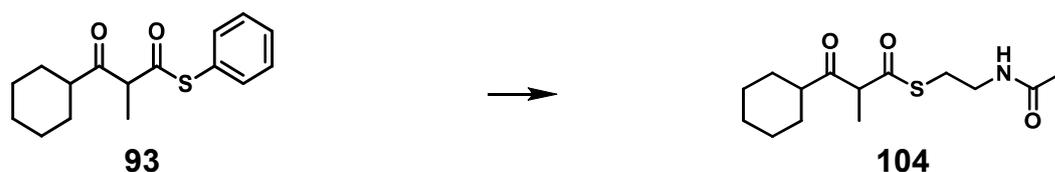
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 1.38 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>). 1.53-1.93 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 1.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO), 3.01-3.14 (m, 3H, CHCH<sub>2</sub>, SCH<sub>2</sub>), 3.37-3.52 (m, 2H, NCH<sub>2</sub>), 3.91 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, CHCH<sub>3</sub>), 5.90 (bs, 1H, NH), 13.86 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, Enol, OH).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 14.0 (+, CHCH<sub>3</sub>), 23.3 (+, CH<sub>3</sub>CO), 26.2 (-, CH<sub>2</sub>), 26.2 (-, CH<sub>2</sub>), 29.0 (-, SCH<sub>2</sub>), 29.4 (-, CH<sub>2</sub>), 29.9 (-, CH<sub>2</sub>), 39.6 (-, NCH<sub>2</sub>), 50.8 (+, CHCH<sub>2</sub>), 60.7 (+, CHCH<sub>3</sub>), 170.6 (C<sub>q</sub>, CH<sub>3</sub>CO), 197.1 (C<sub>q</sub>, COS), 207.8 (C<sub>q</sub>, CH<sub>2</sub>CO).

R<sub>f</sub>-Wert: 0.36 (Ethylacetat).

HRMS (ESI+): *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> 294.1131 (berechnet 294.1134).

### 6.10.7 3-Cyclohexyl-2-methyl-3-oxopropansäure(*N*-acetylcysteamin)thioester (**104**)



C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>S, M = 285.40 g/mol

3-Cyclohexyl-2-methyl-3-oxopropansäurethiophenolester (**93**) (107 mg, 0.39 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Acetonitril (4.0 mL) gelöst. DIPEA (320 µL, 242 mg, 1.87 mmol, 4.8 Äq.) und HSNAC (**58**) (435 mg, 3.65 mmol, 9.4 Äq.) wurden hinzugegeben und für 30 min gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von gesättigter Natriumchlorid-Lösung (20 mL) und Wasser (10 mL) beendet. Die wässrige Lösung wurde mit Dichlormethan (4× 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über

Kupfersulfat-imprägniertem Silika filtriert (8.00 g zur Lösung, 8.00 g als Filtersäule, 2× 3.20 mmol; 1.8-fache der freien Thiole). Das Filtermaterial wurde mit Dichlormethan (30 mL) und mit Ethylacetat (3× 30 mL) gewaschen. Die Produkt-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel entfernt und mittels Säulenchromatographie (Ethylacetat) gereinigt. 3-Cyclohexyl-2-methyl-3-oxopropansäure(SNAC)thioester (**104**) (95.0 mg, 0.33 mmol, 86%) wurde als farbloses Öl isoliert.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.15-1.44 (m, 5H,  $\text{CH}_2$ ), 1.35 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.62-1.86 (m, 5H,  $\text{CH}_2$ ), 1.96 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2.50-2.59 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2$ ), 2.99-3.14 (m, 2H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.34-3.52 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.96 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 5.91 (bs, 1H,  $\text{NH}$ ), 13.83 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H, Enol,  $\text{OH}$ ).

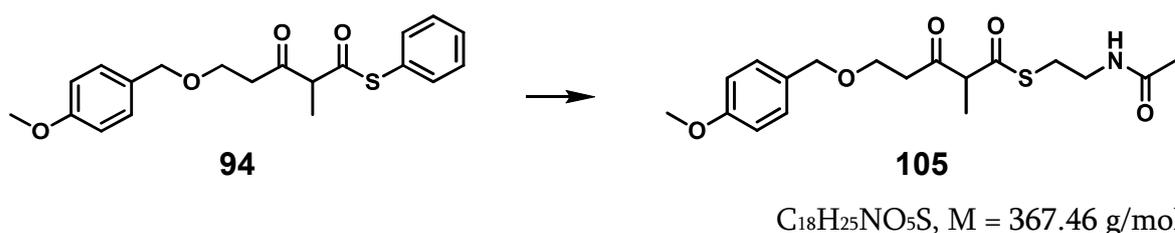
$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 14.0 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 23.3 (+,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 25.5 (-,  $\text{CH}_2$ ), 25.7 (-,  $\text{CH}_2$ ), 25.8 (-,  $\text{CH}_2$ ), 28.5 (-,  $\text{CH}_2$ ), 28.9 (-,  $\text{CH}_2$ ), 28.9 (-,  $\text{SCH}_2$ ), 39.5 (-,  $\text{NCH}_2$ ), 50.5 (+,  $\text{CHCH}_2$ ), 59.3 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 170.6 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 196.9 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COS}$ ), 208.2 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ).

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.35 (Ethylacetat).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  286.1471 (berechnet 286.1471).

### 6.10.8 5-((4-Methoxybenzyl)oxy)-2-methyl-3-oxopentansäure(*N*-acetylcysteamin)thioester (**105**)

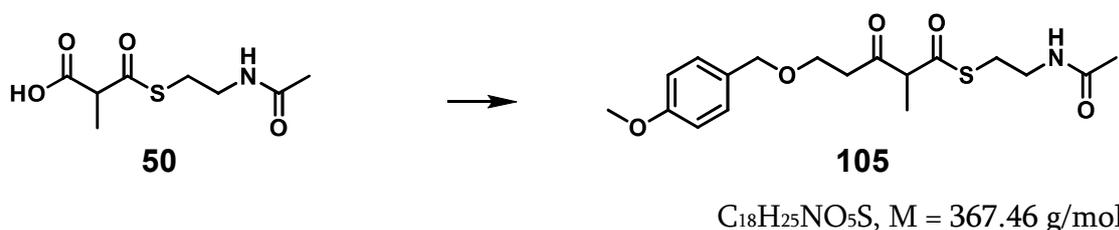
#### A) Transesterifizierung



Thiophenolester **94** (55.0 mg, 0.15 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Acetonitril (5.0 mL) gelöst. DIPEA (130  $\mu\text{L}$ , 98.4 mg, 0.76 mmol, 5.0 Äq.) und HSNAC (**58**) (160 mg, 1.34 mmol, 8.7 Äq.) wurden hinzugegeben und die Lösung für 15 min gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von gesättigter Natriumchlorid-Lösung (10 mL) und Wasser (5.0 mL) beendet. Die wässrige Lösung wurde mit Dichlormethan (3× 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Kupfersulfat-imprägniertem Silika

filtriert (3.40 g zur Lösung, 3.40 g als Filtersäule,  $2 \times 1.36$  mmol; 2.0-fache der freien Thiole). Das Filtermaterial wurde mit Dichlormethan (90 mL) und mit Ethylacetat ( $3 \times 15$  mL) gewaschen. Die Produktfraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und der Rückstand mittels Säulenchromatographie (Ethylacetat) gereinigt. 5-((4-Methoxybenzyl)oxy)-2-methyl-3-oxopentansäure(SNAC)thioester (**105**) (46.0 mg, 0.13 mmol, 82%) wurde als farbloses Öl isoliert.

### B) Decarboxylative CLAISEN-Kondensation



3-((4-Methoxybenzyl)oxy)propansäure (**67**) (254 mg, 1.17 mmol, 1.3 Äq.) wurde in absolutem Tetrahydrofuran (7.0 mL) vorgelegt und unter Rühren CDI (217 mg, 1.34 mmol, 1.5 Äq.) hinzugegeben. Die Lösung A rührte für 2 h. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in absolutem Acetonitril (12 mL) aufgenommen. Für Reaktion B wurde Methylmalonsäure(SNAC)halbthioester (**50**) (200 mg, 0.91 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem Acetonitril (5.0 mL) gelöst und Magnesiumbromiddiethyletherat (280 mg, 1.08 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben und 1 h bei 35 °C gerührt. Die Reaktionslösung A wurde zur Reaktion B überführt und 18 h bei 35 °C kräftig gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in 0.5 M Salzsäure (10 mL) und Ethylacetat (10 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Ethylacetat ( $3 \times 10$  mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 5-((4-Methoxybenzyl)oxy)-2-methyl-3-oxopentansäure(SNAC)thioester (**105**) (144 mg, 0.39 mmol, 43%) wurde mittels Säulenchromatographie (PE/EE 1:9) als farbloses Öl erhalten.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.38 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $CHCH_3$ ), 1.94 (s, 3H,  $CH_3CO$ ), 2.74-2.87 (m, 2H,  $CH_2CO$ ), 2.98-3.11 (m, 2H,  $SCH_2$ ), 3.30-3.43 (m, 2H,  $NCH_2$ ), 3.72 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H,  $OCH_2CH_2$ ), 3.80 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 3.83 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H,  $CHCH_3$ ), 4.42 (s,

2H *OCHC*), 5.93 (bs, 1H, *NH*), 6.85-6.88 (m, 2H, *Ar<sub>m</sub>-H*), 7.20-7.24 (m, 2H, *Ar<sub>o</sub>-H*), 13.59 (t,  $J = 1.0$  Hz, 1H, Enol, *OH*).

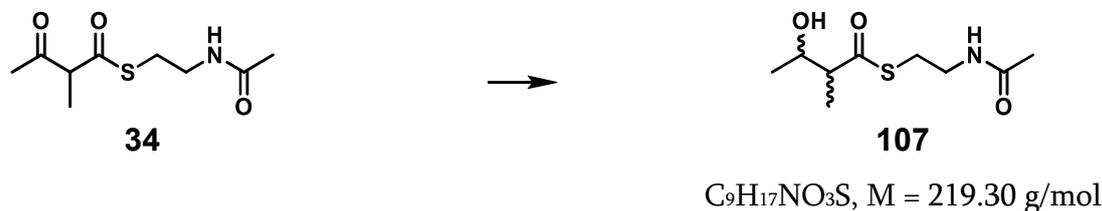
<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  [ppm] = 13.4 (+, *CHCH<sub>3</sub>*), 23.2 (+, *CH<sub>3</sub>CO*), 29.0 (-, *SCH<sub>2</sub>*), 39.4 (-, *NCH<sub>2</sub>*), 41.6 (-, *CH<sub>2</sub>CO*), 55.4 (+, *OCH<sub>3</sub>*), 62.0 (+, *CHCH<sub>3</sub>*), 64.9 (-, *OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>*), 73.2 (-, *OCH<sub>2</sub>C*), 114.0 (+, *C-Ar<sub>m</sub>*), 129.6 (+, *C-Ar<sub>o</sub>*), 130.0 (*C<sub>q</sub>*, *C-Ar<sub>1</sub>*), 159.4 (*C<sub>q</sub>*, *C-Ar<sub>p</sub>*), 170.6 (*C<sub>q</sub>*, *CH<sub>3</sub>CO*), 196.8 (*C<sub>q</sub>*, *COS*), 203.3 (*C<sub>q</sub>*, *CH<sub>2</sub>CO*).

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.23 (Ethylacetat).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  [*M*+*Na*]<sup>+</sup> 390.1346 (berechnet 390.1351).

## 6.11 Synthesen für $\beta$ -Alkohol-SNAC-thioester

### 6.11.1 3-Hydroxy-2-methylbutansäure(*N*-acetylcysteamin)thioester (**107**)



Natriumborhydrid (3.70 mg, 98.7  $\mu$ mol, 1.3 Äq.) wurde in absolutem Methanol (5.0 mL) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt.  $\beta$ -Ketosubstrat **34** (17.0 mg, 78.2  $\mu$ mol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Methanol (2.5 mL) gelöst und tropfenweise hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 1.5 h bei 0 °C gerührt. Gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung (1.0 mL) und Wasser (4.0 mL) wurden zugegeben. Die Extraktion erfolgte mit Ethylacetat (3 $\times$  5.0 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und eine erste Reinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie (H/EE 1:9). Die zweite Reinigung erfolgte mittels präparativer HPLC, wodurch 3-Hydroxy-2-methylbutansäure(SNAC)thioester (**107**) (8.00 mg, 36.5  $\mu$ mol, 47%, *dr* (a:b) 64:36) als farbloses Öl isoliert werden konnte.

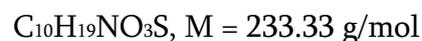
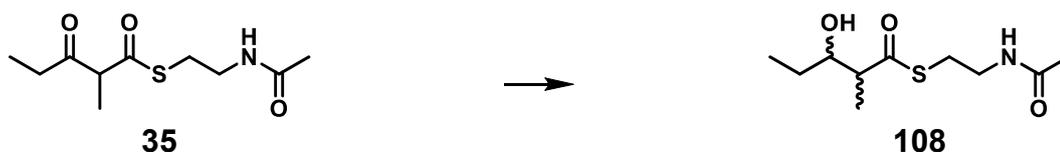
$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.18-1.21 (m, 3H,  $CH_3CHOH$ ), 1.23 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, b- $COCHCH_3$ ), 1.24 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, a- $COCHCH_3$ ), 1.80 (s, 1H, OH), 1.96 (s, 3H, a- $CH_3CO$ ), 1.97 (s, 3H, b- $CH_3CO$ ), 2.65-2.73 (m, 1H,  $CHCH_3$ ), 2.97-3.10 (m, 2H,  $SCH_2$ ), 3.39-3.54 (m, 2H,  $NCH_2$ ), 3.94 (qd,  $J = 6.4, 6.4$  Hz, 1H, a- $CHOH$ ), 4.11 (qd,  $J = 6.4, 4.0$  Hz, 1H, b- $CHOH$ ), 5.83 (bs, 1H, b-NH), 5.85 (bs, 1H, a-NH).

$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.6 (+, b- $CHCH_3$ ), 15.1 (+, a- $CHCH_3$ ), 20.3 (+, b- $CH_3CHOH$ ), 21.3 (+, a- $CH_3CHOH$ ), 22.8 (+, a- $CH_3CO$ ), 23.4 (+, b- $CH_3CO$ ), 28.8 (-,  $SCH_2$ ), 39.5 (-,  $NCH_2$ ), 54.6 (+, b- $COCHCH_3$ ), 56.0 (+, a- $COCHCH_3$ ), 68.5 (-, b- $CHOH$ ), 70.2 (-, a- $CHOH$ ), 170.7 ( $C_q$ ,  $CH_3CO$ ), 204.2 ( $C_q$ ,  $COS$ ).

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.10 (H/EE 1:9).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  [ $M+Na$ ]<sup>+</sup> 242.0819 (berechnet 242.0821).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[128]</sup>

6.11.2 3-Hydroxy-2-methylpentansäure(*N*-acetylcysteamin)thioester (**108**)

Natriumborhydrid (3.70 mg, 98.7  $\mu\text{mol}$ , 1.9 Äq.) wurde in absolutem Ethanol (10 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. 2-Methyl-3-oxopentansäure(SNAC)thioester (**35**) (48.6 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem Ethanol (5 mL) wurde zugetropft und für 5 h bei 0 °C gerührt. Gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung (1.0 mL) wurde hinzugegeben und Lösungsmittel wurde im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in Wasser (15 mL) aufgenommen und mit Ethylacetat (3 $\times$  15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (PE/EE 1:9) gereinigt. 3-Hydroxy-2-methylpentansäure(SNAC)thioester (**108**) (18.2 mg, 78.0  $\mu\text{mol}$ , 37%, *dr* (a:b) 64:36) wurde als farbloses Öl erhalten.

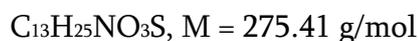
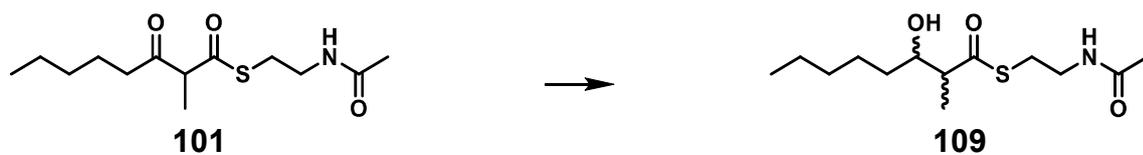
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.96 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H, b- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 0.98 (t,  $J = 7.6$  Hz, 3H, a- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.21 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, b- $\text{CHCH}_3$ ), 1.21 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, a- $\text{CHCH}_3$ ), 1.24 (bs, 1H, OH), 1.39-1.54 (m, 2H, a- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.55-1.65 (m, 2H, b- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.96 (s, 3H, a- $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 1.96 (s, 3H, b- $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.73 (qd,  $J = 7.1, 3.7$  Hz, 1H, b- $\text{CHCH}_3$ ), 2.76 (qd,  $J = 7.1, 7.0$  Hz, 1H, a- $\text{CHCH}_3$ ), 2.98-3.08 (m, 2H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.38-3.51 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.62-3.68 (m, 1H, a- $\text{CHOH}$ ), 3.84 (ddd,  $J = 8.4, 4.8, 3.7$  Hz, 1H, b- $\text{CHOH}$ ), 5.93 (bs, 1H, NH).

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.16 (PE/EE 1:9).

**HRMS (ESI<sup>+</sup>):**  $m/z$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup> 256.0974 (berechnet 256.0978).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[127,171]</sup>

### 6.11.3 3-Hydroxy-2-methyloctansäure(*N*-acetylcysteamin)thioester (**109**)



Eine Lösung aus Natriumborhydrid (8.30 mg, 0.22 mmol, 1.9 Äq.) in absolutem Ethanol (10 mL) wurde auf 0 °C gekühlt. 2-Methyl-3-oxooctansäure(SNAC)thioester (**101**) (31.6 mg, 0.12 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Ethanol (5 mL) gelöst und tropfenweise zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei 0 °C gerührt und auf Raumtemperatur erwärmt. Gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung (1.0 mL) wurde zur die Reaktionslösung gegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser (15 mL) gelöst und mit Ethylacetat (5× 15 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Die Reinigung des Rückstands erfolgte mittels präparativer HPLC. 3-Hydroxy-2-methyloctansäure(SNAC)thioester (**109**) (7.50 mg, 27.2  $\mu$ mol, 24%, *dr* (a:b) 41:59) wurde als farbloses Öl isoliert.

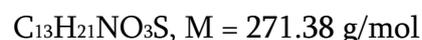
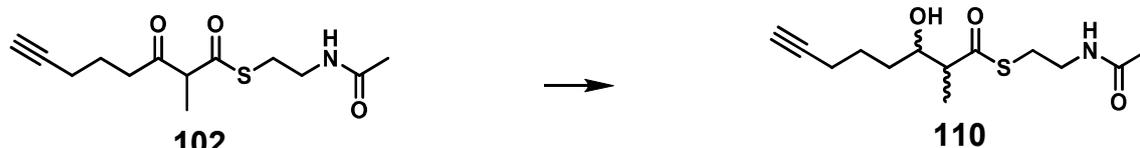
$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.89 (t,  $J = 6.7$  Hz, 3H,  $CH_2CH_3$ ), 1.21 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, b- $CHCH_3$ ), 1.22 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, a- $CHCH_3$ ), 1.26-1.54 (m, 8H,  $CH_2$ ), 1.96 (s, 3H, a- $CH_3CO$ ), 1.96 (s, 3H, b- $CH_3CO$ ), 2.30 (bs, 1H, a- $OH$ ), 2.38 (bs, 1H, b- $OH$ ), 2.72 (qd,  $J = 7.0$ , 3.6 Hz, 1H, b- $CHCH_3$ ), 2.75 (qd,  $J = 7.1$ , 7.0 Hz, 1H, a- $CHCH_3$ ), 2.98-3.08 (m, 2H,  $SCH_2$ ), 3.38-3.52 (m, 2H,  $NCH_2$ ), 3.68-3.74 (m, 1H, a- $CHOH$ ), 3.88-3.96 (m, 1H, b- $CHOH$ ), 5.81 (bs, 1H,  $NH$ ).

$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.2 (+, b- $CHCH_3$ ), 14.2 (+,  $CH_3$ ), 15.3 (+, a- $CHCH_3$ ), 22.7 (-,  $CH_2$ ), 23.4 (+,  $CH_3CO$ ), 25.2 (-, a- $CH_2CH_2CH$ ), 25.8 (-, b- $CH_2CH_2CH$ ), 28.7 (-,  $SCH_2$ ), 31.8 (-,  $CH_2$ ), 34.3 (-, b- $CH_2CH$ ), 34.9 (-, a- $CH_2CH$ ), 39.5 (-,  $NCH_2$ ), 53.4 (+, b- $CHCH_3$ ), 54.3 (+, a- $CHCH_3$ ), 72.3 (+, b- $CHOH$ ), 74.0 (+, a- $CHOH$ ), 170.6 ( $C_q$ ,  $CH_3CO$ ), 204.5 ( $C_q$ ,  $COS$ ).

**HRMS (ESI+):**  $m/z$  [ $M+Na$ ] $^+$  298.1443 (berechnet 298.1447).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[129]</sup>

### 6.11.4 3-Hydroxy-2-methyl-7-octinsäure(*N*-acetylcysteamin)thioester (**110**)



Natriumborhydrid (7.20 mg, 0.19 mmol, 1.4 Äq.) wurde in absolutem Methanol (10 mL) vorgelegt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt und  $\beta$ -Ketosubstrat **102** (37.0 mg, 0.14 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem Methanol (4.5 mL) hinzuge tropft. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei 0 °C gerührt. Gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung (2.0 mL) wurde hinzugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser (16 mL) aufgenommen und mit Ethylacetat (3× 18 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels präparativer HPLC gereinigt. 3-Hydroxy-2-methyl-7-octinsäure(SNAC)thioester (**110**) (10.3 mg, 38.0  $\mu\text{mol}$ , 28%, *dr* (a:b) 71:29) wurde als farbloses Öl erhalten.

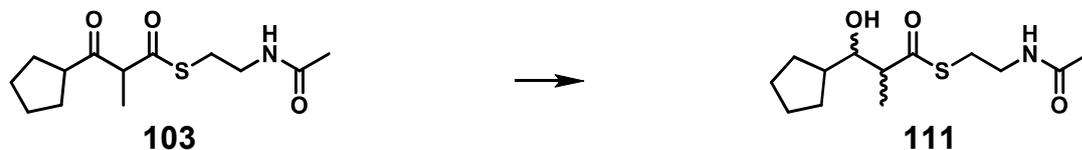
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.23 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, b- $\text{CHCH}_3$ ), 1.24 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H, a- $\text{CHCH}_3$ ), 1.47-1.80 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHOH}$ ), 1.96 (t,  $J = 2.6$  Hz, 1H,  $\text{CCH}$ ), 1.97 (s, 3H, a- $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 1.98 (s, 3H, b- $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2.24 (td,  $J = 6.6, 2.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CCH}$ ), 2.70-2.80 (m, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 2.98-3.10 (m, 2H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.39-3.54 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.71-3.78 (m, 1H, a- $\text{CHOH}$ ), 3.92-3.98 (m, 1H, b- $\text{CHOH}$ ), 5.84 (bs, 1H,  $\text{NH}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 11.3 (+, b- $\text{CHCH}_3$ ), 15.3 (+, a- $\text{CHCH}_3$ ), 18.3 (-, a- $\text{CH}_2\text{CCH}$ ), 18.4 (-, b- $\text{CH}_2\text{CCH}$ ), 23.4 (+,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 24.4 (-, a- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 25.0 (-, b- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 28.8 (-,  $\text{SCH}_2$ ), 33.2 (-, b- $\text{CH}_2\text{CHOH}$ ), 33.8 (-, a- $\text{CH}_2\text{CHOH}$ ), 39.5 (-,  $\text{NCH}_2$ ), 53.5 (+, b- $\text{CHCH}_3$ ), 54.4 (+, a- $\text{CHCH}_3$ ), 68.9 (+, b- $\text{CCH}$ ), 68.9 (+, a- $\text{CCH}$ ), 71.8 (+, b- $\text{CHOH}$ ), 73.5 (+, a- $\text{CHOH}$ ), 84.2 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CCH}$ ), 170.7 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 204.3 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COS}$ ).

**HRMS (ESI+)**:  $m/z$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  294.1134 (berechnet 294.1134).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[130]</sup>

### 6.11.5 3-Cyclopentyl-3-hydroxy-2-methylpropansäure(*N*-acetylcysteamin)thioester (**111**)



$C_{13}H_{23}NO_3S$ ,  $M = 273.39$  g/mol

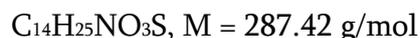
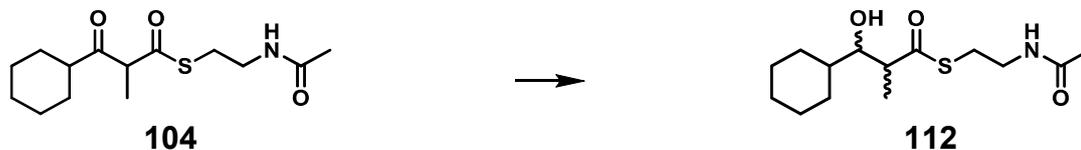
Natriumborhydrid (7.00 mg, 0.19 mmol, 4.0 Äq.) wurde in absolutem Methanol (9.3 mL) auf 0 °C gekühlt.  $\beta$ -Ketosubstrat **103** (50.0 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem Methanol (6.0 mL) wurde zugetropft und für 30 min bei 0 °C gerührt. Gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung (2.0 mL) wurde zugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser (17 mL) gelöst und mit Ethylacetat (3× 19 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der  $\beta$ -Alkohol **111** (26.0 mg, 95.1  $\mu$ mol, 52%) wurde mittels präparativer HPLC als farbloses Öl isoliert.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.27 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $CHCH_3$ ), 1.34-1.48 (m, 1H,  $CH_2$ ), 1.48-1.68 (m, 5H,  $CH_2$ ), 1.69-1.79 (m, 2H,  $CH_2$ ), 1.89-1.99 (m, 1H,  $CHCH_2$ ), 1.97 (s, 3H,  $CH_3CO$ ), 2.29 (s, 1H,  $OH$ ), 2.84 (qd,  $J = 7.1, 5.6$  Hz, 1H,  $CHCH_3$ ), 2.99-3.09 (m, 2H,  $SCH_2$ ), 3.43-3.51 (m, 2H,  $NCH_2$ ), 3.39-3.52 (m, 1H, a- $CHOH$ ), 3.68-3.76 (m, 1H, b- $CHOH$ ), 5.87 (bs, 1H,  $NH$ ).

$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 16.0 (+,  $CHCH_3$ ), 23.3 (+,  $CH_3CO$ ), 25.7 (-,  $CH_2$ ), 25.9 (-,  $CH_2$ ), 28.0 (-,  $CH_2$ ), 28.6 (-,  $SCH_2$ ), 29.6 (-,  $CH_2$ ), 39.7 (-,  $NCH_2$ ), 44.1 (+,  $CHCH_2$ ), 52.6 (+,  $CHCH_3$ ), 77.9 (+,  $CHOH$ ), 170.6 ( $C_q$ ,  $CH_3CO$ ), 204.9 ( $C_q$ ,  $COS$ ).

HRMS (ESI+):  $m/z$  [ $M+Na$ ] $^+$  296.1292 (berechnet 296.1291).

### 6.11.6 3-Cyclohexyl-3-hydroxy-2-methylpropansäure(*N*-acetylcysteamin)-thioester (**112**)



Natriumborhydrid (8.00 mg, 0.211 mmol, 4.6 Äq.) wurde in absolutem Methanol (10 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Das in absolutem Methanol (6.0 mL) gelöste  $\beta$ -Keto-substrat **104** (53.0 mg, 0.186 mmol, 1.0 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben und für 30 min bei 0 °C gerührt. Gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung (2.0 mL) wurde z. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der Rückstand in Wasser (19 mL) aufgenommen. Die Extraktion erfolgte mit Ethylacetat (3× 21 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. 3-Cyclohexyl-3-hydroxy-2-methylpropansäure(SNAC)thioester (**112**) (27.0 mg, 93.9  $\mu\text{mol}$ , 51%) wurde mittels präparativer HPLC gereinigt und als farbloses Öl erhalten.

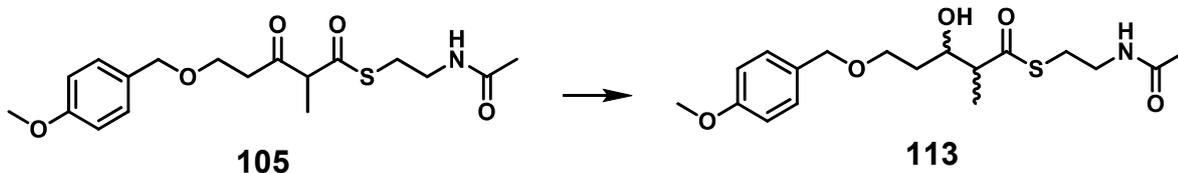
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.02-1.29 (m, 5H,  $\text{CH}_2$ ), 1.21 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.34-1.43 (m, 1H,  $\text{CHCH}_2$ ), 1.57-1.69 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.72-1.80 (m, 3H,  $\text{CH}_2$ ), 1.96 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 2.24 (s, 1H, OH), 2.91 (qd,  $J = 7.1, 7.1$  Hz, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 2.98-3.09 (m, 2H,  $\text{SCH}_2$ ), 3.38-3.51 (m, 2H,  $\text{NCH}_2$ ), 3.42-3.47 (m, 1H, a- $\text{CHOH}$ ), 3.74-3.78 (m, 1H, b- $\text{CHOH}$ ), 6.01 (bs, 1H, NH).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 15.7 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 23.3 (+,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 26.1 (-,  $\text{CH}_2$ ), 26.4 (-,  $\text{CH}_2$ ), 26.4 (-,  $\text{CH}_2$ ), 26.6 (-,  $\text{CH}_2$ ), 28.6 (-,  $\text{SCH}_2$ ), 30.2 (-,  $\text{CH}_2$ ), 39.6 (-,  $\text{NCH}_2$ ), 40.9 (+,  $\text{CHCH}_2$ ), 51.0 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 78.3 (+,  $\text{CHOH}$ ), 170.7 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 204.8 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{COS}$ ).

**HRMS (ESI+)**:  $m/z$  [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$  310.1445 (berechnet 310.1447).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[172]</sup>

### 6.11.7 3-Hydroxy-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-2-methyl-pentansäure- (*N*-acetylcysteamin)thioester (**113**)



$C_{18}H_{27}NO_5S$ ,  $M = 369.48$  g/mol

Natriumborhydrid (6.80 mg, 0.180 mmol, 4.1 Äq.) wurde in absolutem Methanol (9.0 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt.  $\beta$ -Ketosubstrat **105** (62.3 mg, 0.176 mmol, 1.0 Äq.) in absolutem Methanol (5.6 mL) wurde zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 1 h bei 0 °C gerührt. Gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung (2.0 mL) wurde zugegeben und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser (16 mL) aufgenommen und mit Ethylacetat (3× 18 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Reinigung des Rückstands erfolgte mittels präparativer HPLC. Der  $\beta$ -Alkohol **113** (45.0 mg, 0.122 mmol, 69%, *dr* (a:b) 75:25) wurde als farbloses Öl erhalten.

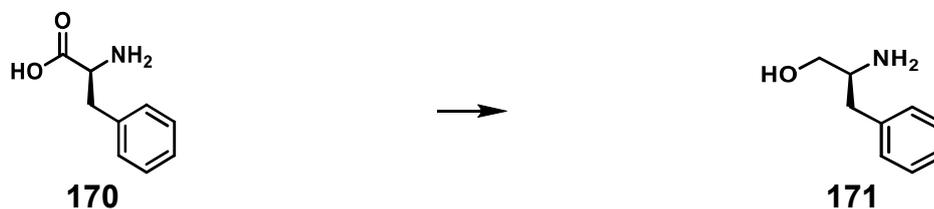
$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.15 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, a- $CHCH_3$ ), 1.22 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H, b- $CHCH_3$ ), 1.65-1.86 (m, 2H,  $CH_2CHOH$ ), 1.91 (s, 3H, a- $CH_3CO$ ), 1.93 (s, 3H, b- $CH_3CO$ ), 2.73 (dq,  $J = 7.1, 5.6$  Hz, 1H, b- $CHCH_3$ ), 2.76 (dq,  $J = 7.4, 7.1$  Hz, 1H, a- $CHCH_3$ ), 2.96-3.11 (m, 2H,  $SCH_2$ ), 3.34-3.52 (m, 2H,  $NCH_2$ ), 3.58-3.74 (m, 2H,  $OCH_2CH_2$ ), 3.79 (s, 3H,  $CH_3O$ ), 3.97 (ddd,  $J = 9.8, 7.4, 2.6$  Hz, 1H, a- $CHOH$ ), 4.08 (ddd,  $J = 9.3, 5.6, 2.6$  Hz, 1H, b- $CHOH$ ), 4.44 (s, 2H,  $OCH_2C$ ), 5.93 (bs, 1H, b- $NH$ ), 6.02 (bs, 1H, a- $NH$ ), 6.85-6.88 (m, 2H,  $Ar_m-H$ ), 7.20-7.25 (m, 2H,  $Ar_o-H$ ).

$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 12.4 (+, b- $CHCH_3$ ), 14.4 (+, a- $CHCH_3$ ), 23.3 (+,  $CH_3CO$ ), 28.6 (-,  $SCH_2$ ), 33.6 (-, b- $CH_2CH$ ), 33.8 (-, a- $CH_2CH$ ), 39.5 (-,  $NCH_2$ ), 54.0 (+, b- $CHOH$ ), 54.4 (+, a- $CHOH$ ), 55.4 (+,  $OCH_3$ ), 68.6 (-, b- $OCH_2CH_2$ ), 68.6 (-, a- $OCH_2CH_2$ ), 72.1 (+, b- $CHCH_3$ ), 73.2 (-, b- $OCH_2C$ ), 73.3 (-, a- $OCH_2C$ ), 73.7 (+, a- $CHCH_3$ ), 114.0 (+,  $C-Ar_m$ ), 129.5 (+, b- $C-Ar_o$ ), 129.5 (+, a- $C-Ar_o$ ), 129.8 ( $C_q$ , a- $C-Ar_1$ ), 129.9 ( $C_q$ , b- $C-Ar_1$ ), 159.5 ( $C_q$ ,  $C-Ar_p$ ), 170.6 ( $C_q$ ,  $CH_3CO$ ), 203.4 ( $C_q$ ,  $COS$ ).

**HRMS (ESI+):**  $m/z$  [ $M+Na$ ] $^+$  392.1501 (berechnet 392.1502).

## 6.12 Synthesen für VCD-Referenzsubstanzen

### 6.12.1 (S)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol (171)



$C_9H_{13}NO$ ,  $M = 151.21 \text{ g/mol}$

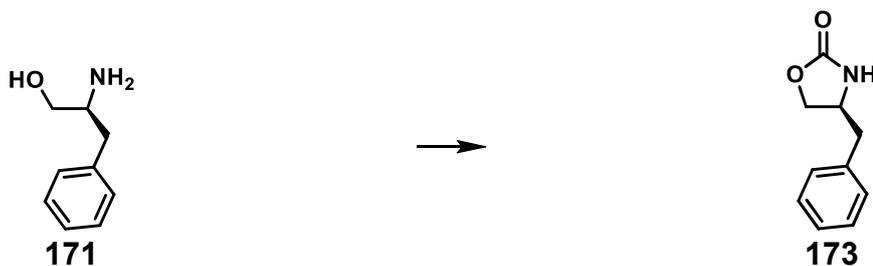
L-Phenylalanin (**170**) (15.0 g, 90.8 mmol, 1.0 Äq.) wurde zusammen mit Natriumborhydrid (7.5 g, 198 mmol, 2.2 Äq.) unter Argon-Atmosphäre in absolutem Tetrahydrofuran (250 mL) suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Iod (23.0 g, 90.6 mmol, 1.0 Äq., in 75 mL absolutem Tetrahydrofuran) wurde über 45 min zur Suspension getropft. Nach Ende der Gasentwicklung wurde die Suspension unter Reflux über Nacht gerührt. Die Suspension wurde auf Raumtemperatur gekühlt und mit Methanol (50 mL) versetzt. Die Lösung wurde im Vakuum vom Lösungsmittel befreit, der farblose Rückstand in 2 M Natronlauge (300 mL, 600 mmol, 6.6 Äq.) gelöst und für 8 h gerührt. Die Extraktion erfolgte mit Dichlormethan (3× 200 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. (S)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol (**171**) (13.7 g, 90.3 mmol, quantitativ/Rohausbeute) wurde als farbloses Öl erhalten.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.72 (s, 3H, OH, NH<sub>2</sub>), 2.54 (dd,  $J = 13.5, 8.6 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{CH}_a\text{H}_b\text{OH}$ ), 2.80 (dd,  $J = 13.5, 5.3 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{CH}_a\text{H}_b\text{OH}$ ), 3.09-3.17 (m, 1H,  $\text{CHNH}_2$ ), 3.39 (dd,  $J = 10.6, 7.2 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{CCH}_a\text{H}_b$ ), 3.65 (dd,  $J = 10.6, 3.9 \text{ Hz}$ , 1H,  $\text{CCH}_a\text{H}_b$ ), 7.17-7.25 (m, 3H,  $\text{Ar}_o\text{-H}$ ,  $\text{Ar}_p\text{-H}$ ), 7.29-7.34 (m, 2H,  $\text{Ar}_m\text{-H}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 41.1 (–,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 54.3 (+,  $\text{CHNH}_2$ ), 66.6 (–,  $\text{CCH}_2$ ), 126.6 (+,  $\text{C-Ar}_p$ ), 128.7 (+,  $\text{C-Ar}_m$ ), 129.4 (+,  $\text{C-Ar}_o$ ), 138.8 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{C-Ar}_1$ ).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[173]</sup>

### 6.12.2 (S)-4-Benzyl-2-oxazolidinon (173)



$C_{10}H_{11}NO_2$ ,  $M = 177.20$  g/mol

Der Aminoalkohol **171** (13.6 g, 90.0 mmol, 1.0 Äq.) wurde mit Kaliumcarbonat (1.30 g, 9.41 mmol, 10 mol%) und Diethylcarbonat (**172**) (23.4 mL, 22.8 g, 193 mmol, 2.2 Äq.) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 140 °C erhitzt und für 1 h gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde Dichlormethan (100 mL) hinzugegeben und die Lösung filtriert. Die organische Phase wurde mit 1 M Natriumhydrogencarbonat-Lösung (1× 40 mL, 1× 20 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde umkristallisiert (H/EE: 1:1, Kristallisation bei -20 °C), der Feststoff abfiltriert und im Vakuum getrocknet. (S)-4-Benzyl-2-oxazolidinon (**173**) (8.07 g, 45.6 mmol, 51%) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

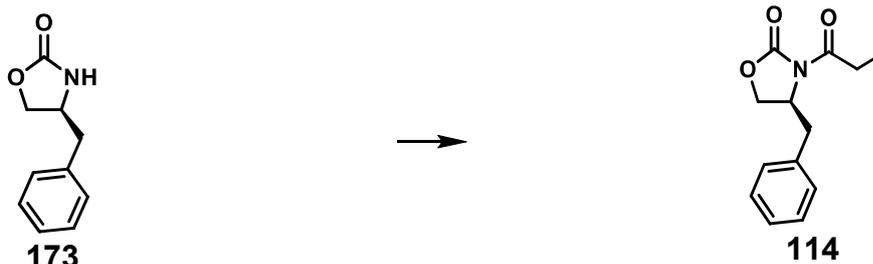
$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.88 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H,  $CCH_2$ ), 4.05-4.13 (m, 1H,  $NCH$ ), 4.15 (dd,  $J = 8.5, 5.6$  Hz, 1H,  $OCH_aH_b$ ), 4.42-4.49 (m, 1H,  $OCH_aH_b$ ), 5.43-5.67 (m, 1H,  $NH$ ), 7.15-7.20 (m, 2H,  $Ar_o-H$ ), 7.25-7.30 (m, 1H,  $Ar_p-H$ ), 7.31-7.37 (m, 2H,  $Ar_m-H$ ).

$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 41.6 (-,  $CCH_2$ ), 53.9 (+,  $NCH$ ), 69.8 (-,  $OCH_2$ ), 127.4 (+,  $C-Ar_p$ ), 129.1 (+,  $C-Ar_m$ ), 129.2 (+,  $C-Ar_o$ ), 136.1 ( $C_q$ ,  $C-Ar_1$ ), 159.3 ( $C_q$ ,  $CO$ ).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{21} = -62.5$  ( $c = 1.0$ ,  $CHCl_3$ ).

**UPLC-MS (ESI+):**  $m/z$   $[M+Na]^+$  200.24 (berechnet 200.19).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[174]</sup>

6.12.3 (S)-4-Benzyl-3-propionyl-2-oxazolidinon (**114**)

$C_{13}H_{15}NO_3$ ,  $M = 233.27$  g/mol

Das Oxazolidinon **173** (4.00 g, 22.6 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Tetrahydrofuran (15 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Unter Rühren wurden Propionsäureanhydrid (4.50 mL, 4.59 g, 35.3 mmol, 1.6 Äq.), Triethylamin (3.75 mL, 2.72 g, 26.9 mmol, 1.2 Äq.) und DMAP (150 mg, 1.23 mmol, 5 mol%) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde über 20 h bei Raumtemperatur gerührt. Durch die Zugabe von 1 M Natronlauge (25 mL) und halbgesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (25 mL) wurde die Reaktion beendet. Die Extraktion erfolgte mit Dichlormethan (3× 25 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. (S)-4-Benzyl-3-propionyl-2-oxazolidinon (**114**) (4.90 g, 21.0 mmol, 93%) wurde als leicht gelbes Öl erhalten.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.21 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H,  $CH_3$ ), 2.77 (dd,  $J = 13.4, 10.2$  Hz, 1H,  $CCH_aH_b$ ), 2.87-3.04 (m, 2H,  $CH_2CH_3$ ), 3.31 (dd,  $J = 13.4, 3.3$  Hz, 1H,  $CCH_aH_b$ ), 4.17 (dd,  $J = 13.5, 3.1$  Hz, 1H,  $OCH_aH_b$ ), 4.20 (dd,  $J = 13.5, 7.5$  Hz, 1H,  $OCH_aH_b$ ), 4.67 (dddd,  $J = 10.2, 7.5, 3.3, 3.1$  Hz, 1H,  $NCH$ ), 7.19-7.23 (m, 2H,  $Ar_o-H$ ), 7.26-7.30 (m, 1H,  $Ar_p-H$ ), 7.31-7.36 (m, 2H,  $Ar_m-H$ ).

$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.4 (+), 29.4 (-,  $CH_2CH_3$ ), 38.1 (-,  $CCH_2$ ), 55.3 (+,  $NCH$ ), 66.4 (-,  $OCH_2$ ), 127.5 (+,  $C-Ar_p$ ), 129.1 (+,  $C-Ar_m$ ), 129.6 (+,  $C-Ar_o$ ), 135.5 ( $C_q$ ,  $C-Ar_1$ ), 153.7 ( $C_q$ ,  $CO$ ), 174.2 ( $C_q$ ,  $COCH_2$ ).

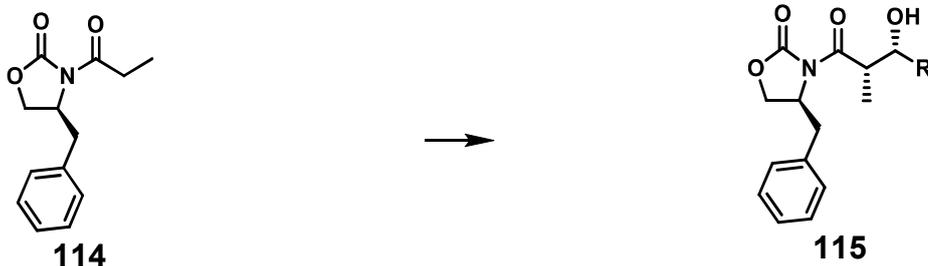
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.60 (H/EE: 2:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{21} = +6.7$  (c = 1.0,  $CHCl_3$ ).

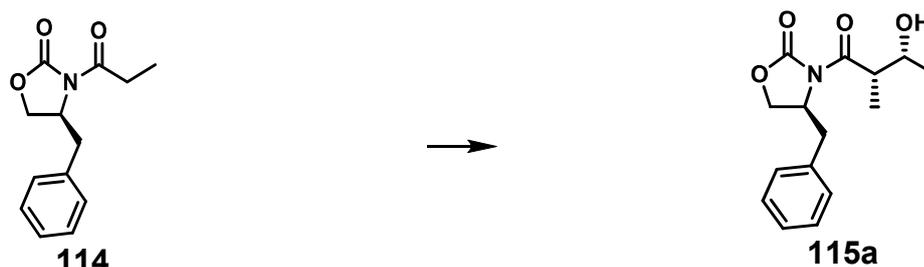
**HRMS (ESI+):** m/z  $[M+H]^+$  234.1119 (berechnet 234.1130).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[175]</sup>

#### 6.12.4 (S)-4-Benzyl-3-((2S,3R)-3-hydroxy-2-methylalkanoyl)-2-oxazolidinon (115)



Das propionylierte Oxazolidinon **114** (500 mg, 2.15 mmol, 1.0 Äq.) wurde in absolutem Dichlormethan (12.5 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dibutylboranyltriflat (1 M in Dichlormethan, 2.40 mL, 2.40 mmol, 1.1 Äq.) wurde über 15 min langsam zugetropft, gefolgt von DIPEA (520 µL, 394 mg, 3.05 mmol, 1.4 Äq.). Die Lösung wurde 15 min bei 0 °C gerührt, bevor auf -78 °C gekühlt wurde. Der jeweilige Aldehyd (4.3-6.4 mmol, 2.0-3.0 Äq.) wurde tropfenweise zugegeben und die Reaktion für 4 h bei -78 °C gerührt. Die Lösung wurde auf 0 °C erwärmt und mit 1 M Phosphatpuffer (12.5 mL, pH 7) und Methanol (4.20 mL) versetzt. Zusätzlich erfolgte die tropfenweise Zugabe von einer Lösung aus Methanol und 30% Wasserstoffperoxid-Lösung (12.5 mL, 2:1) über 15 min. Die Mischung wurde über Nacht unter Rühren auf Raumtemperatur erwärmt. Dichlormethan (30 mL) und Wasser (20 mL) wurden zugesetzt und die wässrige Phase mit Dichlormethan (3× 30 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (50 mL) und gesättigter Natriumchlorid-Lösung (50 mL) gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der jeweilige Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt. Im Folgenden sind molekulspezifische Details und die jeweiligen analytischen Daten aufgeführt.

**(S)-4-Benzyl-3-((2S,3R)-3-hydroxy-2-methylbutanoyl)-2-oxazolidinon (115a)**

$C_{15}H_{19}NO_4$ ,  $M = 277.32$  g/mol

(S)-4-Benzyl-3-((2S,3R)-3-hydroxy-2-methylbutanoyl)-2-oxazolidinon (**115a**) wurde als leicht gelbes Öl erhalten (463 mg, 1.67 mmol, 99:1, 78%).

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.21 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H,  $CHOHCH_3$ ), 1.27 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $COCHCH_3$ ), 2.79 (dd,  $J = 13.4, 9.4$  Hz, 1H,  $CCH_aH_b$ ), 2.90 (s, 1H, OH), 3.25 (dd,  $J = 13.4, 3.3$  Hz, 1H,  $CCH_aH_b$ ), 3.74 (qd,  $J = 7.1, 2.9$  Hz, 1H,  $COCH$ ), 4.14-4.26 (m, 3H,  $CHOH, OCH_2$ ), 4.72 (ddt,  $J = 9.4, 7.6, 3.3$  Hz, 1H,  $NCH$ ), 7.19-7.22 (m, 2H,  $Ar_o-H$ ), 7.26-7.31 (m, 1H,  $Ar_p-H$ ), 7.32-7.36 (m, 2H,  $Ar_m-H$ ).

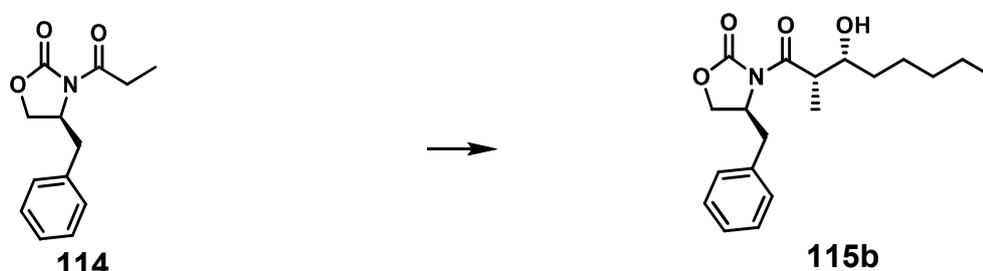
$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 10.6 (+,  $COCHCH_3$ ), 19.7 (+,  $CHCH_3$ ), 37.9 (-,  $CCH_2$ ), 43.2 (+,  $COCH$ ), 55.2 (+,  $NCH$ ), 66.3 (-,  $OCH_2$ ), 67.8 (+,  $CHOH$ ), 127.6 (+,  $C-Ar_p$ ), 129.1 (+,  $C-Ar_m$ ), 129.6 (+,  $C-Ar_o$ ), 135.1 ( $C_q, C-Ar_1$ ), 153.3 ( $C_q, COO$ ), 177.5 ( $C_q, COCH$ ).

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.39 (H/EE: 1:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{21} = +54.0$  ( $c = 1.0, CHCl_3$ ).

**HRMS (ESI+):**  $m/z$   $[M-H_2O+H]^+$  260.1280 (berechnet 260.1281).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[176]</sup>

**(S)-4-Benzyl-3-((2S,3R)-3-hydroxy-2-methyloctanoyl)-2-oxazolidinon (115b)**

$C_{19}H_{27}NO_4$ ,  $M = 333.43$  g/mol

(S)-4-Benzyl-3-((2S,3R)-3-hydroxy-2-methyloctanoyl)-2-oxazolidinon (**115b**) wurde als leicht gelbes Öl isoliert (483 mg, 1.45 mmol, 99:1, 67%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.25 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 1.27-1.36 (m, 5H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.36-1.67 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.78 (dd, *J* = 13.4, 9.5 Hz, 1H, CCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.24 (dd, *J* = 13.4, 3.3 Hz, 1H, CCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.76 (qd, *J* = 7.1, 2.7 Hz, 1H, COCH), 3.91-3.97 (m, 1H, CHOH), 4.25-4.15 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.70 (ddt, *J* = 9.5, 7.6, 3.3 Hz, 1H, NCH), 7.17-7.22 (m, 2H, Ar<sub>o</sub>-H), 7.25-7.29 (m, 1H, Ar<sub>p</sub>-H), 7.30-7.35 (m, 2H, Ar<sub>m</sub>-H).  
<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 10.5 (+, COCHCH<sub>3</sub>), 14.2 (C+, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22.7 (-, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 25.8 (-, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 31.9 (-, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 33.9 (-, CH<sub>2</sub>CHOH), 37.9 (-, CCH<sub>2</sub>), 42.2 (+, COCH), 55.2 (+, NCH), 66.3 (-, OCH<sub>2</sub>), 71.6 (+, CHOH), 127.6 (+, C-Ar<sub>p</sub>), 129.1 (+, C-Ar<sub>m</sub>), 129.6 (+, C-Ar<sub>o</sub>), 135.2 (C<sub>q</sub>, C-Ar<sub>1</sub>), 153.2 (C<sub>q</sub>, COO), 177.8 (C<sub>q</sub>, COCH).

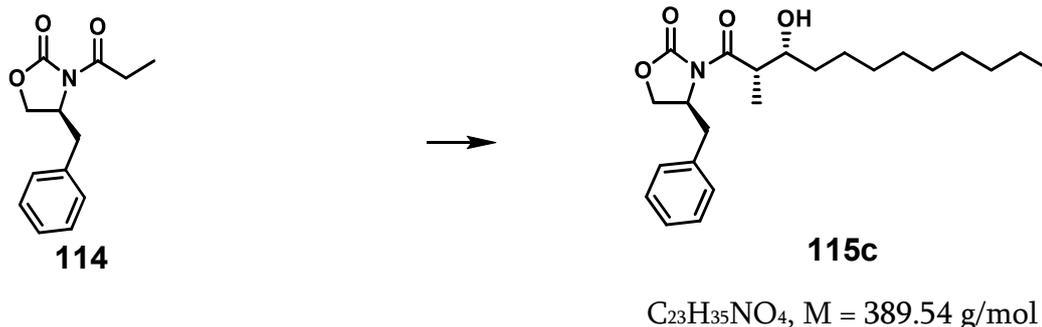
R<sub>f</sub>-Wert: 0.32 (H/EE: 3:1).

Drehwert: [α]<sub>D</sub><sup>21</sup> = +61.0 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

HRMS (ESI+): *m/z* [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> 316.1902 (berechnet 316.1907).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[177]</sup>

**(S)-4-Benzyl-3-((2S,3R)-3-hydroxy-2-methyldodecanoyl)-2-oxazolidinon (115c)**



(S)-4-Benzyl-3-((2S,3R)-3-hydroxy-2-methyldodecanoyl)-2-oxazolidinon (**115c**) wurde als leicht gelbes Öl erhalten (365 mg, 1.70 mmol, 99:1, 78%).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.26 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 1.21-1.36 (m, 14H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.36-1.59 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.79 (dd, *J* = 13.4, 9.5 Hz, 1H, CCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.25 (dd, *J* = 13.4, 3.3 Hz, 1H, CCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.76 (qd, *J* = 7.1, 2.6 Hz, 1H, COCH), 3.92-3.97 (m, 1H, CHOH), 4.17-4.25 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.71 (ddt, *J* = 9.5, 7.6, 3.3 Hz, 1H, NCH), 7.19-7.22 (m, 2H, Ar<sub>o</sub>-H), 7.26-7.30 (m, 1H, Ar<sub>p</sub>-H), 7.31-7.36 (m, 2H, Ar<sub>m</sub>-H).  
<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 10.5 (+, COCHCH<sub>3</sub>), 14.3 (+, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 22.8 (-, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 26.2 (-, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29.5 (-, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29.71 (-, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29.72 (-, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 32.0 (-, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 34.0 (-, CH<sub>2</sub>CHOH), 37.9 (-, CCH<sub>2</sub>), 42.2 (+, COCH), 55.2 (+, NCH), 66.3 (-, OCH<sub>2</sub>), 71.6 (+, CHOH), 127.6 (+, C-Ar<sub>p</sub>), 129.1 (+, C-Ar<sub>m</sub>), 129.6 (+, C-Ar<sub>o</sub>), 135.2 (C-Ar<sub>1</sub>), 153.2 (COO), 177.8 (COCH).

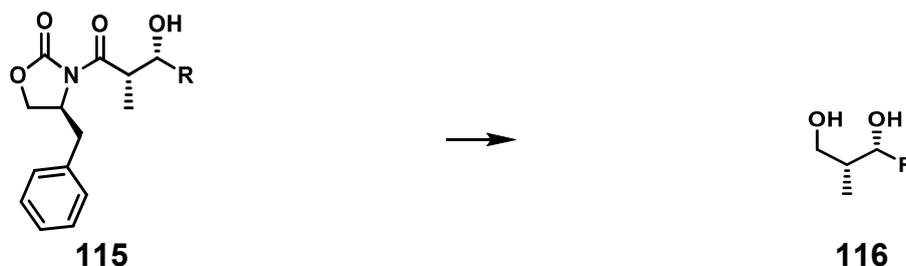
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.20 (H/EE: 4:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = +39.4$  (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

**HRMS (ESI+):** m/z [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> 372.2526 (berechnet 372.2533).

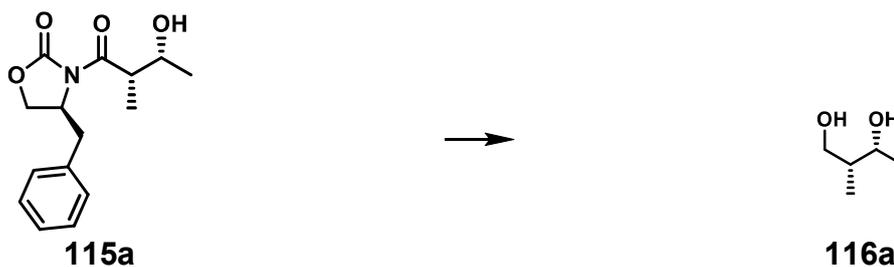
Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[178]</sup>

### 6.12.5 (2*R*,3*R*)-2-Methylalkyl-1,3-diol (**116**)



Der Alkohol **115** (1 Äq.) wurde in Diethylether und absolutem Methanol (20:1, 8.5 mL je mmol **115**) gelöst. Lithiumborhydrid (1.5 Äq.) wurde bei 0 °C in kleinen Portionen unter Rühren hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 0 °C über mehrere Stunden gerührt und mittels DC überwacht. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 M Salzsäure (4.0-4.5 mL je mmol **115**) beendet. Die wässrige Phase wurde mit Dichlormethan (4× 4.0-4.5 mL je mmol **115**) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand mit dem Diol **116** wurde ohne weitere Reinigung in die nächste Reaktion eingesetzt. Im Folgenden sind molekülspezifische Details und die jeweiligen analytischen Daten aufgeführt, die durch die separate Synthese des Diols und Isolierung mittels Säulen-chromatographie erhalten wurden.

**(2*R*,3*R*)-2-Methylbutan-1,3-diol (116a)**



$C_5H_{12}O_2$ ,  $M = 104.15$  g/mol

(2*R*,3*R*)-2-Methylbutan-1,3-diol (**116a**) wurde als farbloses Öl erhalten (102 mg, 0.98 mmol, 92%).

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.89 (d,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $CH_2CHCH_3$ ), 1.17 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H,  $CHOHCH_3$ ), 1.24 (s, 2H, OH), 1.99-2.11 (m, 1H,  $CH_2CH$ ), 3.78 (dd,  $J = 10.9, 7.4$  Hz, 1H,  $CH_2$ ), 3.94 (dd,  $J = 10.9, 4.0$  Hz, 1H,  $CH_2$ ), 4.20 (qd,  $J = 6.6, 4.1$  Hz, 1H,  $CHOHCH_3$ ).

$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 10.9 (+,  $CH_2CHCH_3$ ), 17.6 (+,  $CHCHCH_3$ ), 29.8, 34.3 (+,  $CH_2CHCH_3$ ), 66.5 (-,  $CH_2OH$ ), 71.5 (+,  $CHOH$ ).

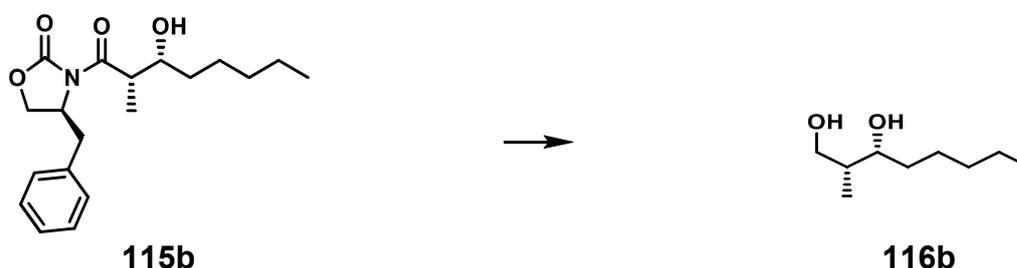
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.23 (H/EE: 1:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_D^{21} = +11.8$  ( $c = 1.0$ ,  $CHCl_3$ ).

**HRMS (ESI+):**  $m/z$   $[M-H_2O+H]^+$  87.0809 (berechnet 87.0804).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[179,180]</sup>

**(2*R*,3*R*)-2-Methyloctan-1,3-diol (116b)**



$C_9H_{20}O_2$ ,  $M = 160.26$  g/mol

(2*R*,3*R*)-2-Methyloctan-1,3-diol (**116b**) wurde als farbloses Öl isoliert (156 mg, 0.97 mmol, 83%).

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.89 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 0.91-0.93 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.25-1.36 (m, 5H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.37-1.54 (m, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.74-1.84 (m, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 2.07 (s, 2H, OH), 3.69-3.76 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.80-3.85 (m, 1H,  $\text{CHOH}$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 10.2 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 14.2 (+,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 22.8 (-,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 26.0 (-,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 32.0 (-,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 34.2 (-,  $\text{CHOHCH}_2$ ), 39.2 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 67.5 (-,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 74.9 (+,  $\text{CHOH}$ ).

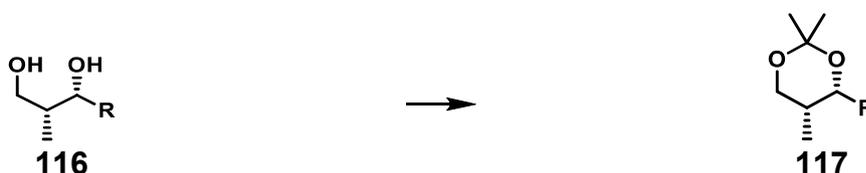
**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.20 (H/EE: 3:1).

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = +1.7$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**HRMS (ESI+):**  $m/z$   $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$  143.1431 (berechnet 143.1430).

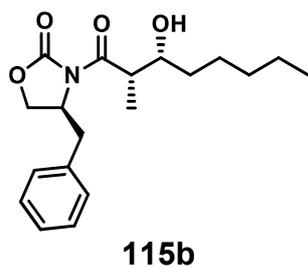
Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[181]</sup>

### 6.12.6 (4*R*,5*R*)-2,2,5-Trimethyl-4-alkyl-1,3-dioxan (117)

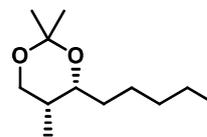


Der Rückstand mit dem Diol **116** wurden in Dimethoxypropan (6.3 mL, 5.3 g, 50.0 mmol je mmol Aldolprodukt **115**) und Aceton (6.3 mL, 4.9 g je mmol Aldolprodukt **115**) gelöst. Molekularsieb (3 Å) und *p*-Toluolsulfonsäure (10 – 20 mol%) wurden zugegeben und die Reaktionslösung für 20 h gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (20 ml je mmol Aldolprodukt **115**) beendet. Die Extraktion erfolgte mit Diethylether (4× 20 ml je mmol Aldolprodukt **115**). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (20 ml je mmol Aldolprodukt **115**) gewaschen. Die organische Phase wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (*n*-Pentan/Diethylether) gereinigt. Im Folgenden sind molekülspezifische Details und die jeweiligen analytischen Daten aufgeführt.

**(4*R*,5*R*)-2,2,5-Trimethyl-4-pentyl-1,3-dioxan (117b)**



**115b**



**117b**

C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>, M = 200.32 g/mol

(4*R*,5*R*)-2,2,5-Trimethyl-4-pentyl-1,3-dioxan (**117b**) wurde als farbloses Öl isoliert (129 mg, 0.64 mmol, 21% über zwei Stufen).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 0.89 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.05 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 1.19-1.36 (m, 8H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>), 1.43 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>), 1.44-1.50 (m, *J* = 8.0 Hz, 1H, CHCH<sub>3</sub>), 3.58 (dd, *J* = 11.4, 1.7 Hz, 1H, OCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>), 3.87-3.93 (m, 1H, OCH), 4.10 (dd, *J* = 11.5, 2.9 Hz, 1H, OCH<sub>a</sub>H<sub>b</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ [ppm] = 10.6 (+, CHCH<sub>3</sub>), 14.2 (+, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 19.2 (+, CH<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>), 22.8 (-, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 25.0 (-, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29.9 (+, CH<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>), 31.7 (+, CHCH<sub>3</sub>), 32.0 (-, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 33.0 (-, CH<sub>2</sub>CHO), 67.2 (-, CH<sub>2</sub>O), 71.2 (+, CHO), 98.6 (C<sub>q</sub>, CH<sub>3</sub>CCH<sub>3</sub>).

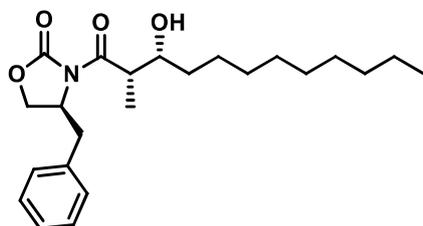
**R<sub>f</sub>-Wert:** (P/OEt<sub>2</sub>).

**Drehwert:** [α]<sub>D</sub><sup>21</sup> = -6.2 (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

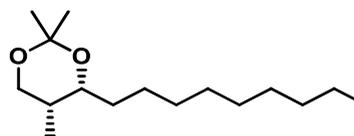
**HRMS (APCI+):** m/z [M+H]<sup>+</sup> 201.1851 (berechnet 201.1849).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.<sup>[182]</sup>

**(4*R*,5*R*)-2,2,5-Trimethyl-4-nonyl-1,3-dioxan (117c)**



**115c**



**117c**

C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>, M = 256.43 g/mol

(4*R*,5*R*)-2,2,5-Trimethyl-4-nonyl-1,3-dioxan (**117c**) wurde als farbloses Öl erhalten (36 mg, 0.14 mmol, 29% über zwei Stufen).

**$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 0.88 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.05 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H,  $\text{CHCH}_3$ ), 1.18–1.36 (m, 16H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 1.39 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CCH}_3$ ), 1.43 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{CCH}_3$ ), 1.44–1.49 (m, 1H,  $\text{CHCH}_3$ ), 3.58 (dd,  $J = 11.5, 1.7$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_a\text{H}_b$ ), 3.87–3.93 (m, 1H,  $\text{OCH}$ ), 4.10 (dd,  $J = 11.5, 2.9$  Hz, 1H,  $\text{OCH}_a\text{H}_b$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR** (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 10.6 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 14.3 (+,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 19.2 (+,  $\text{CH}_3\text{CCH}_3$ ), 22.8 (–,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 25.4 (–,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 29.5 (–,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 29.7 (–,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 29.7 (–,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 29.8 (–,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 29.9 (+,  $\text{CH}_3\text{CCH}_3$ ), 31.7 (+,  $\text{CHCH}_3$ ), 32.0 (–,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 33.0 (–,  $\text{CH}_2\text{CHO}$ ), 67.2 (–,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 71.7 (+,  $\text{CHO}$ ), 98.6 ( $\text{C}_q$ ,  $\text{CH}_3\text{CCH}_3$ ).

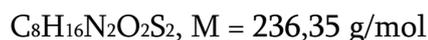
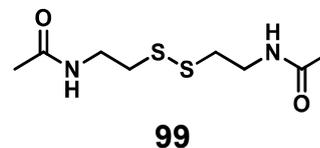
**Re-Wert:** (P/OEt<sub>2</sub>).

**Drehwert:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = -1.5$  ( $c = 1.0$ ,  $\text{CHCl}_3$ ).

**HRMS (APCI+):**  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  257.2477 (berechnet 257.2475).

## 6.13 Identifizierte Nebenprodukte

### 6.13.1 *N,N'*-(Disulfididylbis(ethan-2,1-diyl))diacetamid (**99**)



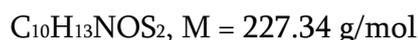
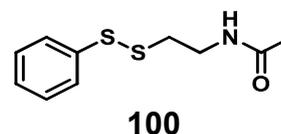
Das Dimer **99** des HSNAC (**58**) wird bei der Synthese von HSNAC **58** und bei den meisten darauf aufbauenden Synthesen gefunden.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 2.02 (s, 6H,  $CH_3CO$ ), 2.83 (t,  $J = 6.4$  Hz, 4H,  $SCH_2$ ), 3.57 (dt,  $J = 6.3$  Hz, 4H,  $NCH_2$ ), 6.42 (bs, 2H,  $NH$ ).

$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 23.4 (+,  $CH_3CO$ ), 37.9 (–,  $SCH_2$ ), 38.7 (–,  $NCH_2$ ), 170.9 ( $C_q$ ,  $CH_3CO$ ).

HRMS (ESI+):  $m/z$   $[M+H]^+$  237.0722 (berechnet 237.0726).

### 6.13.2 *N*-(2-(Phenyldisulfid)ethyl)acetamid (**100**)



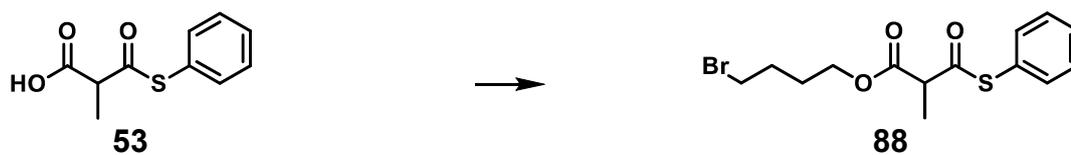
Das gemischte Dimer **100** aus Thiophenol und HSNAC (**58**) ist nach der Transesterifizierung von Thiophenol-Estern zu SNAC-Estern nachweisbar. Es liegt kein isoliertes Spektrum des Disulfids **100** vor.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.91 (s, 3H,  $CH_3CO$ ), 2.86 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $SCH_2$ ), 3.53 (dt,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 5.92 (bs, 1H,  $NH$ ), 7.23-7.27 (m, 1H,  $Ar_p-H$ ), 7.31-7.36 (m, 2H,  $Ar_o-H$ ), 7.52-7.56 (m, 2H,  $Ar_m-H$ ).

$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 23.3 (+,  $CH_3CO$ ), 37.9 (–,  $SCH_2$ ), 38.0 (–,  $NCH_2$ ), 127.5 ( $C_q$ ,  $C-Ar_p$ ), 128.3 ( $C-Ar_m$ ), 129.3 ( $C-Ar_o$ ), 137.1 ( $C_q$ ,  $C-Ar_1$ ), 170.4 ( $C_q$ ,  $CH_3CO$ ).

HRMS (ESI+):  $m/z$   $[M+H]^+$  228.0512 (berechnet 228.0511).

## 6.13.3 (4-Bromobutyl)-2-methyl-3-oxo-3-(thiophenyl)propionat (88)



$C_{14}H_{17}BrO_3S$ ,  $M = 345.25$  g/mol

Die bromierte Methylmalonyl-Spezies **88**, Nebenprodukt der in Tetrahydrofuran decarboxylativen durchgeführten CLAISEN-Kondensation, wurde mittels Säulenchromatographie (H/EE 19:1) als farbloses Öl isoliert.

$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 1.51 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H,  $CH_3$ ), 1.80-1.89 (m, 2H,  $OCH_2CH_2$ ), 1.92-2.01 (m, 2H,  $BrCH_2CH_2$ ), 3.44 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H,  $BrCH_2$ ), 3.76 (q,  $J = 7.2$  Hz, 1H,  $CH$ ), 4.13-4.28 (m, 2H,  $OCH_2$ ), 7.43 (s, 5H, Ar- $H$ ).

$^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  [ppm] = 14.3 (+,  $CH_3$ ), 27.3 (-,  $BrCH_2CH_2$ ), 29.3 (-,  $OCH_2CH_2$ ), 33.2 (-,  $BrCH_2$ ), 53.8 (+,  $CH$ ), 64.8 (-,  $OCH_2$ ), 126.9 ( $C_q$ ,  $C-Ar_1$ ), 129.5 (+,  $C-Ar_m$ ), 129.9 (+,  $C-Ar_p$ ), 134.6 (+,  $C-Ar_o$ ), 169.3 ( $C_q$ ,  $COO$ ), 194.2 ( $C_q$ ,  $COS$ ).

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.10 (H/EE 19:1).

**HRMS (ESI+):**  $m/z$   $[M+H]^+$  345.0156 (berechnet 345.0155).



## 7. Literaturverzeichnis

- [1] A. Kitsche, M. Kalesse, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 851–861, DOI 10.1002/cbic.201300063.
- [2] J. Brecher, *Pure Appl. Chem.* **2006**, *78*, 1897–1970, DOI 10.1351/pac200678101897.
- [3] W. Schwemmler, *Mechanismen Der Zellevolution: Grundriss Einer Modernen Zelltheorie*, Walter De Gruyter GmbH, **1979**.
- [4] B. H. Patel, C. Percivalle, D. J. Ritson, C. D. Duffy, J. D. Sutherland, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 301–307, DOI 10.1038/nchem.2202.
- [5] P. Ulmschneider, in *Vom Urknall Zum Mod. Menschen*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2014**, pp. 123–144.
- [6] J. Cortes, S. F. Haydock, G. A. Roberts, D. J. Bevitt, P. F. Leadlay, *Nature* **1990**, *348*, 176–178, DOI 10.1038/348176a0.
- [7] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380–416, DOI 10.1039/a909079g.
- [8] K. J. Weissman, P. F. Leadlay, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 925–936, DOI 10.1038/nrmicro1287.
- [9] L. Katz, R. H. Baltz, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *43*, 155–176, DOI 10.1007/s10295-015-1723-5.
- [10] J. A. Robinson, *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* **1991**, *332*, 107–114, DOI 10.1098/rstb.1991.0038.
- [11] B. Silakowski, G. Nordsiek, B. Kunze, H. Blöcker, R. Müller, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 59–69, DOI 10.1016/S1074-5521(00)00056-9.
- [12] J. F. Aparicio, A. J. Colina, E. Ceballos, J. F. Martín, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 10133–10139, DOI 10.1074/jbc.274.15.10133.
- [13] H. Komaki, M. Izumikawa, J. Ueda, T. Nakashima, S. T. Khan, M. Takagi, K. Shin-ya, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *83*, 127–133, DOI 10.1007/s00253-008-1849-8.
- [14] C. Waldron, K. Madduri, K. Crawford, D. J. Merlo, P. Treadway, M. C. Broughton, R. H. Baltz, *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **2000**, *78*, 385–390, DOI 10.1023/A:1010289901631.

- 
- [15] S. Smith, S.-C. Tsai, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1041, DOI 10.1039/b603600g.
- [16] C. Hertweck, A. Luzhetskyy, Y. Rebets, A. Bechthold, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 162–190, DOI 10.1039/B507395M.
- [17] M. B. Austin, J. P. Noel, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 79–110, DOI 10.1039/b100917f.
- [18] A. Kirschning, F. Hahn, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51*, 4012–4022, DOI 10.1002/anie.201107386.
- [19] S. Friedrich, F. Hahn, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1473–1508, DOI 10.1016/j.tet.2014.12.026.
- [20] S. Dutta, J. R. Whicher, D. A. Hansen, W. A. Hale, J. A. Chemler, G. R. Congdon, A. R. H. Narayan, K. Håkansson, D. H. Sherman, J. L. Smith, et al., *Nature* **2014**, *510*, 512–517, DOI 10.1038/nature13423.
- [21] B. Julien, Z.-Q. Q. Tian, R. Reid, C. D. Reeves, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1277–1286, DOI 10.1016/j.chembiol.2006.10.004.
- [22] D. E. Cane, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 27517–27523, DOI 10.1074/jbc.R110.144618.
- [23] C. Olano, C. Méndez, J. A. Salas, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 571, DOI 10.1039/b911956f.
- [24] D. C. Gay, D. T. Wagner, J. L. Meinke, C. E. Zogzas, G. R. Gay, A. T. Keatinge-Clay, *J. Struct. Biol.* **2016**, *193*, 196–205, DOI 10.1016/j.jsb.2015.12.011.
- [25] Y. Cheng, J. M. Coughlin, S. Lim, B. Shen, **2009**, pp. 165–186.
- [26] E. Cundliffe, N. Bate, A. Butler, S. Fish, A. Gandeche, L. Merson-Davies, *Antonie Van Leeuwenhoek* **2001**, *79*, 229–34, DOI 10.1023/a:1012065300116.
- [27] C. Bihlmaier, E. Welle, C. Hofmann, K. Welzel, A. Vente, E. Breitling, M. Müller, S. Glaser, A. Bechthold, M. Müller, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 2113–2121, DOI 10.1128/AAC.00007-06.
- [28] J. Ligon, S. Hill, J. Beck, R. Zirkle, I. Molnár, J. Zawodny, S. Money, T. Schupp, *Gene* **2002**, *285*, 257–267, DOI 10.1016/S0378-1119(02)00396-7.
- [29] C. Olano, B. Wilkinson, C. Sánchez, S. J. Moss, R. Sheridan, V. Math, A. J. Weston, A. F. Braña, C. J. Martin, M. Oliynyk, et al., *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 87–97, DOI 10.1016/j.chembiol.2003.12.018.
- [30] P. Caffrey, S. Lynch, E. Flood, S. Finnan, M. Oliynyk, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 713–723,

- DOI 10.1016/S1074-5521(01)00046-1.
- [31] S. F. Haydock, *Microbiology* **2005**, *151*, 3161–3169, DOI 10.1099/mic.0.28194-0.
- [32] G. F. Liou, J. Lau, D. E. Cane, C. Khosla, *Biochemistry* **2003**, *42*, 200–207, DOI 10.1021/bi0268100.
- [33] B. J. Dunn, C. Khosla, *J. R. Soc. Interface* **2013**, *10*, 20130297, DOI 10.1098/rsif.2013.0297.
- [34] T. Robbins, J. Kapilivsky, D. E. Cane, C. Khosla, *Biochemistry* **2016**, *55*, 4476–4484, DOI 10.1021/acs.biochem.6b00639.
- [35] K. J. Weissman, *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 348–371, DOI 10.3762/bjoc.13.39.
- [36] S. Friedrich, F. Hemmerling, F. Lindner, A. Warnke, J. Wunderlich, G. Berkhan, F. Hahn, *Molecules* **2016**, *21*, 1443, DOI 10.3390/molecules21111443.
- [37] D. K. Liscombe, G. V. Louie, J. P. Noel, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1238, DOI 10.1039/c2np20029e.
- [38] G. Berkhan, F. Hahn, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53*, 14240–14244, DOI 10.1002/anie.201407979.
- [39] F. Taft, M. Brünjes, T. Knobloch, H. G. Floss, A. Kirschning, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3812–3813, DOI 10.1021/ja8088923.
- [40] T. A. M. Gulder, M. F. Freeman, J. Piel, **2011**, DOI 10.1007/128\_2010\_113.
- [41] A. T. Keatinge-Clay, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1050, DOI 10.1039/c2np20019h.
- [42] I. Hanukoglu, *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2015**, *43*, 206–209, DOI 10.1002/bmb.20849.
- [43] R. Reid, M. Piagentini, E. Rodriguez, G. Ashley, N. Viswanathan, J. Carney, D. V. Santi, C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Biochemistry* **2003**, *42*, 72–79, DOI 10.1021/bi0268706.
- [44] M. G. Rossmann, D. Moras, K. W. Olsen, *Nature* **1974**, *250*, 194–199, DOI 10.1038/250194a0.
- [45] J. Zheng, A. T. Keatinge-Clay, *Med. Chem. Commun.* **2013**, *4*, 34–40, DOI 10.1039/C2MD20191G.
- [46] C. Liu, M. Yuan, X. Xu, L. Wang, A. T. Keatinge-Clay, Z. Deng, S. Lin, J. Zheng, *J. Struct. Biol.* **2018**, *203*, 135–141, DOI 10.1016/j.jsb.2018.04.001.
- [47] S. A. Bonnett, J. R. Whicher, K. Papireddy, G. Florova, J. L. Smith, K. A. Reynolds,

- 
- Chem. Biol.* **2013**, *20*, 772–783, DOI 10.1016/j.chembiol.2013.04.014.
- [48] P. Caffrey, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 654–657, DOI 10.1002/cbic.200300581.
- [49] A. T. Keatinge-Clay, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 898–908, DOI 10.1016/j.chembiol.2007.07.009.
- [50] X. Xie, A. Garg, A. T. Keatinge-Clay, C. Khosla, D. E. Cane, *Biochemistry* **2016**, *55*, 1179–1186, DOI 10.1021/acs.biochem.6b00024.
- [51] A. Garg, C. Khosla, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16324–16327, DOI 10.1021/ja408944s.
- [52] Y. O. You, C. Khosla, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7406–7409, DOI 10.1021/ja4014776.
- [53] X. Xie, A. Garg, C. Khosla, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, jacs.7b00278, DOI 10.1021/jacs.7b00278.
- [54] A. Garg, X. Xie, A. Keatinge-Clay, C. Khosla, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 10190–10193, DOI 10.1021/ja5056998.
- [55] J. Zheng, A. T. Keatinge-Clay, *J. Mol. Biol.* **2011**, *410*, 105–117, DOI 10.1016/j.jmb.2011.04.065.
- [56] S. F. Haydock, T. Mironenko, H. I. Ghoorahoo, P. F. Leadlay, *J. Biotechnol.* **2004**, *113*, 55–68, DOI 10.1016/j.jbiotec.2004.03.022.
- [57] S. K. Piasecki, C. A. Taylor, J. F. Detelich, J. Liu, J. Zheng, A. Komsoukaniants, D. R. Siegel, A. T. Keatinge-Clay, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 1331–1340, DOI 10.1016/j.chembiol.2011.07.021.
- [58] M. Häckh, M. Müller, S. Lüdeke, *Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19*, 8922–8928, DOI 10.1002/chem.201300554.
- [59] S. Bali, H. M. O'Hare, K. J. Weissman, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 478–484, DOI 10.1002/cbic.200500430.
- [60] S. Bali, K. J. Weissman, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1935–1942, DOI 10.1002/cbic.200600285.
- [61] J. Zheng, C. A. Taylor, S. K. Piasecki, A. T. Keatinge-Clay, *Structure* **2010**, *18*, 913–922, DOI 10.1016/j.str.2010.04.015.
- [62] C. B. Bailey, M. E. Pasman, A. T. Keatinge-Clay, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 792–795,

- DOI 10.1039/C5CC07315D.
- [63] D. H. Kwan, M. Tosin, N. Schläger, F. Schulz, P. F. Leadlay, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2053–2056, DOI 10.1039/c1ob00022e.
- [64] S. Vance, O. Tkachenko, B. Thomas, M. Bassuni, H. Hong, D. Nietlispach, B. Broadhurst, *Biochem. J.* **2016**, *0*, BCJ20160041, DOI 10.1042/BCJ20160041.
- [65] H. M. O'Hare, A. Baerga-Ortiz, B. Popovic, J. B. Spencer, P. F. Leadlay, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 287–296, DOI 10.1016/j.chembiol.2006.01.003.
- [66] Z. Zhang, A. J. Cepeda, M. L. Robles, M. Hirsch, K. Kumru, J. A. Zhou, A. T. Keatinge-Clay, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 157–160, DOI 10.1039/C9CC07966A.
- [67] A. Grisin, P. A. Evans, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 6407–6412, DOI 10.1039/C5SC00814J.
- [68] D. S. Palacios, I. Dailey, D. M. Siebert, B. C. Wilcock, M. D. Burke, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 6733–6738, DOI 10.1073/pnas.1015023108.
- [69] A. Bredenkamp, M. Wegener, S. Hummel, A. P. Häring, S. F. Kirsch, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 1875–1878, DOI 10.1039/C5CC09328G.
- [70] A. M. P. Koskinen, K. Karisalmi, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 677, DOI 10.1039/b417466f.
- [71] M. Nakata, T. Ishiyama, S. Akamatsu, Y. Hirose, H. Maruoka, R. Suzuki, K. Tatsuta, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1995**, *68*, 967–989, DOI 10.1246/bcsj.68.967.
- [72] S. P. Gunasekera, M. Gunasekera, R. E. Longley, G. K. Schulte, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4912–4915, DOI 10.1021/jo00303a029.
- [73] J. Qi, A. R. Blanden, S. Bane, D. G. I. Kingston, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5247–5254, DOI 10.1016/j.bmc.2011.06.082.
- [74] J. a Gil, a B. Campelo-Diez, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *60*, 633–642, DOI 10.1007/s00253-002-1163-9.
- [75] X. Lei, L. Kong, C. Zhang, Q. Liu, F. Yao, W. Zhang, Z. Deng, D. You, *Mol. Biosyst.* **2013**, *9*, 422–30, DOI 10.1039/c2mb25464f.
- [76] L. Tang, H. Fu, R. McDaniel, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 77–84, DOI 10.1016/S1074-5521(00)00073-9.
- [77] S. Shah, Q. Xue, L. Tang, J. R. Carney, M. Betlach, R. Mcdaniel, *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2000**, *53*, 502–508, DOI 10.7164/antibiotics.53.502.

- 
- [78] Y. Xue, L. Zhao, H. -w. Liu, D. H. Sherman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 12111–12116, DOI 10.1073/pnas.95.21.12111.
- [79] J. D. Kittendorf, D. H. Sherman, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2137–2146, DOI 10.1016/j.bmc.2008.10.082.
- [80] S. J. Kakavas, L. Katz, D. Stassi, *Microbiology* **1997**, *179*, 7515–7522.
- [81] O. Perlova, K. Gerth, O. Kaiser, A. Hans, R. Müller, *J. Biotechnol.* **2006**, *121*, 174–191, DOI 10.1016/j.jbiotec.2005.10.011.
- [82] D. Janssen, D. Albert, R. Jansen, R. Müller, M. Kalesse, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46*, 4898–4901, DOI 10.1002/anie.200605198.
- [83] I. Molnár, T. Schupp, M. Ono, R. Zirkle, M. Milnamow, B. Nowak-Thompson, N. Engel, C. Toupet, A. Stratmann, D. Cyr, et al., *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 97–109, DOI 10.1016/S1074-5521(00)00075-2.
- [84] S. R. Park, J. W. Park, W. S. Jung, A. R. Han, Y.-H. Ban, E. J. Kim, J. K. Sohng, S. J. Sim, Y. J. Yoon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 109–117, DOI 10.1007/s00253-008-1674-0.
- [85] K. Arakawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, *78*, 183–189, DOI 10.1080/09168451.2014.882761.
- [86] J. Piel, D. Butzke, N. Fusetani, D. Hui, M. Platzer, G. Wen, S. Matsunaga, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 472–479, DOI 10.1021/np049612d.
- [87] K. M. Fisch, C. Gurgui, N. Heycke, S. a. van der Sar, S. a. Anderson, V. L. Webb, S. Taudien, M. Platzer, B. K. Rubio, S. J. Robinson, et al., *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 494–501, DOI 10.1038/nchembio.176.
- [88] K. Wu, L. Chung, W. P. Reville, L. Katz, C. D. Reeves, *Gene* **2000**, *251*, 81–90, DOI 10.1016/S0378-1119(00)00171-2.
- [89] Y. L. Chen, J. Zhao, W. Liu, J. F. Gao, L. M. Tao, H. X. Pan, G. L. Tang, *Gene* **2012**, *509*, 195–200, DOI 10.1016/j.gene.2012.08.030.
- [90] H. Ikeda, T. Nonomiya, M. Usami, T. Ohta, S. Omura, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 9509–9514, DOI 10.1073/pnas.96.17.9509.
- [91] A. Stratmann, C. Toupet, W. Schilling, R. Traber, L. Oberer, T. Schupp, *Microbiology* **1999**, *145*, 3365–3375, DOI 10.1099/00221287-145-12-3365.

- [92] T. P. Stinear, A. Mve-Obiang, P. L. C. Small, W. Frigui, M. J. Pryor, R. Brosch, G. A. Jenkin, P. D. R. Johnson, J. K. Davies, R. E. Lee, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 1345–9, DOI 10.1073/pnas.0305877101.
- [93] *PKS/NRPS Analysis Website*, [Http://Nrps.Igs.Umaryland.Edu/](http://Nrps.Igs.Umaryland.Edu/), **2015**.
- [94] *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, [Https://Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov), **2015**.
- [95] *NCBI: Search for Conserved Domains*, [Https://Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Structure/Cdd/Wrpsb.Cgi](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/wrpsb.cgi), **2015**.
- [96] B. Persson, M. Krook, H. Jornvall, *Eur. J. Biochem.* **1991**, *200*, 537–543, DOI 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16215.x.
- [97] M. Oliynyk, M. Samborsky, J. B. Lester, T. Mironenko, N. Scott, S. Dickens, S. F. Haydock, P. F. Leadlay, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 447–453, DOI 10.1038/nbt1297.
- [98] T. P. Stinear, A. Mve-Obiang, P. L. C. Small, W. Frigui, M. J. Pryor, R. Brosch, G. A. Jenkin, P. D. R. Johnson, J. K. Davies, R. E. Lee, et al., *PNAS* **2004**, *96*, 1645–1650, DOI 10.1073/pnas.96.4.1645.
- [99] P. R. August, L. Tang, Y. J. Yoon, S. Ning, R. Müller, T.-W. Yu, M. Taylor, D. Hoffmann, C.-G. Kim, X. Zhang, et al., *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 69–79, DOI 10.1016/S1074-5521(98)90141-7.
- [100] P. Johnson, S. F. Haydock, J. K. Davies, P. F. Leadlay, P. L. C. Small, *The Mycolactone Locus: An Assembly Line for Producing Novel Polyketides with Therapeutic and Prophylactic Uses*, [Https://Www.Ncbi.Nlm.Nih.Gov/Nucore/DJ057550.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/DJ057550.1), **2007**.
- [101] F. Hemmerling, *Mündliche, Persönliche Koorespondenz*, Arbeitskreis Dr. F. Hahn, Institut Der Organischen Chemie, Universität Hannover, **2014**.
- [102] *Clustal Omega*, [Https://Www.Ebi.Ac.Uk/Tools/Msa/Clustalo/](https://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalo/), **2015**.
- [103] H. McWilliam, W. Li, M. Uludag, S. Squizzato, Y. M. Park, N. Buso, A. P. Cowley, R. Lopez, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, W597–W600, DOI 10.1093/nar/gkt376.
- [104] *Phyre<sup>2</sup>*, [Http://Www.Sbg.Bio.Ic.Ac.Uk/Phyre2/Html/Page.Cgi?Id=index](http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/Phyre2/html/page.cgi?id=index), **2015**.
- [105] T. Ensfelder, *Masterarbeit, Untersuchung Rekombinanter Ketoreduktase-Domänen Bezüglich Ihrer Substratspezifität Und Ihrer Stereoselektivität*, Arbeitskreis Dr. F. Hahn, Institut Der Organischen Chemie, Universität Hannover, **2015**.

- 
- [106] D. A. Di Fonzo, *Mündliche, Persönliche Korrespondenz: Die Höhe Eines Aussagekräftigen Protein Scores Ist System- Und Programabhängig*, Arbeitskreis Prof. Dr. Clemens Steegborn, Biochemie, Universität Bayreuth, Bayreuth, **2018**.
- [107] H. Geise, *Masterarbeit, Biokatalytische Studien Zur Bildung von Konservierten Strukturmotiven Bei Typ I Polyketiden*, Arbeitskreis Dr. F. Hahn, Institut Der Organischen Chemie, Universität Hannover, **2014**.
- [108] G. Zhou, D. Lim, D. M. Coltart, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3809–3812, DOI 10.1021/ol801498u.
- [109] D. W. Brooks, L. D.-L. Lu, S. Masamune, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1979**, *18*, 72–74, DOI 10.1002/anie.197900722.
- [110] T. Roß, *Masterarbeit, Synthese von Beta-Ketothioestern Zur Untersuchung von Ketoreduktasen Und Chemoenzymatische Synthese von Pironetin*, Arbeitskreis Prof. Dr. F. Hahn, Organische Chemie (Lebensmittelchemie), Universität Bayreuth, **2019**.
- [111] K. C. Fortner, M. D. Shair, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1032–1033, DOI 10.1021/ja0673682.
- [112] D. Magdziak, G. Lalic, H. M. Lee, K. C. Fortner, A. D. Aloise, M. D. Shair, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7284–7285, DOI 10.1021/ja051759j.
- [113] D. A. Hansen, C. M. Rath, E. B. Eisman, A. R. H. H. Narayan, J. D. Kittendorf, J. D. Mortison, Y. J. Yoon, D. H. Sherman, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11232–11238, DOI 10.1021/ja404134f.
- [114] C. D. Donner, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1258–1261, DOI 10.1021/ol4001894.
- [115] S. S. Chaudhari, K. G. Akamanchi, *Synlett* **1999**, *1999*, 1763–1765, DOI 10.1055/s-1999-2943.
- [116] M. Kretschmer, D. Menche, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 382–385, DOI 10.1021/ol203130b.
- [117] K. Horita, S. Nagato, Y. Oikawa, O. Yonemitsu, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 1705–1716, DOI 10.1248/cpb.37.1705.
- [118] H. Motoyoshi, M. Horigome, H. Watanabe, T. Kitahara, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 1378–1389, DOI 10.1016/j.tet.2005.11.031.
- [119] M. Zhao, J. Li, Z. Song, R. Desmond, D. M. Tschaen, E. J. J. Grabowski, P. J. Reider, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5323–5326, DOI 10.1016/S0040-4039(98)00987-3.

- [120] G. S. Bates, M. A. Varelas, *Can. J. Chem.* **1980**, *58*, 2562–2566, DOI 10.1139/v80-408.
- [121] G. Jürjens, S. M. M. Schuler, M. Kurz, S. Petit, C. Couturier, F. Jeannot, F. Nguyen, R. C. Wende, P. E. Hammann, D. N. Wilson, et al., *Angew. Chemie Int. Ed.* **2018**, *57*, 12157–12161, DOI 10.1002/anie.201805901.
- [122] *Organikum Organisch-Chemisches Grundpraktikum*, Wiley-VCH, Weinheim, **2015**.
- [123] B. R. Rohrs, *Nitroxy Derivatives of Soft Steroids*, **2012**, WO2013133980.
- [124] J. L. Burdett, M. T. Rogers, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 2105–2109, DOI 10.1021/ja01065a003.
- [125] F. Hahn, N. Kandziora, S. Friedrich, P. F. Leadlay, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 634–640, DOI 10.3762/bjoc.10.55.
- [126] N. Matsumori, D. Kaneno, M. Murata, H. Nakamura, K. Tachibana, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 866–876, DOI 10.1021/jo981810k.
- [127] O. Ad, B. W. Thuronyi, M. C. Y. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114*, E660–E668, DOI 10.1073/pnas.1614196114.
- [128] E. Liddle, A. Scott, L.-C. Han, D. Ivison, T. J. Simpson, C. L. Willis, R. J. Cox, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 1727–1730, DOI 10.1039/C6CC10172K.
- [129] R. A. Cacho, J. Thuss, W. Xu, R. Sanichar, Z. Gao, A. Nguyen, J. C. Vederas, Y. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15688–15691, DOI 10.1021/jacs.5b11814.
- [130] C. J. B. Harvey, J. D. Puglisi, V. S. Pande, D. E. Cane, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12259–12265, DOI 10.1021/ja304682q.
- [131] G. Bifulco, P. Dambruoso, L. Gomez-Paloma, R. Riccio, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3744–3779, DOI 10.1021/cr030733c.
- [132] P. J. Stephens, F. J. Devlin, J.-J. Pan, *Chirality* **2008**, *20*, 643–663, DOI 10.1002/chir.20477.
- [133] C. Merten, *E-Mail Koorepondenz Mit Prof. Dr. F. Hahn*, Arbeitskreis Prof. Dr. C. Merten, Organische Chemie II, Ruhr Universität Bochum, **2018**.
- [134] P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski, M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 11623–11627, DOI 10.1021/j100096a001.
- [135] J. L. Kulp, J. C. Owrutsky, D. Y. Petrovykh, K. P. Fears, R. Lombardi, L. A. Nafie, T. D. Clark, *Biointerphases* **2011**, *6*, 1–7, DOI 10.1116/1.3548075.

- 
- [136] *VCD-Spektroskopie*, Arbeitskreis Prof. Dr. C. Merten, Organische Chemie II, Ruhr Universität Bochum, **2017**.
- [137] R. A. Nyquist, W. J. Potts, *Spectrochim. Acta* **1959**, *15*, 514–538, DOI 10.1016/S0371-1951(59)80348-9.
- [138] F. Freire, J. M. Seco, E. Quiñoá, R. Riguera, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 208–211, DOI 10.1021/ol9021639.
- [139] J. M. Seco, L.-H. Tseng, M. Godejohann, E. Quiñoá, R. Riguera, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 2149–2153, DOI 10.1016/S0957-4166(02)00510-4.
- [140] T. J. Wenzel, *Tetrahedron: Asymmetry* **2017**, *28*, 1212–1219, DOI 10.1016/j.tetasy.2017.09.009.
- [141] T. Roß, *Mündliche, Persönliche Koorespondenz*, Arbeitskreis Prof. Dr. F. Hahn, Organische Chemie (Lebensmittelchemie), Universität Bayreuth, **2019**.
- [142] M. Schröder, T. Roß, *Unveröffentlichte Ergebnisse*, Arbeitskreis Prof. Dr. F. Hahn, Organische Chemie (Lebensmittelchemie), Universität Bayreuth, **2020**.
- [143] J. De Ruyck, M. Famerée, J. Wouters, E. A. Perpète, J. Preat, D. Jacquemin, *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *450*, 119–122, DOI 10.1016/J.CPLETT.2007.10.092.
- [144] D. C. Elliott, W. H. Elliott, K. M. Jones, R. M. C. Dawson, *Data for Biochemical Research (3rd Edition)*, Oxford University Press, **1986**.
- [145] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry (5th Ed.), The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes*, Bookshelf ID: NBK22430, W. H. Freeman And Company, New York, **2002**.
- [146] M. A. Pearson, I.-S. Park, R. A. Schaller, L. O. Michel, P. A. Karplus, R. P. Hausinger, *Biochemistry* **2000**, *39*, 8575–8584, DOI 10.1021/bi000613o.
- [147] A. P. Siskos, A. Baerga-Ortiz, S. Bali, V. Stein, H. Mamdani, D. Spitteller, B. Popovic, J. B. Spencer, J. Staunton, K. J. Weissman, et al., *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1145–1153, DOI 10.1016/j.chembiol.2005.08.017.
- [148] F. Hemmerling, F. Hahn, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 1512–1550, DOI 10.3762/bjoc.12.148.
- [149] T. Schwecke, J. F. Aparicio, I. Molnar, A. König, L. E. Khaw, S. F. Haydock, M. Oliynyk, P. Caffrey, J. Cortes, J. B. Lester, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 7839–7843,

- DOI 10.1073/pnas.92.17.7839.
- [150] M. L. Mugnai, Y. Shi, A. T. Keatinge-Clay, R. Elber, *Biochemistry* **2015**, *54*, 2346–2359, DOI 10.1021/bi501401g.
- [151] J. Haas, M. Häckh, V. Justus, M. Müller, S. Lüdeke, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 10256–10264, DOI 10.1039/C7OB02666H.
- [152] J. Wunderlich, T. Roß, M. Schröder, F. Hahn, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 4955–4959, DOI 10.1021/acs.orglett.0c01348.
- [153] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, A. Bairoch, “Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server,” can be found under <https://web.expasy.org/protparam/>, **2016**.
- [154] J. M. Walker, *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, Totowa, NJ, **2005**.
- [155] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680–685, DOI 10.1038/227680a0.
- [156] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176–2179, DOI 10.1021/om100106e.
- [157] A. N. Kost, L. N. Khaimov, Y. Dzhurakulov, K. K. Khaidarov, L. D. Lebedeva, A. L. Kotov, *Chem. Heterocycl. Compd.* **1975**, *11*, 1263–1266, DOI 10.1007/BF00474450.
- [158] V. A. Nikolaev, V. V. Shevchenko, M. S. Platz, N. N. Khimich, *Russ. J. Org. Chem.* **2006**, *42*, 815–827, DOI 10.1134/S1070428006060029.
- [159] R. Akué-Gédu, H. El-Hafidi, B. Rigo, D. Couturier, *J. Heterocycl. Chem.* **2006**, *43*, 365–369, DOI 10.1002/jhet.5570430217.
- [160] H.-W. Kim, Y.-S. Lee, D. Shetty, H.-J. Lee, D.-S. Lee, J.-K. Chung, M.-C. Lee, K.-H. Chung, J.-M. Jeong, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, *31*, 3434–3436, DOI 10.5012/bkcs.2010.31.11.3434.
- [161] F. Arikan, J. Li, D. Menche, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3521–3524, DOI 10.1021/ol801292t.
- [162] C. Herb, M. E. Maier, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8129–8135, DOI 10.1021/jo035054g.
- [163] C. Vaxelaire, F. Souquet, M.-I. Lannou, J. Ardisson, J. Royer, *European J. Org. Chem.* **2009**, *2009*, 3138–3140, DOI 10.1002/ejoc.200900262.
- [164] J. C. Conway, P. Quayle, A. C. Regan, C. J. Urch, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 11910–11923, DOI 10.1016/j.tet.2005.09.055.

- 
- [165] C. A. Olsen, M. Witt, S. H. Hansen, J. W. Jaroszewski, H. Franzyk, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 6046–6055, DOI 10.1016/j.tet.2005.04.027.
- [166] L. Ferrié, L. Boulard, F. Pradaux, S. Bouzbouz, S. Reymond, P. Capdevielle, J. Cossy, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1864–1880, DOI 10.1021/jo701315h.
- [167] S. Sano, Y. Kuroda, K. Saito, Y. Ose, Y. Nagao, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11881–11890, DOI 10.1016/j.tet.2006.09.096.
- [168] S. M. A. Soliman, L. Colombeau, C. Nouvel, J. Babin, J.-L. Six, *Carbohydr. Polym.* **2016**, *136*, 598–608, DOI 10.1016/j.carbpol.2015.09.061.
- [169] M. Shindo, T. Kita, T. Kumagai, K. Matsumoto, K. Shishido, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1062–1063, DOI 10.1021/ja0561082.
- [170] K. Bravo-Rodriguez, A. F. Ismail-Ali, S. Klopries, S. Kushnir, S. Ismail, E. K. Fansa, A. Wittinghofer, F. Schulz, E. Sanchez-Garcia, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1991–1997, DOI 10.1002/cbic.201402206.
- [171] G. Berkhan, *Biosynthetische Bildung Des Ambruticin Ostfragments*, Springer Fachmedien Wiesbaden, Wiesbaden, **2015**.
- [172] K. J. Weissman, M. Bycroft, A. L. Cutter, U. Hanefeld, E. J. Frost, M. C. Timoney, R. Harris, S. Handa, M. Roddis, J. Staunton, et al., *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 743–754, DOI 10.1016/S1074-5521(98)90666-4.
- [173] C. A. M. Cariou, B. M. Kariuki, J. S. Snaith, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3337, DOI 10.1039/b808644c.
- [174] L. N. Pridgen, J. Prol, B. Alexander, L. Gillyard, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3231–3233, DOI 10.1021/jo00274a058.
- [175] A. E. May, P. H. Willoughby, T. R. Hoye, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3292–3294, DOI 10.1021/jo800076f.
- [176] N. Schläger, A. Kirschning, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 7721, DOI 10.1039/c2ob26185e.
- [177] C.-F. Dai, F. Cheng, H.-C. Xu, Y.-P. Ruan, P.-Q. Huang, *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 386–394, DOI 10.1021/cc060166h.
- [178] M. Cheeseman, I. R. Davies, P. Axe, A. L. Johnson, S. D. Bull, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3537, DOI 10.1039/b908600e.

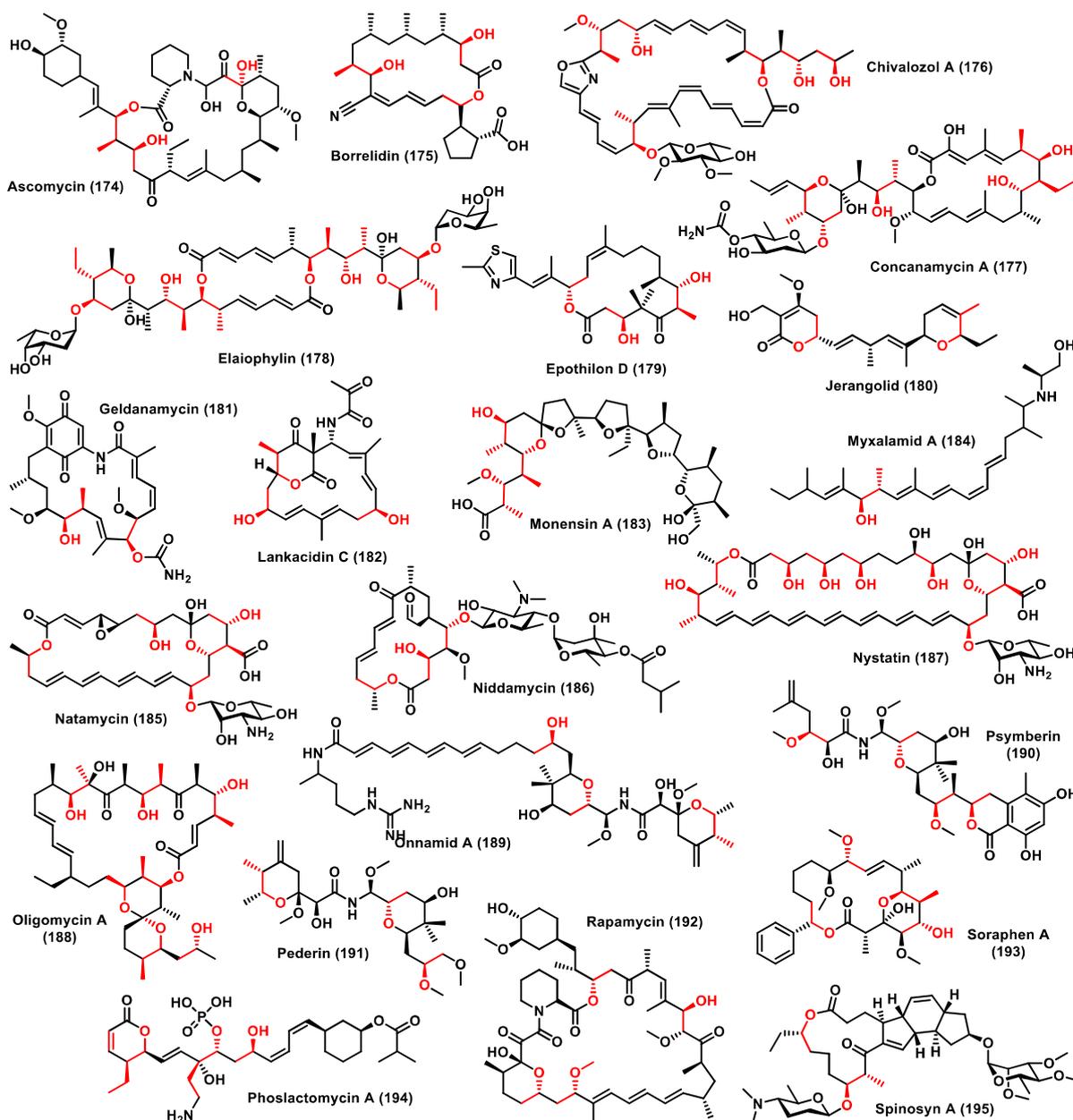
- [179] G. Fronza, C. Fuganti, H.-E. Högberg, G. Pedrocchi-Fantoni, S. Servi, *Chem. Lett.* **1988**, *17*, 385–388, DOI 10.1246/cl.1988.385.
- [180] S. Dandapani, M. Jeske, D. P. Curran, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9447–9462, DOI 10.1021/jo051526a.
- [181] L. Lin, K. Yamamoto, H. Mitsunuma, Y. Kanzaki, S. Matsunaga, M. Kanai, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15418–15421, DOI 10.1021/jacs.5b11192.
- [182] C. C. Chrovian, J. Montgomery, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 537–540, DOI 10.1021/ol063028+.
- [183] A. Rascher, Z. Hu, G. O. Buchanan, R. Reid, C. R. Hutchinson, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 4862–4871, DOI 10.1128/AEM.71.8.4862-4871.2005.
- [184] E. Fjærvik, S. B. Zotchev, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *67*, 436–443, DOI 10.1007/s00253-004-1802-4.



# 8. Anhang

## 8.1 Auswahl der Ketoreduktase-Domänen

### 8.1.1 *In papyro*-Studien



**Abbildung 8-1: Strukturformeln der *in papyro* untersuchten, zuvor nicht gezeigten 22 Polyketid-Naturstoffe.** Mit farbiger Hervorhebung aller Konfigurationsmotive, die durch eine KR-Domäne erzeugt und im vollständig prozessierten Naturstoff erhalten bleiben. Die Strukturformeln der elf anderen Naturstoffe befinden sich in Kapitel 3.1.1, Abbildung 3-1 (S. 17). [10–14,21,28,29,31,56,71,80–90,149,183,184]

**Tabelle 8-1: In *papyro* untersuchte Polyketid-Naturstoffe.**

Naturstoff	A	B	C	D	E
Ambruticin <sup>[21]</sup>	9 (1)	8	4   1	4   0   0	AmbKR1(B2) 2(B1) 6(B0) 9(A0)
Amphotericin B <sup>[30]</sup>	18	18	9   0	3   0   0	AmpKR1(A2) 2(A1) 10(A0) 11(A2) 12(B0) 14(B0) 15(B0) 17(B0) 18(B0)
Ascromycin <sup>[86]</sup>	10	10	7   0	5   1   0	AscKR2(B1) 3(B0) 10(A0)
Avermectin <sup>[90]</sup>	12	10	6   0	5   0   0	AveKR1(B1) 4(B0) 5(A0) 7(B1)
Borrelidin <sup>[29]</sup>	6 (1)	6	3   0	5   0   0	BorKR1(B0) 4(A1) 8(B0)
Candicidin D <sup>[74,75]</sup>	21	17	11   0	3   0   0	CanKR12(A0) 13(A2) 14(B0) 16(B0) 17(B0) 18(B0)
Chivosazol A <sup>[81,82]</sup>	16	15	9   5	5   0   0	ChiKR1(B0) 2(A0) 3(B0) 7(A0) 8(B0) 12(A0) 13(B0)
Concanamycin A <sup>[31]</sup>	13	12	7   0	6   1   0	ConKR2(B1) 3(B0) 5(A2) 10(A2) 11(A2)
Discodermolide <sup>[72,73]**</sup>	11	11	6   0	8   0   0	DisKR3(A1) 7(B1) 9(B0) 10(A2) 11(A1)
Elaiophylin <sup>[56]</sup>	7	7	2   0	3   1   0	ElaKR1(B1) 2(A0) 3(C1) 4(A2) 5(B1)
Epothilon A <sup>[83,84]</sup>	9	8	5   1	4   0   1	EpiKR3(B0) 7(A1) 9(B0)
Erythromycin A <sup>[6,22]</sup>	6	5	1   0	6   0   0	EryKR1(B2) 2(A1) 3(C2) 5(A1) 6(A1)
Geldanamycin <sup>[183]</sup>	7	7	5   0	4   0   0	GelKR3(A1) 5(A0)
Jerangolid <sup>[21]</sup>	7	7	5   0	4   0   0	JerKR1(B2) 6(B0)
Lankacidin C <sup>[85]</sup>	3 (1)	3	1   4	4   0   0	LanKR1(B0) 2(B0) 3(B0)
Monensin A <sup>[10]</sup>	12	10	6   0	7   1   0	MonKR10(A1) 11(A1) 12(A2)
Mycolacton (MLS A) <sup>[60]</sup>	9	9	5   0	5   0   0	MycKRA 5(A0); MycKRB 1(B0) 2(B2)  3*   4*   6*   7*  8(B0)  9*
Mycolacton (MLS B) <sup>[60]</sup>	7	7	5   0	3   0   0	MycKRA 1(A0) 2(A0); MycKRB 1*   2*   3*   4*   6*   7*
Myxalamid <sup>[11]</sup>	8	7	6   0	4   0   0	MyxKR2(A2)
Natamycin <sup>[12,13]</sup>	12	11	7   0	1   0   0	NatKR1(B0) 6(A0) 8(B0) 10(B0)
Niddamycin <sup>[80]</sup>	7	7	3   0	1   1   0	NidKR1(B0) 4(C2) 6(A0) 7(A0)
Nystatin <sup>[184]</sup>	18	17	8   0	3   0   0	NysKR1(A1) 2(A1) 10(A0) 11(B1) 12(B0) 14(A0) 15(A0) 17(A0) 18(A0)
Oleandomycin <sup>[76,77]</sup>	6	6	1   0	6   0   0	OleKR1(B2) 2(A1) 3(C2) 5(A1) 6(A1)
Oligomycin A <sup>[71]**</sup>	16	16	5   0	9   1   0	OliKR1(B0) 2(A1) 4(C1) 5(A2) 6(B0) 11(A2) 12(C1) 13(A1) 14(C1) 15(A1)
Onnamid A <sup>[86]</sup>	14	11	8   2	2   0   1	OnnKR1(B0) 5(B0) 8(A0)
Pederin <sup>[86]</sup>	8	6	3   2	2   0   1	PedKR1(B0) 5(B0) 8(A0)
Phoslactomycin <sup>[89]</sup>	7	7	3   0	0   2   0	PlmKR3(A0) 4(B1) 6(A1) 7(A0)
Pikromycin <sup>[78,79]</sup>	6	5	2   0	5   0   0	PikKR1(B2) 3(C2) 5(A1)
Psymberin <sup>[87]</sup>	11	6	1   3	3   0   1	PsyKR2(A0) 4(B0) 5(B0) 7(A0) 8(A0)
Rapamycin <sup>[149]</sup>	14	13	8   0	7   0   0	RapKR2(B0) 3(C2) 5(B0) 11(B0) 12(B0)
Rifamycin B <sup>[91]</sup>	10	10	5   0	8   0   0	RifKR5(A1) 6(B2) 7(A2) 8(B1) 10(A2)
Soraphen A <sup>[28]</sup>	8	7	3   0	3   0   0	SorKR1(A0) 4(B0) 6(A1) 7(B0)
Spinosyn A <sup>[14]</sup>	10	10	8   0	1   0   0	SpnKR1(A0) 3(A1)
Tylosin <sup>[26]</sup>	7	7	4   0	4   1   0	TylKR1(B1) 6(A1) 7(B0)

A) Modulanzahl (iterativ); B) Modulanzahl mit KR-Domäne; C) Modulanzahl mit weiterführender reduktiver Schleife | mit Methyltransferase-Domäne; D) Modulprodukte mit  $\alpha$ -Methylverzweigung |  $\alpha$ -Ethylverzweigung | doppelte  $\alpha$ -Methylierung; E) KR-Domänen mit bekannter Produktkonfiguration (KR-Typ). \* Die zuvor genannte KR ist auch im Modul (Ziffer) enthalten, aber die Konfiguration bleibt nicht erhalten. \*\* keine Sequenzdaten des Clusters vorhanden, Stand 2019.

8.1.2 *In silico*-Studien

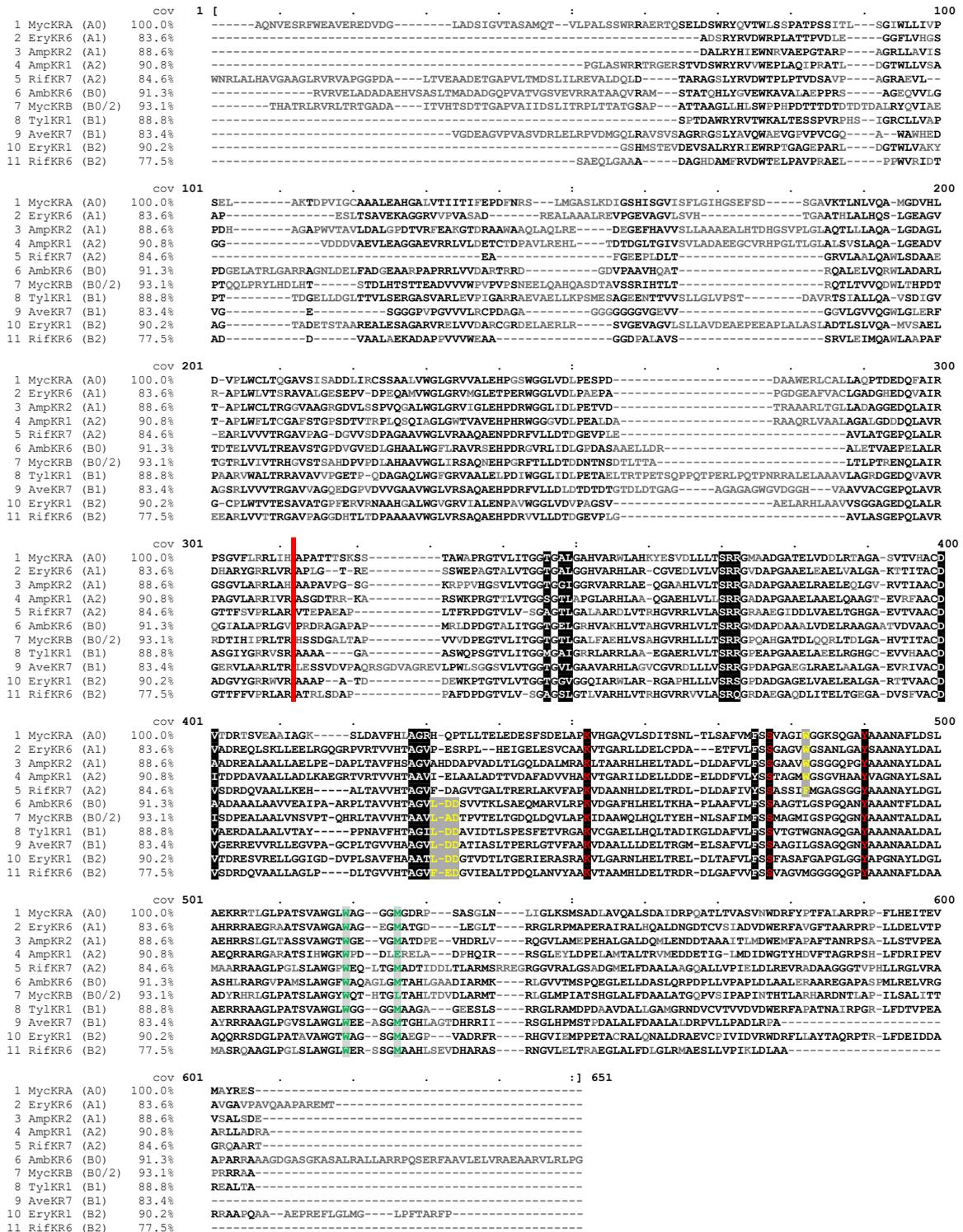
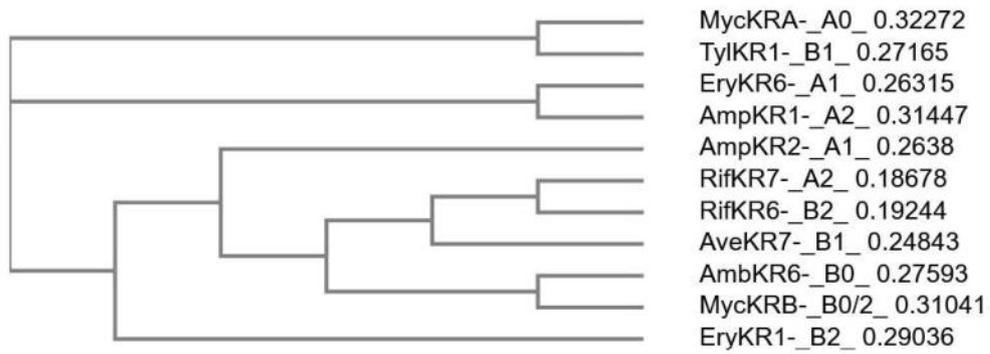


Abbildung 8-2: Sequenz(AS)-Vergleich von elf KR-Domänen, fünf A-Typ und sechs B-Typ. Der rote Strich zeigt den Beginn der katalytischen Domäne an. Weiß/Schwarz: Kofaktor NADPH bindende AS. Rot/Schwarz: AS des aktiven Zentrums. Grün/Grau: konservierte AS, die im A-Typ die Orientierung des ACP-Arms dirigieren. Gelb/Grau: A-Typ konservierte Tryptophan (W) und im B-Typ LDD-Motiv.<sup>[102,103]</sup>



**Abbildung 8-3: Phylogenetische Verwandtschaft der *in papyro* ausgewählten KR-Domänen.**

Gezeigt in Skala-unabhängiger Darstellung. Angegeben sind der KR-Name, der KR-Typ und die Verwandtschaftsdistanz, welche als Grad der Substitution mit Bezug auf die Gesamtlänge des Sequenzvergleichs (ohne Lücken) angegeben ist.<sup>[102,103]</sup>

## 8.2 Vektorkarten, Gen- und Aminosäuresequenzen

### Darstellung der Vektorkarten

Die gezeigten Vektorkarten wurden mit SERIALCLONER 2.6.1 und SNAPGENE VIEWER 4.3.10 erstellt. Bezeichnung, Größe, entscheidende Sequenzbereiche und verwendete Restriktionsenzymchnittstellen sind in jeder Vektorkarte angezeigt.

Die KR Gene sind innerhalb der Vektorkarten in Orange dargestellt; Resistenzgene in Dunkelrot; das Gen des *lac* Repressors in Blau; His<sub>6</sub>- und Pro<sub>5</sub>-tags in Rot. Darüber hinaus sind in den Vektorkarten der „leeren“ Vektoren pMK und pET28a+ die Replikationsursprünge in Gelb und weitere Bereiche in Weiß hervorgehoben, die in den Vektorkarten der KR Gene-enthaltenden Vektoren nicht mehr dargestellt werden, obwohl diese weiterhin vorhanden sind.

Der für die Expression der rekombinanten Kettoreduktase Domäne zu Grunde liegende ORF1 wird durch einen dem Gen nebenstehenden schmalen, schwarzen Pfeil angezeigt.

Die Darstellungsgröße der Vektorkarten steht in keinem Zusammenhang mit der Größe der Plasmide. 5'-His<sub>6</sub>, 3'-Pro<sub>5</sub>

### Genetische Sequenzdaten

Die dokumentierten Sequenzen basieren auf den Sequenzierungsdaten, welche unter Verwendung der Sequenzierungsprimer pET28a+\_fwd und pET28a+\_rev durch

Tabelle 8-2: Spezifische Sequenzen mit Eigenschaften innerhalb der Sequenzdaten.

DNA-Sequenz	Eigenschaften
<u>ATG</u>	Startcodon
<u>TAA, TAG, TAC</u>	Stoppcodon
<b>CATATG</b>	<i>Nde</i> I Erkennungssequenz
<b>GAATTC</b>	<i>Eco</i> RI Erkennungssequenz
<b>CATCATCATCATCAC</b>	N-terminale Histidin <sup>6</sup> -Sequenz in pET28a+, 5'-His <sub>6</sub> -tag
<b>CACCACCACCACCAC</b>	C-terminale Histidin <sup>6</sup> -Sequenz in pET28a+, 3'-His <sub>6</sub> -tag, CH
<b>CCACCACCACCACCA</b>	C-terminale Prolin <sup>5</sup> -Sequenz in pET28a+, 3'-Pro <sub>5</sub> -tag, CP

## 8.2.1 Vektoren pUC57, pMK und pET28a+

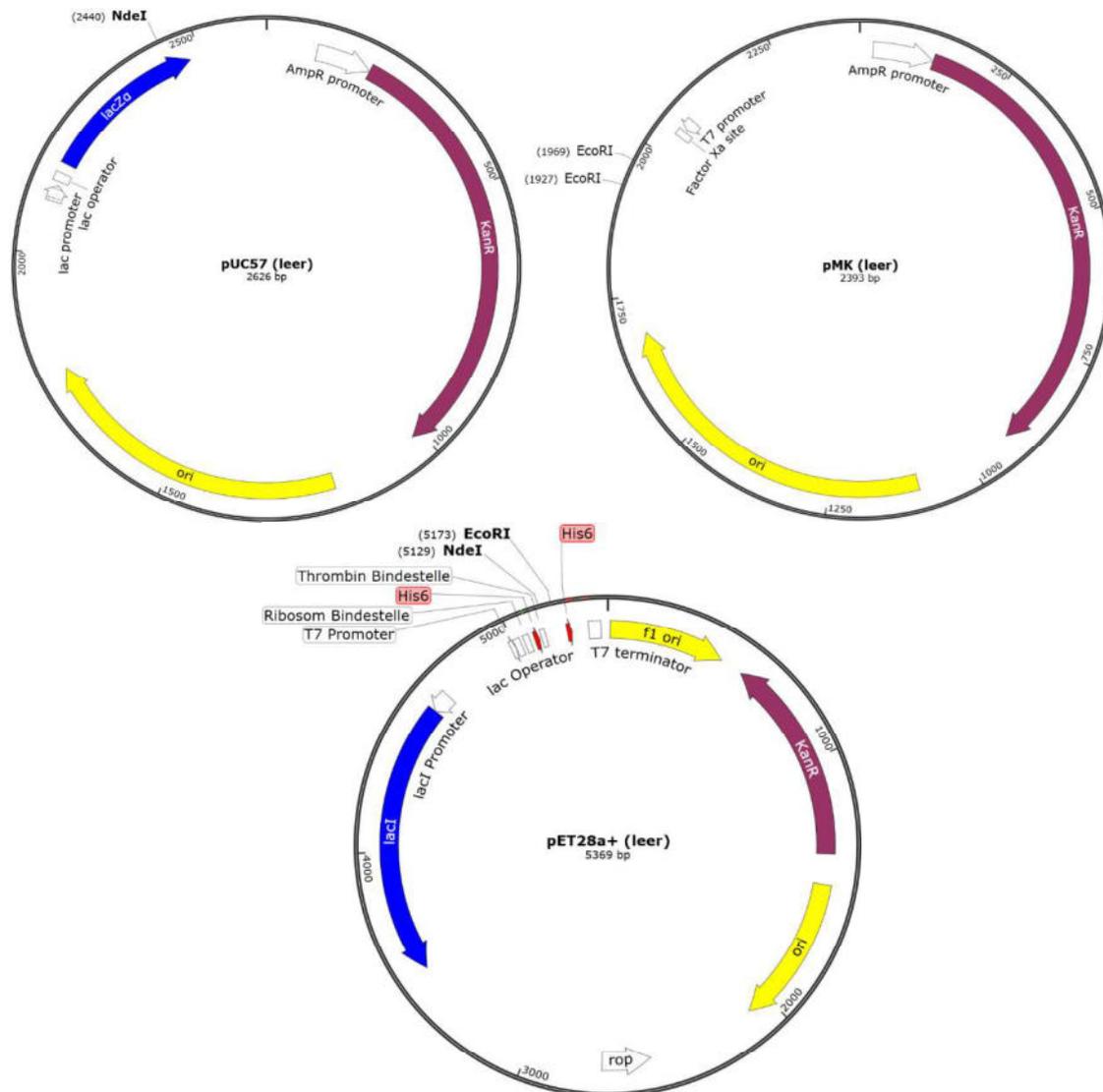


Abbildung 8-4 Vektorkarte der Plasmide pUC57, pMK und pET28a+ mit den prominentesten Eigenschaften.

## 8.2.2 Rekombinante AmpKR1-Domänen

### Expressionsvektoren mit *ampKR1*

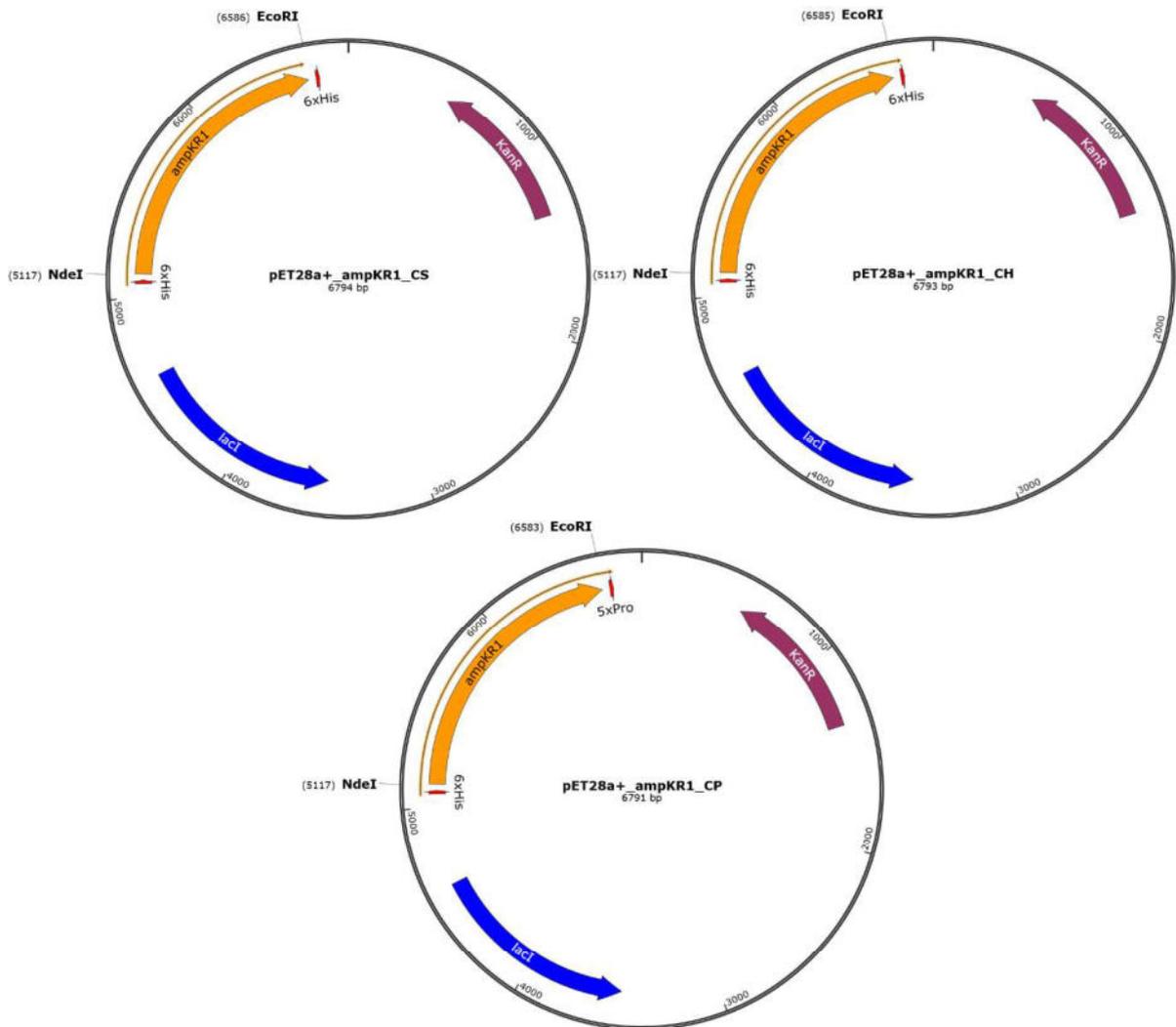


Abbildung 8-5 Vektorkarten der Plasmide pET28a+\_ampKR1\_CS / CH / CP.

### Gensequenzen von *ampKR1*-Derivaten in pET28a+

#### Sequenz von *ampKR1\_CS*

1	<b>ATG</b> GGCAGCAGC <b>CATCATCATCATCAC</b> AGCAGCGGCCCTGGTGCCGCGCGGCAGC <b>CAT</b>	60
61	<b>ATG</b> CCGGGCCTGGCCAGCTGGCGTCGCACACGTGGTGAACGCAGCACCGTGGATAGCTGG	120
121	CGTTACCGCGTGGTTTGGGAACCGTTAGCCCAAATTCGCGCGCCACCCTGGATGGCACA	180
181	TGGTTACTGGTGAAGTGCAGGCGGTGTTGACGATGATGTGGCAGAAGTGCTGGAAGCAGGT	240
241	GGTGCAGAAGTGCGCCGTCTGGTGCTGGATGAAACCTGTACCGATCCTGCAGTGCTGCGC	300
301	GAACATCTGACAGACACCGACGGCCTGACCGGCATTGTGAGCGTTCTGGCCGATGCAGAA	360
361	GAAGTTGTGTGCGTCATCCGGGCCTGACCTTAGGTCGGCCCTGAGTGTGAGCCTGGCA	420
421	CAGGCCCTGGGCGAAGCAGATGTTACAGCCCCGTGTGGTTCCCTGACCTGTGGTGCCTTC	480
481	AGCACCGGTCCGAGCGATACCGTTACCCGCCCTCTGCAGAGTCAGATCGCCGGCCTGGGC	540

541	TGGACCGTTGCAGTGGAAACATCCGCATCGTTGGGGTGGCGGCGTGGATCTGCCTGAAGCC	600
601	CTGGATGCACGTGCAGCACAGCGCTTAGTTGCCGCACTGGCAGGCGCCCTGGGTGATGAT	660
661	GATCAGCTGGCCGTTTCGTCCGGCAGGCGTTCTGGCACGTTCGATTGTTTCGTGCCAGTGGC	720
721	GATACCCGCCGTAAAGCCCCGTAGTTGGAAACCGCGCGCACCACCCTGGTTACCGGCGGC	780
781	AGTGGTACCTTAGCACCGGGTCTGGCCCCCATCTGGCAGCACAAGGCGCAGAACACCTG	840
841	GTTCTGCTGAGCCGTCGTGGTGCAGATGCCCCCTGGTGCAGCAGAAGTGGCAGCCGAGCTG	900
901	CAGGCCGCAGGTACAGAGGTTTCGTTTCGCCGCTGCGATATCACCGATCCGGATGCAGTG	960
961	GCAGCACTGCTGGCAGATCTGAAGGCAGAAGGTCGCACAGTGCGTACCGTGGTTCATAAC	1020
1021	GCCGCCGTTATCGAATTAGCCGCCCTGGCCGATACCACCGTTGATGCCTTTGCCGACGTG	1080
1081	GTTTCATGCCAAAGTGACCGGTGCACGCATTCTGGACGAACTGCTGGATGACGAAGAACTG	1140
1141	GACGATTTTCGTGCTGTACAGCAGCACCGCCGGTATGTGGGGTAGCGGCGTTACCGCCGT	1200
1201	TATGTTGCAGGCAATGCCTATCTGAGCGCCCTGGCAGAACAGCGTCGTGCCCGTGGTGCA	1260
1261	CGTGCCACCAGCATTCATTGGGGTAAGTGGCCGGACGATCTGGAACGTGAGTTAGCAGAT	1320
1321	CCGCACCAGATTGCCCGCAGCGCCCTGGAATATCTGGATCCGGAGCTGGCCATGACCGCA	1380
1381	CTGACCCGCGTTATGGAGGATGATGAGACCATTGGCCTGATGGACATCGACTGGGGCACA	1440
1441	TACCACGATGTGTTACCGCCGGTCGCCCCGAGCCACCTGTTTGATCGCATTCCGGAAGTT	1500
1501	GCCCGCCTGCTGGCCGATCGTGCC <u>TAAGAATTC</u>	1533

### Sequenz von *ampKR1\_CH*

Die Nukleotidsequenz von Position 0 bis 1524 ist identisch mit der von *ampKR1-CS*.

1501	GCCCGCCTGCTGGCCGATCGTGCC <u>GAATTC</u> GAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCA	1560
1561	CTCGAG <u>CACCACCACCACCACCTGA</u>	1587

### Sequenz von *ampKR1\_CP*

Die Nukleotidsequenz von Position 0 bis 1524 ist identisch mit der von *ampKR1-CS*.

1501	GCCCGCCTGCTGGCCGATCGTGCC <u>GAATTC</u> GAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACT	1560
1511	CGAGCA <u>CCACCACCACCACCA</u> CTGAGATCCGGCTGC <u>TAA</u>	1599

### Aminosäuresequenz von AmpKR1-Derivaten

#### Aminosäuresequenz von AmpKR1

1	<u>M</u> GSS <u>H</u> H <u>H</u> H <u>H</u> HSSGLVPRGSHMPGLASWRRTRGERSTVDSWRYRVVWEPLAQIPRATLDGT	60
61	WLLVSAGGVDDDAEVLVLEAGGAEVRRLVLDDETCTDPAVLREHLTDTDGLTGIVSVLADAE	120
121	EGCVRHPGLTLGLALSLSLAQALGEADVTAFLWFLTCGAFSTGPSDTVTRPLQSQIAGLG	180
181	WTVAVEHPRWGGGVDLPEALDARAAQRLVAALAGALGDDDDQLAVRPAGVLARRIVRASG	240
241	DTRRKARSWKPRGTTLVTTGGSGTLAPGLARHLAAQGAEHLVLLSRRGADAPGAAELAAEL	300
301	QAAGTEVRFAACDITDPDAVAALLADLKAEGRTVVRTVVHTAAVIELAALADTTVDAFADV	360
361	VHAKVTGARILDELDDDEELDDFVLYSSTAGMWGSGVHAAYVAGNAYLSALAEQRRARGA	420

421 RATS<sup>I</sup>HWGKWPDDL<sup>E</sup>RELADPHQ<sup>I</sup>IRRS<sup>G</sup>LEYLDPELAMTALTRVME<sup>D</sup>DETIGLMDIDWGT 480  
 481 YHDVFTAGRPSHLFDRIPEVARLLADRA 508

### Aminosäuresequenz von AmpKR1-CH

Die Aminosäuresequenz von Position 0 bis 508 ist identisch mit der von AmpKR1.

481 YHDVFTAGRPSHLFDRIPEVARLLADRAANSSSVDKLA<sup>A</sup>ALE<sup>H</sup>**HHHHHH** 528

### Aminosäuresequenz von AmpKR1-CP

Die Aminosäuresequenz von Position 0 bis 508 ist identisch mit der von AmpKR1.

481 YHDVFTAGRPSHLFDRIPEVARLLADRAEFELRRQACGRTRAP**PPPP**LRSGC 532

## 8.2.3 Rekombinante AmpKR2-Domäne

### Expressionsvektor mit *ampKR2*

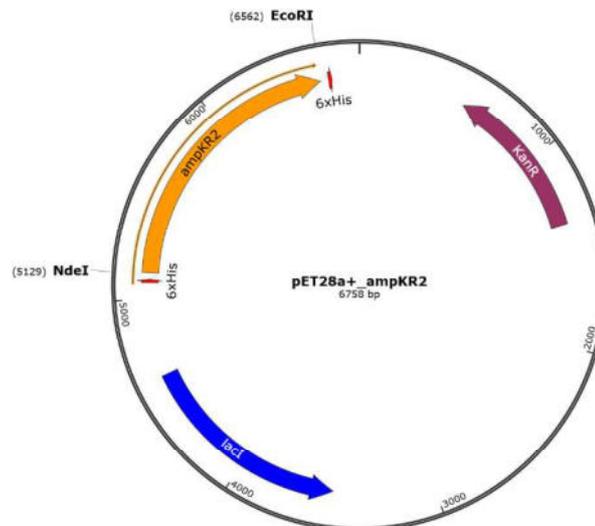


Abbildung 8-6 Vektorkarte des Plasmids pET28a+\_ampKR2.

### Gensequenzen von *ampKR2* in pET28a+

1 **ATG**GGCAGCAGC**CATCATCATCATCAC**AGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGC**CAT** 60  
 61 **ATG**GATGCACTGCGCTATCATATTGAATGGAATCGTGTTGCAGAACCGGTACAGCACGT 120  
 121 CCGGCAGGTCGCTGCTGGCAGTTATTAGTCCGGATCATGCGGGTGCACCGTGGGTTACC 180  
 181 GCAGTCTGGATGCCCTGGGTCCGATACCGTTCGTTTTGAAGCAAAGGCACCGATCGT 240  
 241 GCAGCATGGGCAGCACAGCTGGCTCAGCTGCGTGAAGATGAAGGTGAATTTTCATGCAGTT 300  
 301 GTTAGCCTGCTGGCTGCAGCAGAAGCACTGCATACCGATCATGGTAGCGTTCCGCTGGGT 360  
 361 CTGGCACAGACACTGCTGCTGGCACAGGCCCTGGGTGATGCAGGTCTGACCGCACCGCTG 420  
 421 TGGTGTCTGACCCGTGGTGGTGTTCAGCAGGTCGTGGTGATGTTCTGAGCAGTCCGGTT 480

481	CAGGGTGCCCTGTGGGGTCTGGGTCTGTTATTGGTCTGGAACATCCGGATCGTTGGGGT	540
541	GGTCTGATTGATCTGCCGAAACCGTTGATACCCGTGCAGCAGCACGTCTGACAGGACTG	600
601	CTGGCCGATGCCGGTGGTGAAGATCAGCTGGCAATTCGTGGTAGCGGTGTTCTGGCACGT	660
661	CGTCTGGCCCATGCAGCACCGGCAGTTCGGGTAGCGGTAAACGTCCGCCTGTTTCATGGT	720
721	TCAGTTCGGTTACCGGTGGTACAGGTGGTATTGGTGGTCTGTTGCCCGTCGCCTGGCA	780
781	GAACAGGGTGCAGCCCATCTGGTTCTGACCAGCCGTCTGGTGCAGATGCACCGGGTGC	840
841	GCGGAAGTGCCTGCAGAACTGGAACAGCTGGGTGTTTCGTGTTACCATTGCAGCATGTGAT	900
901	GCAGCGGATCGTGAAGCACTGGCTGCCCTGCTGGCGGAGCTGCCGGAAGATGCTCCGCTG	960
961	ACCGCAGTTTTTTCATAGTGCCGGTGTGGCCATGATGATGCTCCGGTTGCAGATCTGACC	1020
1021	CTGGGCCAGCTGGATGCGCTGATGCGTGCCAAACTGACAGCAGCCCGTCATCTGCATGAA	1080
1081	CTGACGGCAGATCTGGATCTGGATGCATTTGTTCTGTTTAGCAGCGGTGCAGCAGTTTGG	1140
1141	GGTAGTGGTGGTCAGCCTGGTTATGCAGCAGCCAATGCATATCTGGACGCACTGGCCGAA	1200
1201	CATCGTCGTAGCCTGGGCCTGACCGCAAGCAGCGTTGCATGGGGCACCTGGGGTGAAGTT	1260
1261	GGTATGGCAACCGATCCGGAAGTGCATGATCGTCTGGTTCGTCAGGGTGTGCTGGCAATG	1320
1321	GAACCGGAACATGCACTGGGTGCGCTGGATCAGATGCTGGAAAATGATGATACCGCAGCA	1380
1381	GCAATTACCCTGATGGATTGGGAAATGTTTGACCCGGCATTTACC GCAAATCGTCCGAGC	1440
1441	GCACTGCTGAGCACCGTTCCGGAAGCAGTTAGCGCACTGAGTGTGAA <u><b>TAAGAATTC</b></u>	1497

### Aminosäuresequenz von AmpKR2

1	MGSS <b>HHHHHH</b> SSGLVPRGSHMDALRYHIEWNRVAEPGTARPAGRLLAVISPDHAGAPWVT	60
61	AVLDALGPD TVRFEAKGTDRAAWAAQLAQLREDEGEFHAVVSLAAAEALHTDHGSVPLG	120
121	LAQTL LLAQALGDAGLTAPLWCLTRGGVAAGRGDVLSSPVQ GALWGLGRVIGLEHPDRWG	180
181	GLIDL PETVDTRAAARLTGLLADAGGEDQLAIRGSGVLARRLAHAAPAVPGSGKRPPVHG	240
241	SVLVTGGTGGIGGRVARRLAEQGAHLVLT SRRGADAPGAAELRAELEQLGVRVTIAACD	300
301	AADREALAALLAELPEDAPLTAVFHSAGVAHDDAPVADLT LGQLDALMRAKLTAAARHLHE	360
361	LTADLDLDAFVLFSSGAAVWGGQPGYAAANAYLDALAEHRRSLGLTASSVAWGTWGEV	420
421	GMATDPEVHDRLVRQGLAMEPEHALGALDQMLENDDTAAAITLMDWEMFAPAFTANRPS	480
481	ALLSTVPEAVSALSDE	496

## 8.2.4 Rekombinante EryKR1-Domänen

### Expressionsvektoren mit *eryKR1*-Derivaten

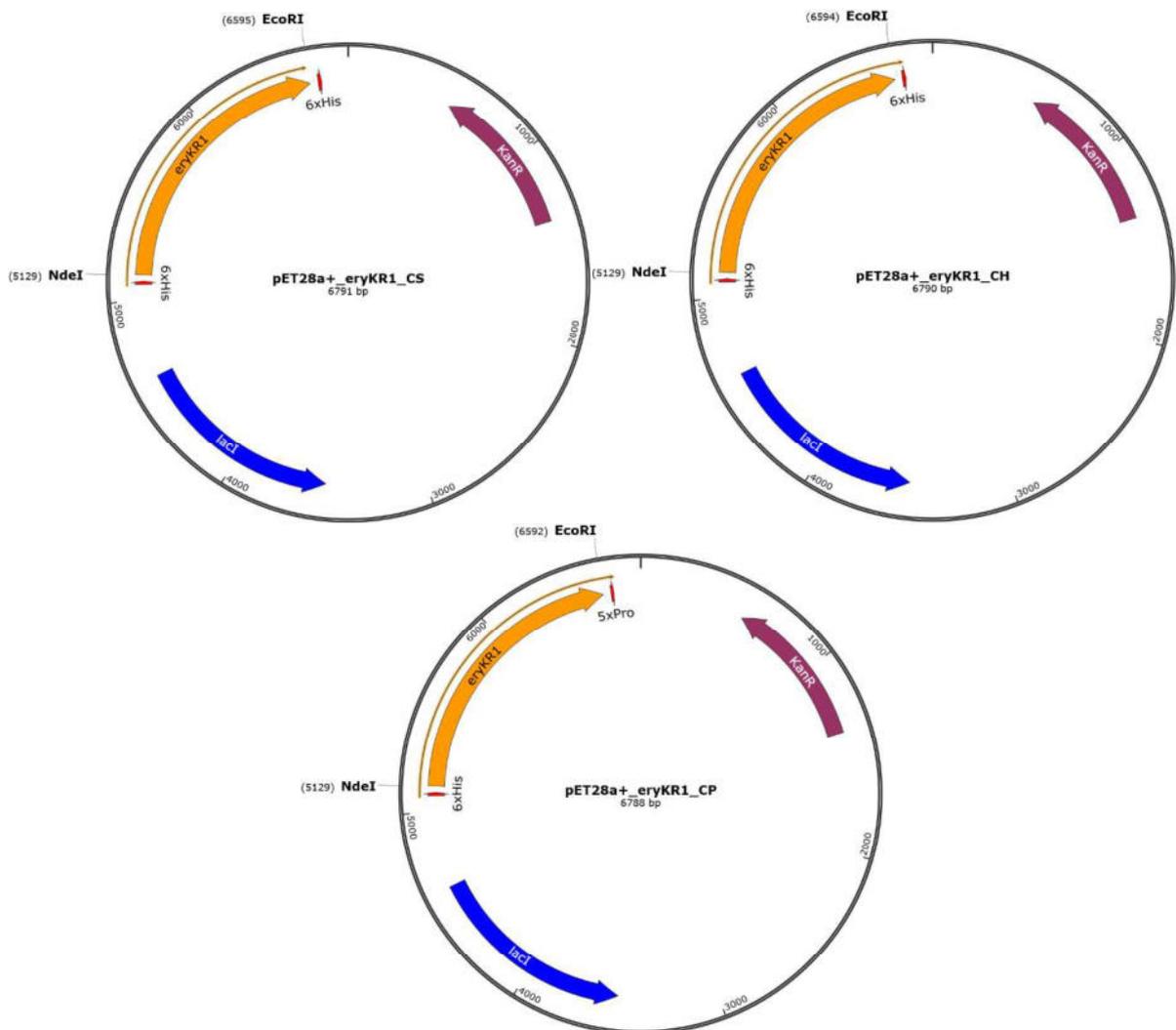


Abbildung 8-7 Vektorkarten der Plasmide pET28a+*\_eryKR1\_CS / CH / CP*.

### Gensequenzen von *eryKR1*-Derivaten in pET28a+

#### Sequenz von *eryKR1\_CS*

1	<b>ATG</b> GGCAGCAGC <b>CATCATCATCATCAC</b> AGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGC <b>CAT</b>	60
61	<b>ATG</b> GGTAGCCACATGAGCACCGAAGTTGATGAAGTTAGCGCACTGCGTTATCGTATTGAA	120
121	TGGCGTCCGACCGGTGCCGGTGAACCTGCACGTCTGGATGGCACCTGGCTGGTTGCAAAA	180
181	TATGCAGGCACCGCAGATGAAACCAGCACCGCAGCACGTGAAGCACTGGAAAGTGCCGGT	240
241	GCACGTGTTCTGTAAGTGGTTGTTGATGCACGTTGTGGTCTGTGATGAACTGGCAGAACGT	300
301	CTGCGTAGCGTTGGTGAAGTTGCCGGTGTCTGAGCCTGCTGGCAGTGGATGAAGCAGAA	360
361	CCGGAAGAAGCACCGCTGGCACTGGCAAGCCTGGCAGATACCCTGAGCCTGGTTCAGGCA	420
421	ATGGTTAGCGCAGAACTGGGTTGTCCGCTGTGGACCGTTACCGAAAGCGCAGTTGCAACC	480
481	GGTCCGTTTGAACGTGTGCGTAATGCAGCACATGGTGCACGTGGGGTGTGGTTCGTGTT	540

541	ATTGCCCTGGAAAATCCGGCAGTTTGGGGTGGTCTGGTTGATGTTCCGGCAGGTAGCGTT	600
601	GCCGAAC TGGCACGTCATCTGGCAGCAGTTGTTAGCGGTGGTGCGGGTGAAGATCAGCTG	660
661	GCCCTGCGTGCAGATGGTGT TATGGTCGTCGTTGGGTTTCGTGCAGCAGCTCCGGCAACC	720
721	GATGATGAATGGAAACCGACCGGTACAGTTCTGGTTACCGGTGGTACAGGTGGTGTGGT	780
781	GGTCAGATTGCACGGTGGCTGGCAGCCGTGGTGCACCGCATCTGCTGCTGGTTAGCCGT	840
841	AGCGGTCCGGATGCCGATGGTGCAGGCGAACTGGTGGCGGAACTGGAAGCCCTGGGTGCA	900
901	CGTACCACCGTTGCAGCATGTGATGTTACCGATCGTGAAAGCGTGCCTGAACTGCTGGGT	960
961	GGTATTGGTGTGATGTGCCGCTGAGCGCAGTTTTTTCATGCAGCAGCAACCCTGGATGAT	1020
1021	GGCACCGTTGATACACTGACCGGTGAACGTATTGAACGTGCAAGCCGTGCAAAAGTTCTG	1080
1081	GGTGCCCGTAATCTGCATGAACTGACACGCGAACTGGATCTGACCGCATTTGTTCTGTTT	1140
1141	AGCAGCTTTCGAAGCGCATTTGGCGCACCGGGTCTGGGTGGTTATGCACCGGGTAATGCA	1200
1201	TATCTGGATGGTCTGGCACAGCAGCGTCGTAGTGATGGTCTGCCTGCAACCGCAGTTGCC	1260
1261	TGGGGCACCTGGGCAGGTAGTGGTATGGCAGAAGGTCCGGTTGCAGATCGTTTTTCGTCGT	1320
1321	CATGGTGT TATTGAAATGCCTCCGGAACCGCATGTCGTGCACTGCAGAATGCACTGGAT	1380
1381	CGTGCAGAAGTTTGTCCGATTGTTATTGATGTTTCGTTGGGATCGCTTTCTGCTGGCATAT	1440
1441	ACCGCACAGCGTCCGACACGTCTGTTTGATGAAATTGATGATGCCCGTCGTGCCGCACCG	1500
1501	CAGGCAGCTGCAGAACCTCGT <u>TAAGAATTC</u>	1530

### Sequenz von *eryKR1\_CH*

Die Nukleotidsequenz von Position 0 bis 1521 ist identisch mit der von *eryKR1-CS*.

1501	CAGGCAGCTGCAGAACCTCGT <u>GCAATTC</u> GAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTC	1560
1561	GAG <u>CACCACCACCACCACC</u> ACTGA	<b>1584</b>

### Sequenz von *eryKR1\_CP*

Die Nukleotidsequenz von Position 0 bis 1521 ist identisch mit der von *eryKR1-CS*.

1501	CAGGCAGCTGCAGAACCTCGT <u>GCAATTC</u> GAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGA	1560
1561	GCA <u>CCACCACCACCACCA</u> CTGAGATCCGGCTGC <u>TAA</u>	1596

### Aminosäuresequenz von EryKR1-Derivaten

#### Aminosäuresequenz von EryKR1

1	MGSS <b>HHHHHH</b> SSGLVPRGSHMGSMSSTEVDEVSALRYRIEWRPTGAGEPARLDGTWLVAK	60
61	YAGTADETSTAAREALESAGARVRELVVDARCGRDELAERLRSVGEVAGVLSLLAVDEAE	120
121	PEEAPLALASLADTSLVQAMVSAELGCPLWTVTESAVATGPFERVRNAAHGALWGVGRV	180
181	I ALENPAVWGLVDVPAGSVAELARHLAAVVS GGAGEDQLALRADGVYGRRWVRAAAPAT	240
241	DDEWKPTGTVLVTGGTGGVGGQIARWLARRGAPHLLLVSRSRGPADGAGELVAELEALGA	300
301	RTTVAACDVTDRESVRELLGGIGDDVPLSAVFHAAATLDDGTVDTLTGERIERASRAKVL	360
361	GARNLHEL TRELDLTAFLVLFSSFASAFGAPGLGGYAPGNAYLDGLAQQRSDGLPATAVA	420

421	WGTWAGSGMAEGPVADRFRRHGVIEMPPETACRALQNALDRAEVCPIVIDVRWDRFLLAY	480
481	TAQRPTRLFDEIDDARRAAPQAAAEPR	507

### Aminosäuresequenz von EryKR1-CH

Die Aminosäuresequenz von Position 0 bis 507 ist identisch mit der von EryKR1.

481	TAQRPTRLFDEIDDARRAAPQAAAEPRANSSSVDKLAAALEHHHHHH	527
-----	---	-----

### Aminosäuresequenz von EryKR1-CP

Die Aminosäuresequenz von Position 0 bis 507 ist identisch mit der von EryKR1.

481	TAQRPTRLFDEIDDARRAAPQAAAEPRFELRRQACGRTRAPPPPPPLRSGC	531
-----	---	-----

## 8.2.5 Rekombinante EryKR6-Domäne

### Expressionsvektor mit eryKR6

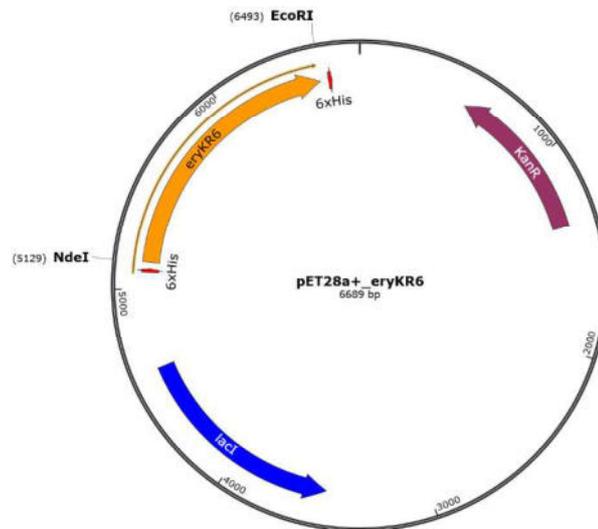


Abbildung 8-8 Vektorkarte des Plasmids pET28a+\_eryKR6.

### Gensequenzen von eryKR6 in pET28a+

1	<b>ATG</b> GGCAGCAGC <b>CATCATCATCATCAC</b> AGCAGCGGCCCTGGTGCCGCGCGGCAGC <b>CAT</b>	60
61	<b>ATG</b> CCGATAGCCGCTATCGCGTGGATTGGCGTCCGCTGGCCACAACCCCGGTGGATCTG	120
121	GAGGGCGGTTTCCTGGTTCATGGTAGCGCCCCGAAAGCCTGACCAGCGCAGTGAAAAA	180
181	GCAGGCGGTCGTGTGGTTCGGTTGCAAGCGCCGATCGCGAGGCCTTAGCAGCCGCACTG	240
241	CGTGAAGTGCCGGTGAAGTTGCAGGTGTGCTGAGCGTGCACACAGGTGCCGCCACCCAT	300
301	CTGGCCCTGCATCAGAGTCTGGGTGAAGCCGGCGTTCGCGCACCTCTGTGGTTAGTGACA	360
361	AGCCGTGCCGTGGCACTGGGCGAAAGCGAACCCGTGGACCCGGAACAGGCCATGGTTTGG	420
421	GGTCTGGGTCGTGTGATGGGCCCTGAAACCCCTGAACGCTGGGGCGGTCTGGTTGATCTG	480

---

481	CCGGCAGAACCTGCCCCGCGATGGTGAAGCCTTTGTTGCATGCCTGGGCGCCGATGGC	540
541	CATGAGGATCAGGTGGCAATTCGCGACCACGCCCGTTATGGCCGTCGTCTGGTTTCGTGCC	600
601	CCGCTGGGTACCCGCGAAAGTAGCTGGGAACCGGCAGGTACCGCCTTAGTTACCGGCGGC	660
661	ACCGGTGCATTAGGCGGTTCATGTTGCCCGCCATCTGGCACGTTGTGGCGTTGAAGATCTG	720
721	GTGCTGGTGAGTCGCCGTGGTGTGGATGCACCTGGTGCAGCCGAACTGGAGGCCGAACTG	780
781	GTTGCCCTGGGTGCCAAAACAACCATTACCGCCTGCGACGTTGCAGATCGCGAACAGCTG	840
841	AGCAAACCTGCTGGAGGAACTGCGTGGTCAAGGCCGTCCGGTGCGTACAGTGGTGCATAACC	900
901	GCCGGTGTGCCGAAAGCCGCCCTCTGCACGAGATTGGCGAGCTGGAAAGCGTTTTGTGCC	960
961	GCAAAGTGACCGGTGCCCGTCTGCTGGATGAGCTGTGCCCGGACGCCGAAACCTTTGTT	1020
1021	CTGTTTAGCAGCGGTGCCGGCGTTTTGGGGTAGTGCCAATCTGGGTGCATATAGCGCCGCA	1080
1081	AACGCATATCTGGATGCCCTGGCACATCGTCGTCTGCAGAAAGGTCGTGCAGCCACCAGC	1140
1141	GTTGCATGGGGTGCATGGGCCGGTGAAGGCATGGCAACAGGTGATCTGGAAGGCTTAACC	1200
1201	CGTCGTGGCTTACGCCCGATGGCACCTGAACGCGCAATTCGCGCCCTGCACCAGGCACTG	1260
1261	GATAATGGCGACACCTGTGTTAGCATCGCAGACGTGGATTGGGAACGCTTTGCAGTGGGT	1320
1321	TTCACAGCAGCACGTCCGCGTCCGCTGCTGGATGAACTGGTGACACCGGCAGTTGGTGCA	1380
1381	GTTCCGGCAGTTCAGGCCGCACCTGCACGTGAAATGACC <u>TAGGAATTC</u>	1428

### Aminosäuresequenz von EryKR6

1	MGSS <b>HHHHHH</b> SSGLVPRGSHMADSRVVDWRPLATTPVDLEGGFLVHGSAPESLTSAVEK	60
61	AGGRVVPVASADREALAAALREVPGEVAGVLSVHTGAATHLALHQLGEAGVRAPLWLV	120
121	SRAVALGESEPDPEQAMVWGLGRVMGLETPERWGGGLVDLPAEPAPGDGEAFVACLGDG	180
181	HEDQVAIRDHARYGRRLVRAPLGTRESSWEPAGTALVTGGTALGGHVARHLARCGVEDL	240
241	VLVSRRGVDAPGAAELEAELVALGAKTTITACDVADREQLSKLLEELRGQGRPVRTVVHT	300
301	AGVPESRPLHEIGELESVCAAKVTGARLLDELCPDAETFVLFSSGAGVWGSANLGAYSAA	360
361	NAYLDALAHRRRAEGRAATSVAWGAWAGEGMATGDLEGLTRRGLRPMAPERAIRALHQAL	420
421	DNGDTCVSIADVDWERFAVGFTAARPRPLLELVTPAVGAVPAVQAAPAREMT	473

## 8.2.6 Rekombinante MycKRA-Domäne

### Expressionsvektor mit *mycKRA*

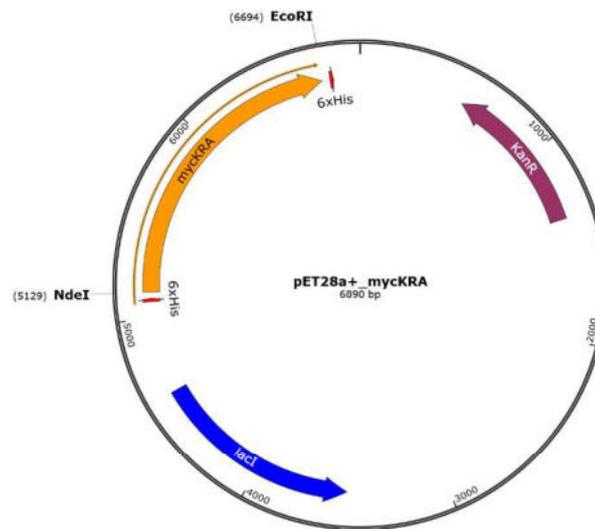


Abbildung 8-9 Vektorkarte des Plasmids pET28a+\_mycKRA.

### Gensequenz von *mycKRA* in pET28a+

1	<b>ATG</b> GGCAGCAGC <b>CATCATCATCATCAC</b> AGCAGCGGCCCTGGTGCCGCGCGGCAGC <b>CAT</b>	60
61	<b>ATG</b> GCCCAGAACGTGGAGAGTCGTTTCTGGGAAGCCGTTGAGCGTGAGGACGTTGATGGT	120
121	CTGGCAGACAGTATCGGCGTTACCGCCAGCGCAATGCAGACCGTTTTACCTGCCCTGAGT	180
181	AGCTGGCGTCGTGCAGAGCGTACACAGAGCGAACTGGACAGTTGGCGCTACCAGGTTACC	240
241	TGGCTGAGTAGTCCGGCCACACCGAGTAGTATCACACTGAGCGGCATTTGGCTGCTGATC	300
301	GTGCCTAGCGAACTGGCCAAGACAGATCCGGTTATCGGTTGTGCAGCCGCATTAGAGGCC	360
361	CACGGTGCCCTGGTGACAATCATCACCATCTTCGAGCCGGACTTCAACCGTAGTCTGATG	420
421	GGTGCCAGCCTGAAGGACATTGGCAGCCACATCAGCGGCGTTATCAGTTTCTGGGCATC	480
481	CACGGCAGTGAGTTTCAGTGACAGCGGCGCCGTGAAAACCCTGAATCTGGTGCAAGCCATG	540
541	GGTGACGTTTCATCTGGACGTTCCGCTGTGGTGTCTGACCCAGGGTGCCGTGAGCATCAGC	600
601	GCCGATGACCTGATCCGCTGCAGCAGCGCCGATTAGTGTGGGGTTTAGGTCGCGTTGTG	660
661	GCCTTAGAACACCCTGGCAGCTGGGGCGGTTTAGTGGACCTGCCGAAAGCCCTGACGAT	720
721	GCCGCTGGGAACGTTTATGCGCCTTACTGGCACAACCGACAGACGAGGATCAGTTCGCA	780
781	ATTCGCCGAGCGGCGTGTTCCTGCGCGTTTAATTCACGCCCGGCAACCACAACCGT	840
841	AAGAGCAGTACCGCATGGGCCCGCGTGGTACCCTGTTAATCACAGGTGGCACAGGCGCA	900
901	TTAGGTGCACACGTGGCCCGCTGGTTAGCCCAAGTACGAGAGTGTGGACCTGCTGCTG	960
961	ACAAGCCGTCGTGGTATGGCCGAGACGGTGCCACCGAACTGGTTGACGATCTGCGCACC	1020
1021	GCAGGTGCAAGTGTGACCGTTCACGCATGCGACGTTACCGATCGCACAAGCGTGGAGGCC	1080
1081	GCAATTGCCGCAAAAGCCTGGATGCCGTTTTCCATCTGGCAGGTCGTACCAGCCGACC	1140
1141	CTGCTGACCGAGCTGGAAGATGAGAGCTTCAGTGACGAGCTGGCACCTAAGGTTACGGT	1200
1201	GCACAGGTGCTGAGCGACATCACAAGTAACCTGACCCCTGAGCGCCTTCGTTATGTTTCAGT	1260
1261	AGCGTGGCAGGTATCTGGGGCGGCAAAAGCCAAGGTGCCTACGCCGCCGCAATGCCTTT	1320
1321	CTGGATAGCCTGGCCGAAAAGCGCCGCACATTAGGCCTGCCGGCAACAAGCGTTGCATGG	1380

1381	GGCCTGTGGGCCGGTGGTGGTATGGGTGACCGTCCGAGCGCAAGTGGCCTGAACCTGATC	1440
1441	GGCCTGAAGAGTATGAGCGCAGACCTGGCAGTTCAGGCACTGAGCGACGCAATCGATCGT	1500
1501	CCGCAGGCAACCTTAACCGTGGCAAGTGTGAACCTGGGACCGCTTTTACCCGACCTTCGCC	1560
1561	TTAGCCCCTCCTCGTCCGTTCCCTGCATGAGATCACAGAGTTATGGCCTATCGCGAAAGT	1620
1621	<b><u>TAGGAATTC</u></b>	1629

### Aminosäuresequenz von MycKRA

1	MGSS <b>HHHHHH</b> SSGLVPRGSHMAQNVESRFWEAVEREDVDGLADSIGVTASAMQTVLPALS	60
61	SWRRAERTQSELD SWRYQVTWLSSPATPSSITLSGIWLLIVPELAKTDPVIGCAALEA	120
121	HGALVTIITIFEPDFNRSLMGASLKDIGSHISGVISFLGIHGSEFSDSGAVKTLNLVQAM	180
181	GDVHLDVPLWCLTQGA VSI SADDLIRCSSAALVWGLGRVVALEHPGSWGGVLDLPESPDD	240
241	AAWERLCALLAQPTDEDQFAIRPSGVFLRRLIHAPATTTSKSSTAWAPRGTVLITGGTGA	300
301	LG AHVARWLAHKYESVDLLLT SRRGMAADGATELVDDLRTAGASVTVHACDVTDRTSVEA	360
361	AIAGKSLDAVFHLAGRHOPTLLTELEDESFSDELAPKVHGAQVLSDITSNLTL SAFVMFS	420
421	SVAGIWGGKSQ GAYAAANAF LDSLAEKRRTLGLPATSVAWGLWAGGMGDRPSASGLNLI	480
481	GLKSMSADLAVQALS DAIDRPQATLTVASVNWDRFYPTFALARPRPFLHEITEVMAYRES	540

## 8.2.7 Rekombinante MycKRB-Domäne

### Expressionsvektor mit mycKRB

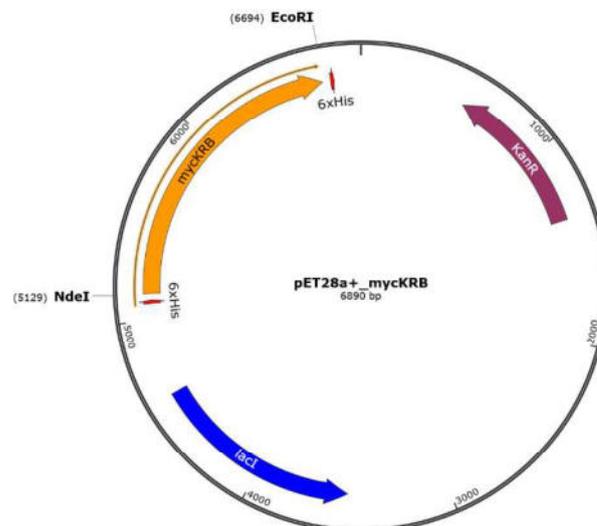


Abbildung 8-10 Vektorkarte des Plasmids pET28a+\_mycKRB.

### Gensequenz von mycKRB in pET28a+

1	<b><u>ATG</u></b> GGCAGCAGC <b>CATCATCATCATCAC</b> AGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGC <b>CAT</b>	60
61	<b>ATG</b> ACCCATGCAACCCGCTGCGTGTGCGTTTAACCCGCACAGGCGCAGACGCAATTACC	120
121	GTGCATACCAGCGACACCACCGGTGCCCCGGTGGCCATTATCGATAGTCTGATCACCCGT	180
181	CCTCTGACCACCGCCACAGGTAGCGCACCGGCAACAACCGCAGCCGGTCTGTTACATCTG	240

241	AGCTGGCCGCCGCATCCTGATACCACAACAGACACCGATACCGACACCGACGCCCTGCGT	300
301	TATCAGGTGATTGCCGAACCGACCCAGCAGCTGCCGCGTTACCTGCATGACCTGCACACC	360
361	AGCACCGATCTGCATACCAGCACAACAGAAGCCGATGTGGTGGTGTGGCCGGTTCCGGTT	420
421	CCGAGTAATGAGGAACTGCAGGCACACCAAGCCAGTGATACAGCCGTGAGCAGCCGTATT	480
481	CACACACTGACCCGCCAGACCCTGACAGTGGTGCAGGATTGGCTGACACATCCGGATACC	540
541	ACCGGTACACGTCTGGTGAATTGTTACCCGCCATGGCGTTAGCACCAGCGCCCATGATCCG	600
601	GTGCCGGACTTAGCCCATGCAGCCGTTTGGGGCTGATCCGCAGCGCACAGAACGAACAC	660
661	CCGGGTCTGTTTACCCTGCTGGACACCGATGACAACACCAATAGCGATACCCTGACCACC	720
721	GCCCTGACCTTACCGACCCGCGAGAATCAGCTGGCCATTCTGTCGTGACACCATCCATATT	780
781	CCGCGCCTGACCCGCCATAGCAGTGATGGCGCCCTGACAGCACCTGTGGTGGTGGATCCG	840
841	GAGGGTACAGTTCTGATTACCGGCGGTACCGGTACCCGGGTGCCCTGTTTCCGAACAT	900
901	CTGGTGAGCGCCACGGTGTGCGTCATCTGCTGCTGACCAGCCGTCGTGGTCCGCAAGCA	960
961	CATGGTGCCACCGATTTACAGCAGCGTCTGACCGATCTGGGCGCCCATGTGACCATCACC	1020
1021	GCATGCGATATTAGCGACCCGGAAGCACTGGCCGCACTGGTGAACAGTGTTCCGACACAG	1080
1081	CATCGCCTGACCGCAGTTGTTTCATACCGCAGCAGTTCTGGCAGACACCCCGTTACAGAA	1140
1141	CTGACCGGTGATCAGCTGGATCAGGTGCTGGCCCCGAAAATCGATGCCGCCTGGCAGCTG	1200
1201	CATCAGCTGACCTACGAGCACAACCTGAGTGCCTTCATCATGTTTCAGCAGTATGGCCGGT	1260
1261	ATGATTGGCAGCCCGGGCCAAGCAATTACGCCGAGCCAACACAGCCCTGGATGCCCTG	1320
1321	GCCGATTATCGTCATCGTCTGGGCCTGCCTGCCACAAGCCTGGCATGGGGCTATTGGCAG	1380
1381	ACCCACACCGGCCCTGACAGCACATCTGACCGATGTTGACCTGGCCCGTATGACCCGCTG	1440
1441	GGCCTGATGCCGATCGCAACCAGCCATGGTCTGGCCCTGTTTCGACGCAGCACTGGCAACC	1500
1501	GGTCAGCCGGTGAGTATTCCGGCCCCGATCAATACACACACCCTGGCACGCCATGCCCGC	1560
1561	GATAACACCCTGGCCCCGATTCTGAGTGCACCTGATTACCACCCCTCGTCGTCGCGCAGCC	1620
1621	<b><u>TAGGAATTC</u></b>	1629

### Aminosäuresequenz von MycKRB

1	MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTHATRLRVRLTRTGADAITVHTSDTTGAPVAIIDSLITR	60
61	PLTTATGSAPATTAAGLLHLSWPPHPDTTTTDTDTDALRYQVIAEPTQQLPRYLHDLHT	120
121	STDLHTSTTEADVVPVPSNEELQAHQASDTAVSSRIHTLTRQTLTVVQDWLTHPDT	180
181	TGTRLVIVTRHGVSTSAHDPVPLAHAAVWGLIRSAQNEHPGRFTLLDNTNSDTLTT	240
241	ALTLPTRENQLAIRRDTIHI PRLTRHSSDGALTAPVVVDPEGTVLITGGTGTLGALFAEH	300
301	LVSAHGVRHLLLSRRGPQAHGATDLQQLRDLGAHVITITACDISDPEALAALVNSVPTQ	360
361	HRLTAVVHTAAVLADTPVTELTGDQLDQVLAPKIDAAWQLHQLTYEHNLSAFIMFSSMAG	420
421	MIGSPGQGNAAAANTALDALADYRHLGLPATSLAWGYWQHTHTGLTAHLTDVDLARMTRL	480
481	GLMPIATSHGLALFDDAALATGQPVSI PAPIINTHTLARHARDNTLAPILSALITTPRRRAA	540

## 8.2.8 Rekombinante TyIKR1-Domänen

### Expressionsvektoren mit ty/KR1-Derivaten

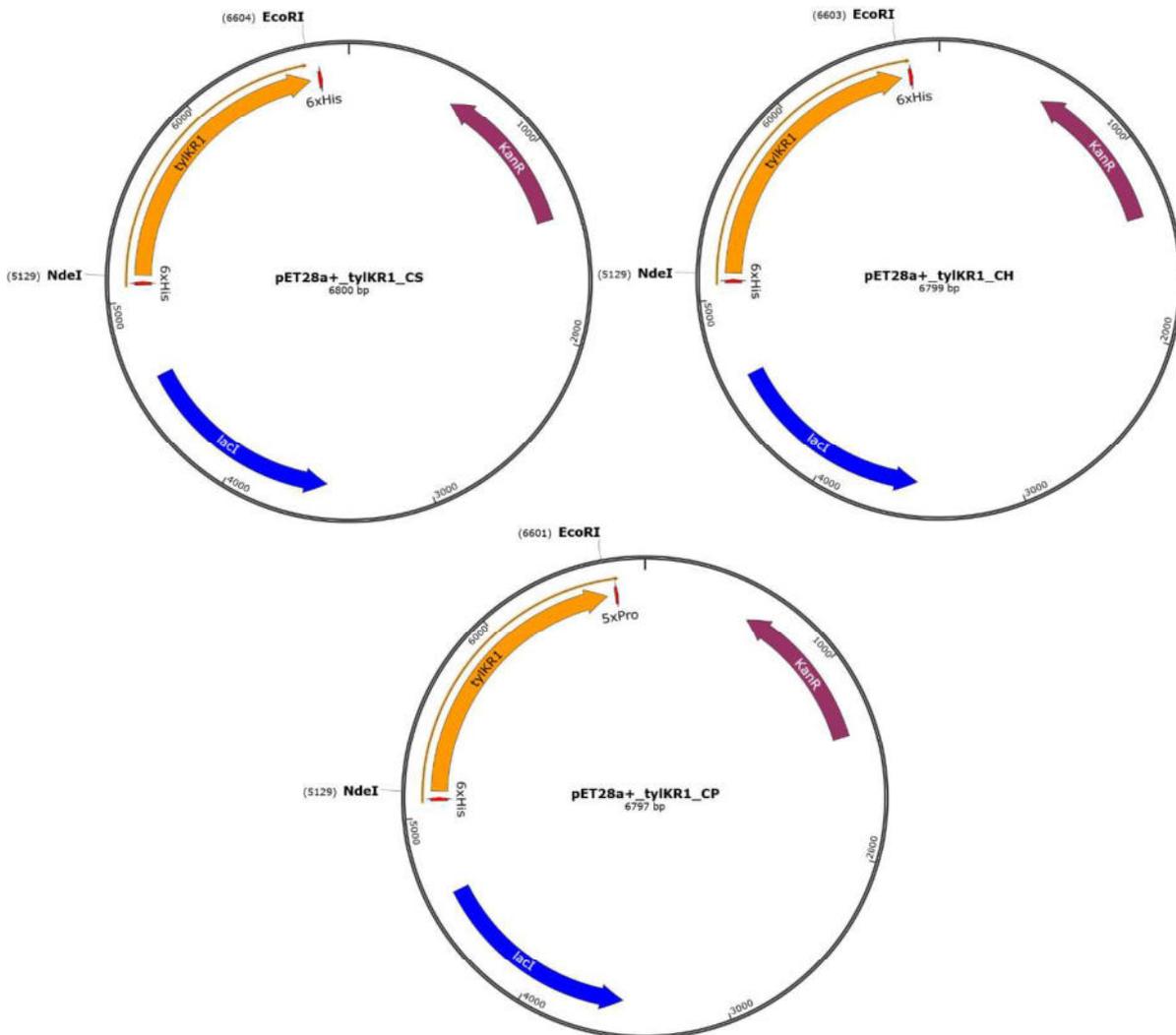


Abbildung 8-11 Vektorkarten der Plasmide pET28a+\_tyIKR1\_CS / CH / CP.

### Gensequenzen von ty/KR1-Derivaten in pET28a+

#### Sequenz von ty/KR1\_CS

1	<b><u>ATG</u></b> GGCAGCAGC <b><u>CATCATCATCATCATCAC</u></b> AGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGC <b><u>CAT</u></b>	60
61	<b><u>ATG</u></b> AGCCCGACCGATGCATGGCGCTATCGCGTGACCTGGAAGGCCCTGACCGAGAGCAGC	120
121	CCGGTTCGTCCTCATAGCATTGGTTCGTTGCTGGTTGCACCTCCGACCACCGATGGT	180
181	GAAGTGCCTGACGGCCTGACCACAGTTTTTAAGCGAGCGTGGTGCCAGCGTGGCCCCGTTTA	240
241	GAAGTTCCTATTGGCGCACGTCGTGCCGAAGTGGCAGAGCTGCTGAAACCGAGTATGGAA	300
301	AGCGCAGGCGAAGAAAACACCACAGTTGTGAGCCTGCTGGGTCTGGTTCCGAGTACCGAT	360
361	GCCGTGCGTACAAGCATTGCACTGCTGCAGGCAGTGAGTGATATTGGTGTGCCTGCAGCC	420
421	CGCGTTTGGGCACTGACCCGTCGTGCAGTTGCAGTTGTTCCGGGTGAAACCCCTCAGGAT	480
481	GCCGGCGCCAGTTATGGGGCTTTGGCCGTGTTGCAGCCCTGGAAGTGCCTGATATTTGG	540

541	GGCGGTCTGATTGACCTGCCGAAACCGCAGAAGTACACGCACCCCGGAGACAAGTCAG	600
601	CCGCCGCAAACCCCGGAACGTCTGCCGAGACCCCGAATCGCCGCGCACTGGAATTAGCC	660
661	GCAGCAGTTCTGGCCGGTCTGATGGTGAGGACCAGGTGGCCGTTTCGTGCCAGTGGTATT	720
721	TATGGTCGCCGTGTTAGTCTGTCAGCCGCCGAGGTGCAGCAAGTTGGCAGCCGAGCGGC	780
781	ACAGTGCTGATTACCGGCGGTATGGGCGCAATTGGTCGCCGTCTGGCACGTCTCTGGCC	840
841	GCAGAAGGTGCCGAGCGCTTAGTTTTAACCAGCCGCCGCGGCCCGGAAGCACCGGGCGCC	900
901	GCAGAACTGGCAGAAGAAGTGCAGCGGTATGGTTGCGAGGTTGTGCATGCCGCATGTGAT	960
961	GTGGCCGAACGCGATGCCTTAGCCGCACTGGTTACCGCATAACCCGCCTAACGCCGTGTTT	1020
1021	CATACCGCCGGCATTCTGGATGACGCCGTTATTGACACCCTGAGCCCTGAAAGCTTCGAA	1080
1081	ACCGTGCGCGGCCCAAAGTTTGGCGTGCAGAAGTGCAGTGCACCAGTTAACCGCCGACATC	1140
1141	AAAGGCTTAGACGCCCTTCGTGCTGTTTAGCAGCGTGACCGGCACCTGGGGTAACGCAGGT	1200
1201	CAGGGTGCCTATGCAGCAGCCAATGCCGCACTGGACGCACTGGCCGAGCGTCTGTCGTGCC	1260
1261	GCAGGTTTACCGCAACAAGCGTTGCCTGGGGTCTGTGGGGTGGTGGCGGTATGGCAGCA	1320
1321	GGCGCAGGTGAAGAAAGTCTGAGCCGTCGTGGCCTGCGTGCCATGGATCCGGACGCAGCA	1380
1381	GTTGATGCATTACTGGGCGCAATGGGTGCGCAATGATGTGTGCGTTACCGTGGTGGACGTG	1440
1441	GACTGGGAACGTTTCGCCCGGCAACCAATGCAATTCGTCCGGGTGCGCTGTTTGACACC	1500
1501	GTTCTGAAGCACGCGAAGCCCTGACCGCA <u>ATAAGAATTC</u>	1560

### Sequenz von *ty*/KR1\_CH

Die Nukleotidsequenz von Position 0 bis 1530 ist identisch mit der von *ty*/KR1-CS.

1501	GTTCTGAAGCACGCGAAGCCCTGACCGCA <u>AGCGAATTC</u> GAGCTCCGTCGACAAGCTTGCG	1560
1561	GCCGCACTCGAG <u>CACCACCACCACCACCCTGA</u>	1593

### Sequenz von *ty*/KR1\_CP

Die Nukleotidsequenz von Position 0 bis 1530 ist identisch mit der von *ty*/KR1-CS.

1501	GTTCTGAAGCACGCGAAGCCCTGACCGCA <u>GAATTC</u> GAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGC	1560
1561	CGCACTCGAGCA <u>CCACCACCACCACCA</u> CTGAGATCCGGCTGCT <u>TAA</u>	1605

### Aminosäuresequenz von TyIKR1-Derivaten

#### Aminosäuresequenz von TyIKR1

1	MGSS <u>HHHHHH</u> SSGLVPRGSHMSPTDAWRYRVTWKALTESSPVRPHSIGRCLLVAPPTTDG	60
61	ELLDGLTTVLSERGASVARLEVPIGARRAEVAELLKPSMESAGEENTTVVSLGLVPSTD	120
121	AVRTSIALLQAVSDIGVPAARVWALTRRAVAVVPGETPQDAGAQLWGFGRVAALELPDIW	180
181	GGLIDLPEETAELTRTPETSQPPQTPERLPQTPNRRALELAAVLAGRDGEDQVAVRASGI	240
241	YGRRSRAAAAAGAASWQPSGTVLITGGMGAIGRRLARRLAAEGAERLVLSRRGPEAPGA	300
301	AELAEELRGHGCEVVHAACDVAERDALAALVTAYPPNAVFTAGILDDAVIDTILSPESFE	360
361	TVRGAKVCGAELLHQLTADIKGLDAFVLFSSVTGTWGNAGQGAYAAANAALDALAERRRA	420

---

421 AGLPATSVAWGLWGGGGMAAGAGEESLSRRGLRAMDPDAAVDALLGAMGRNDVCVTVVDV 480  
481 DWERFAPATNAIRPGRLFDTVPEAREALTA 510

### Aminosäuresequenz von TylKR1-CH

Die Aminosäuresequenz von Position 0 bis 510 ist identisch mit der von TylKR1.

481 DWERFAPATNAIRPGRLFDTVPEAREALTAANSSSVDKLAAALE **HHHHHH** 530

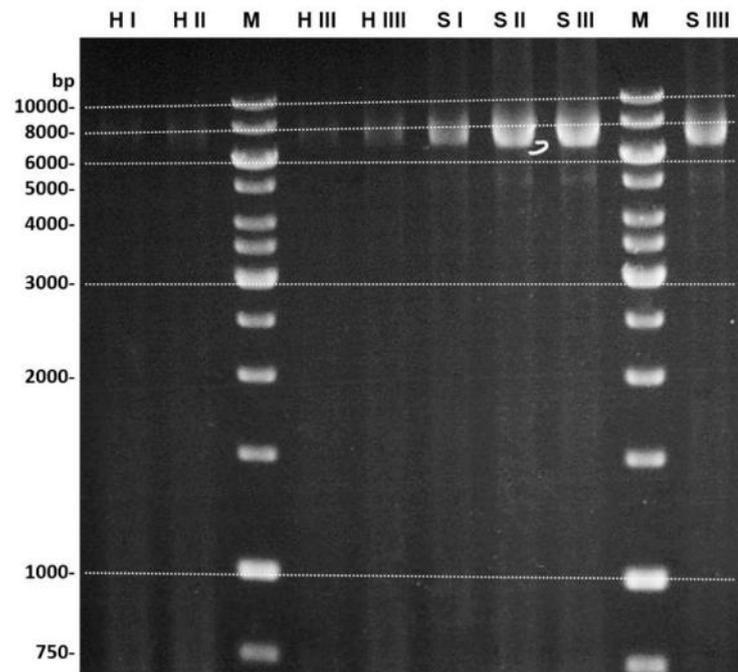
### Aminosäuresequenz von TylKR1-CP

Die Aminosäuresequenz von Position 0 bis 510 ist identisch mit der von TylKR1.

481 DWERFAPATNAIRPGRLFDTVPEAREALTAEFELRRQACGRTRA **PPPPPLRSGC** 534

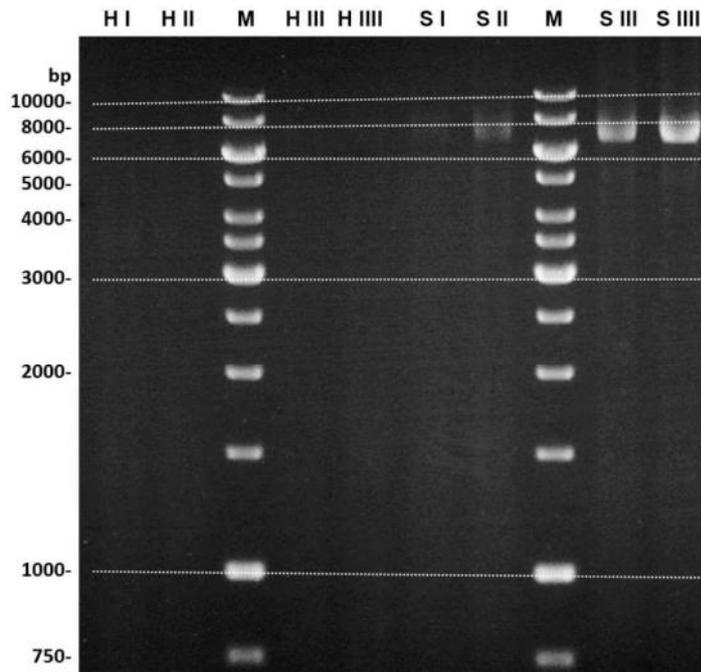
### 8.3 Molekularbiologische und Proteinbiochemische Arbeiten

#### 8.3.1 Agarosegele der SDM-PCR-Produkte

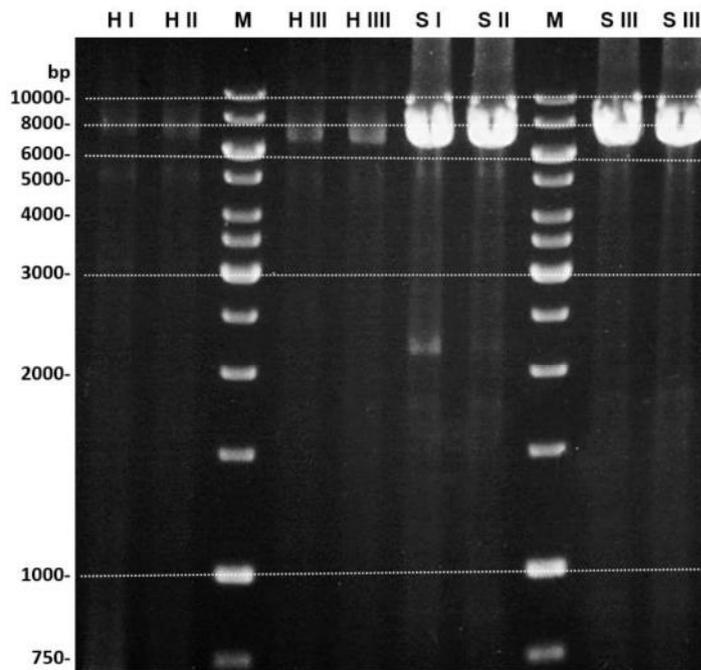


**Abbildung 8-12:** 1%-igen Agarosegel der linearen SDM-PCR-Amplifikate ausgehend von pET28a(+)*\_eryKR1\_CP*.

M: Marker. H: pET28a(+)*\_eryKR1\_CH*, 6790+32 bp. S: pET28a(+)*\_eryKR1*, 6791+33 bp. Annealingtemperatur I: 45 °C; II: 50 °C; III: 55 °C; IIII: 60 °C.

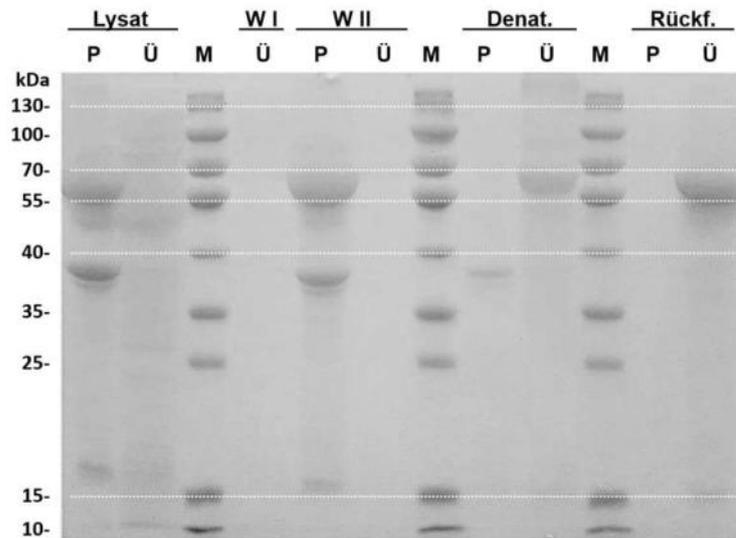


**Abbildung 8-13:** 1%-igen Agarosegel der linearen SDM-PCR-Amplifikate ausgehend von *pET28a(+)\_ampKR1\_CP*.  
M: Marker. H: *pET28a(+)\_ampKR1\_CH*, 6793+28 bp. S: *pET28a(+)\_ampKR1*, 6794+29 bp. Annealingtemperatur I: 45 °C; II: 50 °C; III: 55 °C; IIII: 60 °C.



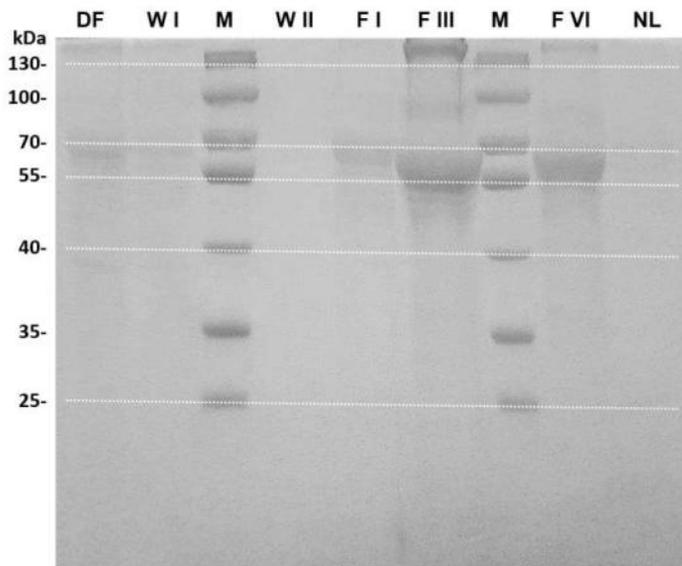
**Abbildung 8-14:** 1%-igen Agarosegel der linearen SDM-PCR-Amplifikate ausgehend von *pET28a(+)\_tyIKR1\_CP*.  
M: Marker. H: *pET28a(+)\_tyIKR1\_CH*, 6799+30 bp. S: *pET28a(+)\_tyIKR1*, 6800+31 bp. Annealingtemperatur I: 45 °C; II: 50 °C; III: 55 °C; IIII: 60 °C.

### 8.3.2 SDS-Gele der Proteinfaltung, -rückfaltung, -isolierung



**Abbildung 8-15:** 12%-ige SDS-Gel für die Proteinfaltung und -rückfaltung der rekombinanten Domäne AmpKR1 (54 kDa).

M: Marker; W: Waschschrift; Denat.: Denaturierung; Rückf.: Rückfaltung; P: Pellet (nicht löslich); Ü: Überstand (löslich).

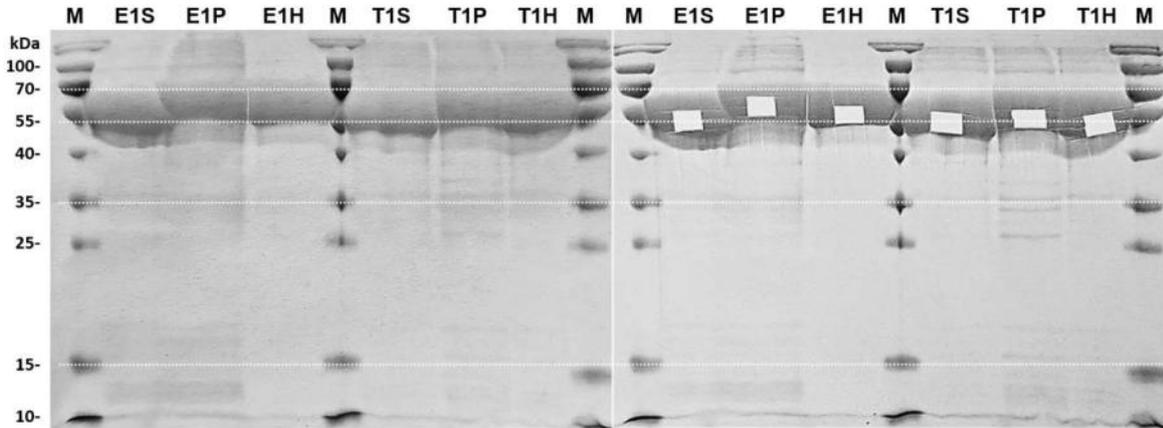


**Abbildung 8-16:** 12%-ige SDS-Gel der Proteinreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie der rückgefalteten, rekombinanten Domäne AmpKR1 (54 kDa).

M: Marker; DF: Durchfluss; W: Waschschrift; F: Proteinfraktion; NL: Nachlauf.

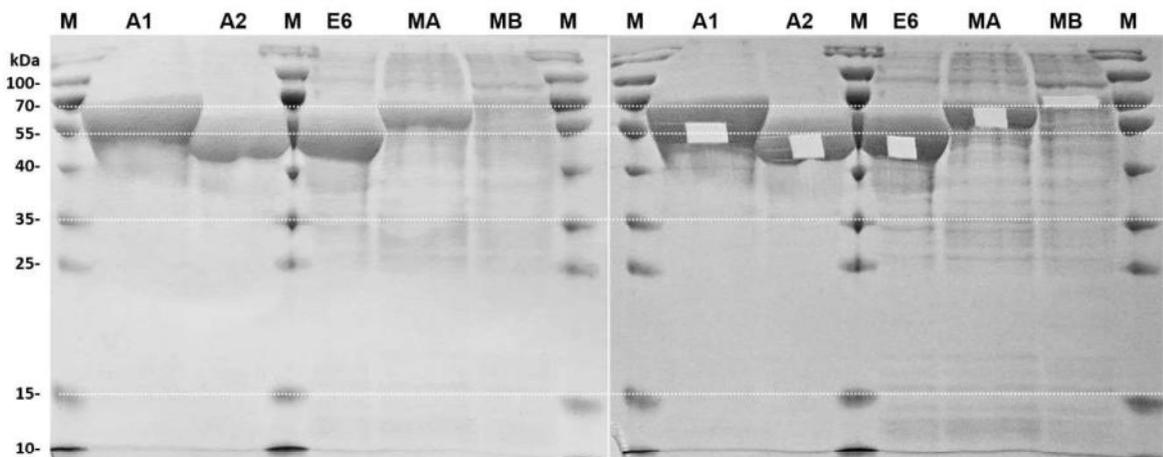
### 8.3.3 LCMS/MS-Proteinidentifizierung

#### SDS-Gele für LCMS/MS-Proben



**Abbildung 8-17: 12%-ige SDS-Gel für die LCMS/MS-Proteinidentifizierung.**

Rekombinanten KR-Domänen EryKR1 (E1S, 53 kDa), EryKR1-CP (E1P, 55 kDa), EryKR1-CH (E1H, 56 kDa), TyIKR1 (T1S, 53 kDa), TyIKR1-CP (T1P, 55 kDa), TyIKR1-CH (T1H, 56 kDa). M: Marker. Linke Seite: SDS-Gel nach Coomassie-Färbung; Rechte Seite: SDS-Gel nach Entnahme von Gelstücken für die LCMS/MS-Analyse.



**Abbildung 8-18: 12%-ige SDS-Gel für die LCMS/MS-Proteinidentifizierung.**

Rekombinanten KR-Domänen AmpKR1 (A1, 54 kDa), AmpKR2 (A2, 51 kDa), EryKR6 (E6, 49 kDa), MycKRA (MA, 57 kDa) und MycKRB (MB, 58 kDa). M: Marker. Linke Seite: SDS-Gel nach Coomassie-Färbung; Rechte Seite: SDS-Gel nach Entnahme von Gelstücken für die LCMS/MS-Analyse.

## LCMS/MS-Peptidanalysen

Die mittels LCMS/MS-Untersuchung identifizierten Peptide sind in grün hervorgehoben.

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
M	G	S	S	H	H	H	H	H	S
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
E	H	L	T	D	T	D	G	L	T
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
L	D	A	R	A	A	Q	R	L	V
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
Q	A	A	G	T	E	V	R	F	A
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Y	V	A	G	N	A	Y	L	S	A
A	R	L	L	A	D	R	A		

Abbildung 8-19: Aminosäuresequenz der rekombinanten KR-Domäne AmpKR1.

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
M	G	S	S	H	H	H	H	H	S
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
V	S	L	L	A	A	A	E	A	L
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
L	A	D	A	G	G	E	D	Q	L
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
A	A	D	R	E	A	L	A	E	L
410	420	430	440	450	460	470	480	490	
H	R	R	S	L	G	L	T	A	S

Abbildung 8-20: Aminosäuresequenz der rekombinanten KR-Domäne AmpKR2.

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
M	G	S	S	H	H	H	H	H	S
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
L	R	S	V	G	E	V	A	G	V
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
A	E	L	A	R	H	L	A	A	V
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
R	T	V	A	A	C	D	V	T	D
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Y	L	D	G	L	A	Q	R	R	S
Q	A	A	E	P	R				

Abbildung 8-21: Aminosäuresequenz der rekombinanten KR-Domäne EryKR1(-S).

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
M	G	S	S	H	H	H	H	H	S
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
L	R	S	V	G	E	V	A	G	V
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
A	E	L	A	R	H	L	A	A	V
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
R	T	V	A	A	C	D	V	T	D
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Y	L	D	G	L	A	Q	R	R	S
Q	A	A	E	P	R	A	N	S	S

Abbildung 8-22: Aminosäuresequenz der rekombinanten KR-Domäne EryKR1-H.

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMGS	HMSTEVDEVSALRYRIEWRPTGAGEP	ARLDGTLVAKYAGTADE	STAAREALESAGARVRELV	DARCGRDELAER					
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
LRSVGEVAGVLSLLAVDEAEPEEA	PLALASLADTLSLVQAMVSAELGC	PLWTVTESAVATGPFPERVNR	NAAHGALWGVGRVIALENPA	VWGGLVDVPAGSV					
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
AELARHLAAVVS	GGAGEDQLALRADGVYGR	RWRRAAAPATDDEWKPTGT	VLVTGGTGGVGGQIARW	LARRGAPHLLLVS	SRGPDADGAGELVAE	LEALGA			
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
RTTVAACDVT	DRESVRELLGGIGDDVPLSA	VPHAAATLDDGTVDTLT	GERIERASRAKVLGARN	LHELTRRELDLTA	FVLFSSPASAFGAP	GLGGYPGNA			
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
YLDGLAQRRSDGLPATAVA	WGTWAGSGMAEGPVADR	FRRHGVIEMPPETACRAL	QNALDRAEVCPIV	IDVWRDRFL	LAYTAQRPT	RLFDEIDDARRA	AP		
510	520	530							
QAAAEPRFELRRQACGR	TRAPPPPLRSGC								

Abbildung 8-23: Aminosäuresequenz der rekombinanten KR-Domäne EryKR1-P.

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMAD	SRRYVDWRPLATPVDLEGGFLVH	GSAPESLTS	SAVEKAGGRVVP	VASADREALAAALREV	PGEVAGVLSVHT	GAATH			
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
LALHQSLGEAGVRAPLWLVT	SRAVALGESEPVDPQAMVWGL	GRVMGLETPERW	GGLVDLPAEPAPGD	GEAFVACL	GADGHEDQVA	IRDHARYGRRLVRA			
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
PLGTRESSWE	PAGTALVTGGTALGGHVARHL	LARCQVEDLVLSR	RGVDPAGAAE	LEAEALVALGAKTT	ITACDVADREQL	SKLLEELRG	QGRPVRTVVHT		
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
AGVPESRPLHEIGELESVCAAK	VTGARLLDELCPDAET	FVLFSSGAGVWGSANL	GAYSANAYLDAL	AHRRRAE	GRAATSV	AWGAWAGEGMAT	GDLEGLT		
410	420	430	440	450	460	470			
RRGLRMPAPERAIRALHQAL	DNGDTCVSIADVDWER	FAVGFTAARPR	LDELVTPAVGAV	PAVQAAPAREMT					

Abbildung 8-24: Aminosäuresequenz der rekombinanten KR-Domäne EryKR6.

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMAQ	NVESRFWEAVEREDVDGLADSI	GV	TASAMQTVLPALSSW	RRAERTQSELD	SWRYQV	TWLS	SSPATPSSIT	LSGIWLLI	
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
VPSELAKTDPVIGCAAAL	EAHGALVTIITIFEPDFNR	SILMGASLKDIGSHIS	GVISF	LGHSEFSDSGAVK	TNLVQAMG	DVHLDVPLWCL	TQGA	VSI	
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
ADDLIRCSAALVWGLGRV	VVALEHPSWGLVDLPE	SPDDAAWERL	CALLAQPTDEDQ	FAIRPSGVFL	RRLIHAPAT	TTSKSSTAWA	PRGTVLIT	GGTGA	
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
LGAHVARWLAHKYESVD	LLLSRRGMAADGATEL	VDDLR	TAGASVTVHAC	DVTDRTSVEAAI	AGKSLDAV	FHLAGR	HQPTLLTELEDES	SFDELAPKVHG	
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
AQVLSDITSNLTL	SAFVMPSSVAGI	WGKSKGAYAAANAF	LDSLAEKRRTL	GLPATSV	AWGLWAGG	MGDRPSASGL	NLGLKMS	SADLAVQALSDA	IDR
510	520	530							
PQATLTVASVNWDR	FRYPTFALARPR	PLHEITEVMAYRES							

Abbildung 8-25: Aminosäuresequenz der rekombinanten KR-Domäne MycKRA.

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTH	ATRLRVRLTRTGADAITVHT	SDTTGAPVAI	IDSLITRPLTTAT	GSAPATTAAGLLHLS	SWPPHPDPTT	TDTD	TD	TDALR	
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
YQVIAEPTQQLPRYLHDL	HTSTDLHTSTTEADVVV	WPVVPVPSNEELQAH	QASDTAVSSR	IHTLRQTLTVVQ	DWLTHPDTT	GTR	LVI	TRHG	VSTSAHD
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
VPDLAAAVWGLIRSAQNE	HPRGRTLLD	DDNTNSDTL	TALTLP	TRENQLAIR	DDTIH	IPRLTRH	SDGAL	TAPVVVD	PEGTVLITGGTGLGALFAEH
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
LVSAGVRLHLLTSRRG	PQAHGATD	LQRLTDLGAHVT	ITACDI	SDPEALAA	LVNSVPTQ	HRLTAVVHTAA	VLADTPVTELT	GDQLDQVL	APKIDA
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
HQLTYEHNLSAFIMF	SSMAGMIGSP	QGNAAANTAL	DALADYR	HRLGLPAT	SLAWGYWQ	THTGLTAHL	TDVDL	ARMTRGLMP	IATSHGLALF
510	520	530							
GQPVSI	PAPINTHTLAR	HARDNTLAPIL	SALITTPRRRAA						

Abbildung 8-26: Aminosäuresequenz der rekombinanten KR-Domäne MycKRB.

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMSP	TDAWRYRV	TWKALTES	SPVRPHSIGRCLL	VAPPTD	GELLDGLTTVLS	ERGASVAR	LEVPI	GARRAE	VAELLPKPSME
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
SAGEENTVVSLLGLVP	STDAVRTSIAL	LQAVSDIGV	PAARVWAL	TRAVAVVP	GETPQD	AGAQLWGF	GRVAALE	LPDIW	GGLIDLPE
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
PPQTPERLFPQTPNRR	ALEAAVLACRDGED	QVAVRASGIY	GRRVSR	AAAAGAA	SWQPSGT	VLITG	GMGAI	GRRLAR	LLAEGAER
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
AELAEELRGHC	EVVHAACDVAER	DALAAALVTAY	PPNAV	FHTAGIL	DDAVID	TLSPES	FETVRG	AKVCGAEL	LHQLTADIKGLDA
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
QGAYAAANAAL	DALAEERRRAAGL	PATSV	AWGLWGGG	MAAGAGEESL	SRRGLRAMD	PDAAVD	ALLGAMGR	NDVCVT	VVDVDERFAPAT
510	520								
VPEAREAL	TAANSSVDK	LAAALEHHHHH							

Abbildung 8-27: Aminosäuresequenz der rekombinanten KR-Domäne TylKR1(-S).

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
M	G	S	S	H	H	H	H	S	S
G	L	V	P	R	G	S	H	M	S
P	T	D	A	W	R	Y	R	V	T
K	A	L	T	E	S	S	P	V	R
P	H	S	I	G	R	C	L	L	V
A	P	P	T	D	G	E	L	L	D
G	L	T	T	V	L	S	E	R	G
A	S	V	A	R	L	E	V	P	I
G	A	R	R	A	E	V	A	E	L
L	K	P	S	M	E				
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
S	A	G	E	N	T	T	V	S	L
L	L	G	L	V	P	S	T	D	A
V	R	T	S	I	A	L	L	Q	A
V	S	D	I	G	V	P	A	A	R
V	W	A	L	T	R	R	A	V	V
P	G	E	T	P	Q	D	A	G	A
Q	L	W	G	F	G	R	V	A	A
L	P	D	I	W	G	L	I	D	L
P	E	T	A	E	L	T	R	T	P
P	E	T	S	Q					
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
P	P	Q	T	P	E	R	L	P	Q
T	P	N	R	R	A	L	E	L	A
A	A	V	L	A	A	V	L	A	G
R	D	G	E	D	Q	V	A	V	R
A	S	G	I	G	R	R	V	S	R
A	A	A	A	A	A	A	A	A	S
W	Q	P	S	G	T	V	L	I	T
G	M	G	A	I	G	R	R	L	A
R	L	A	R	L	A	E	G	A	E
R	L	V	L	T	S	R	R	G	P
E	A	P	G	A					
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
A	E	L	A	E	L	R	G	H	C
E	V	V	H	A	A	C	D	V	A
E	R	D	A	L	A	L	V	T	A
Y	P	P	N	A	V	F	H	T	A
G	I	L	D	D	A	V	I	D	T
L	S	P	E	S	F	E	T	V	R
G	A	K	V	C	G	A	E	L	L
H	Q	L	T	A	D	I	K	G	L
D	A	F	V	L	F	S	S	V	T
G	T	W	G	N	A				
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Q	G	A	A	A	N	A	L	D	A
A	E	R	R	R	A	A	G	L	P
A	T	S	V	A	W	G	L	W	G
G	G	G	M	A	A	G	A	G	E
E	S	L	S	R	R	G	L	R	A
M	P	D	A	A	V	D	A	L	L
G	A	M	G	R	N	D	V	C	V
T	V	V	D	V	D	W	E	R	F
A	P	A	T	N	A	I	R	P	G
R	L	F	D	T					
510	520								
V	P	E	A	R	E	A	L	T	A
A	A	N	S	S	V	D	K	L	A
A	L	E	H	H	H	H	H	H	H

Abbildung 8-28: Aminosäuresequenz der rekombinanten KR-Domäne TyIKR1-H.

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
M	G	S	S	H	H	H	H	S	S
G	L	V	P	R	G	S	H	M	S
P	T	D	A	W	R	Y	R	V	T
K	A	L	T	E	S	S	P	V	R
P	H	S	I	G	R	C	L	L	V
A	P	P	T	D	G	E	L	L	D
G	L	T	T	V	L	S	E	R	G
A	S	V	A	R	L	E	V	P	I
G	A	R	R	A	E	V	A	E	L
L	K	P	S	M	E				
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
S	A	G	E	N	T	T	V	S	L
L	L	G	L	V	P	S	T	D	A
V	R	T	S	I	A	L	L	Q	A
V	S	D	I	G	V	P	A	A	R
V	W	A	L	T	R	R	A	V	V
P	G	E	T	P	Q	D	A	G	A
Q	L	W	G	F	G	R	V	A	A
L	P	D	I	W	G	L	I	D	L
P	E	T	A	E	L	T	R	T	P
P	E	T	S	Q					
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
P	P	Q	T	P	E	R	L	P	Q
T	P	N	R	R	A	L	E	L	A
A	A	V	L	A	A	V	L	A	G
R	D	G	E	D	Q	V	A	V	R
A	S	G	I	G	R	R	V	S	R
A	A	A	A	A	A	A	A	A	S
W	Q	P	S	G	T	V	L	I	T
G	M	G	A	I	G	R	R	L	A
R	L	A	R	L	A	E	G	A	E
R	L	V	L	T	S	R	R	G	P
E	A	P	G	A					
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
A	E	L	A	E	L	R	G	H	C
E	V	V	H	A	A	C	D	V	A
E	R	D	A	L	A	L	V	T	A
Y	P	P	N	A	V	F	H	T	A
G	I	L	D	D	A	V	I	D	T
L	S	P	E	S	F	E	T	V	R
G	A	K	V	C	G	A	E	L	L
H	Q	L	T	A	D	I	K	G	L
D	A	F	V	L	F	S	S	V	T
G	T	W	G	N	A				
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Q	G	A	A	A	N	A	L	D	A
A	E	R	R	R	A	A	G	L	P
A	T	S	V	A	W	G	L	W	G
G	G	G	M	A	A	G	A	G	E
E	S	L	S	R	R	G	L	R	A
M	P	D	A	A	V	D	A	L	L
G	A	M	G	R	N	D	V	C	V
T	V	V	D	V	D	W	E	R	F
A	P	A	T	N	A	I	R	P	G
R	L	F	D	T					
510	520	530							
V	P	E	A	R	E	A	L	T	A
A	A	E	F	E	L	R	R	Q	A
C	G	R	T	R	A	P	P	P	P
L	R	S	G	C					

Abbildung 8-29: Aminosäuresequenz der rekombinanten KR-Domäne TyIKR1-CP.

---

## 8.4 Enzymaktivitätstests und –Kinetiken

Tabelle 8-3: Messdaten für die Kalibrierung der NADPH-Absorption in HEPES-Puffer mit 5  $\mu\text{M}$  TyIKR1.

c (NADPH) [ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	Absorption [AE]	$\Delta$ Abs. [AE]
0.00	0.000	0.032
0.51	0.688	0.159
0.61	0.756	0.086
0.71	0.956	0.088
0.81	1.191	0.046
0.91	1.304	0.042
1.02	1.517	0.014
1.12	1.734	0.034
1.52	2.393	0.109
2.03	3.167	0.140
3.05	3.517	0.005
4.06	3.570	0.010

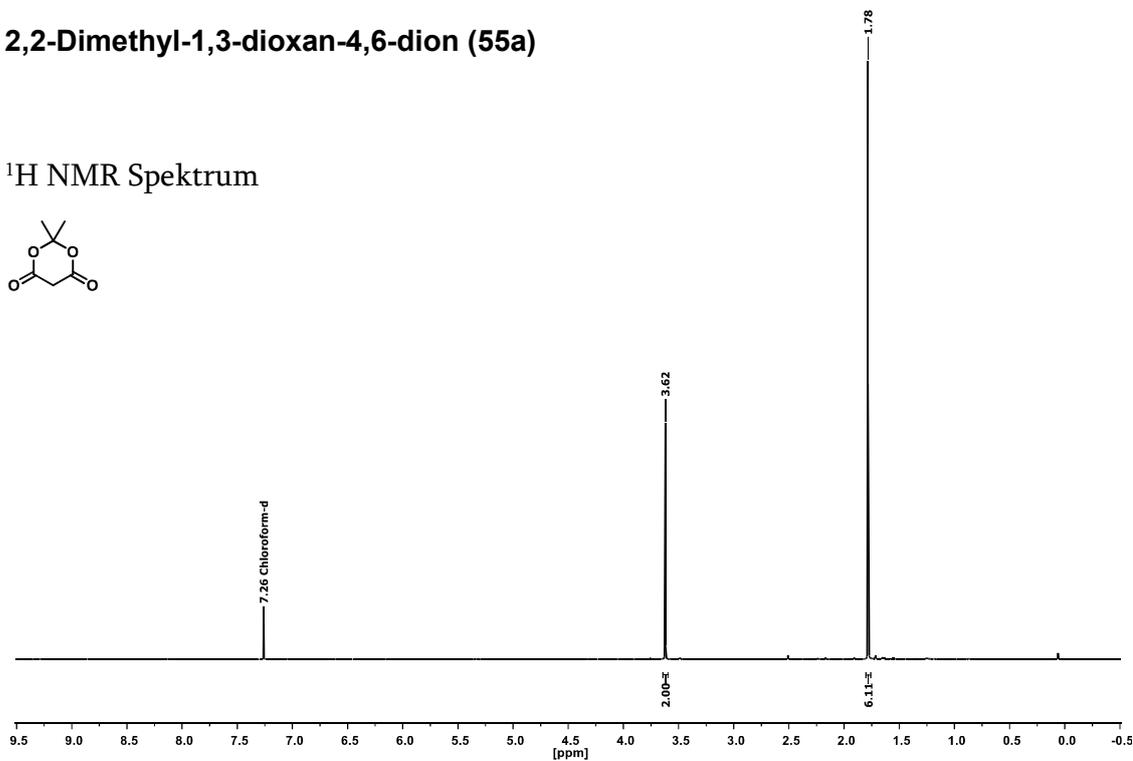
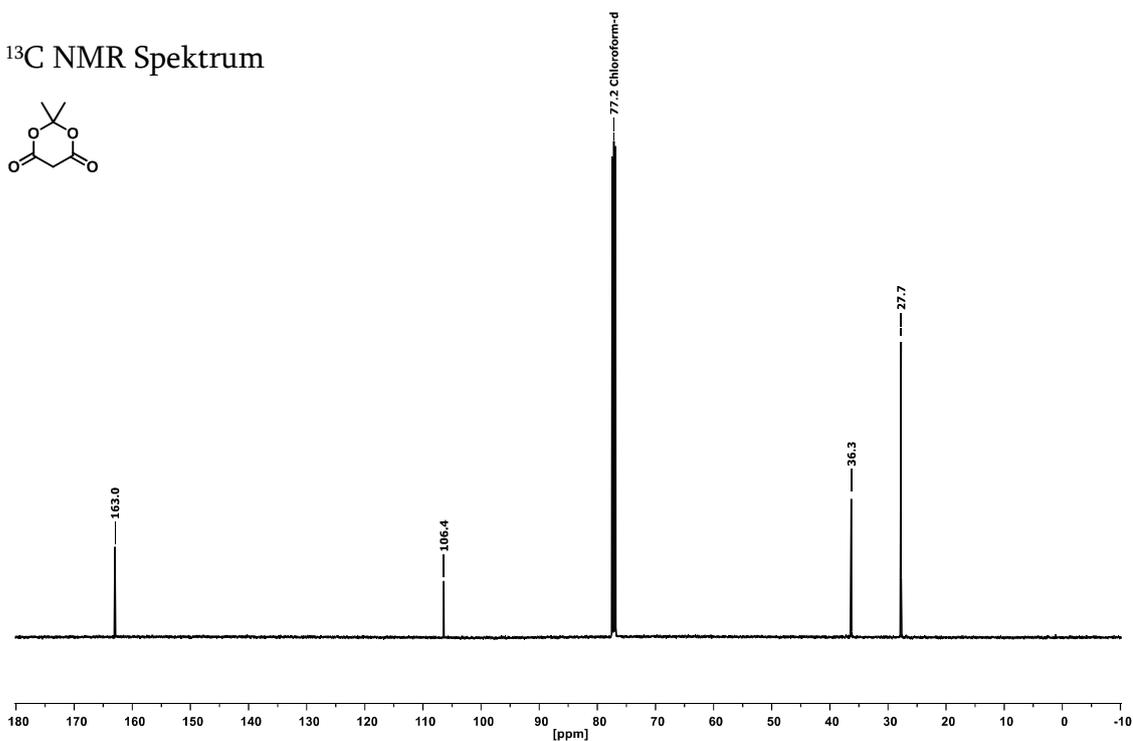
Tabelle 8-4: Messdaten der MICHAELIS-MENTEN-Kinetik für die enzymatische Reduktion von  $\kappa$ -EMN durch EryKR1 mit NADPH.

c ( $\kappa$ -EMN) [mM]	v [ $\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	$\Delta$ v [ $\text{mM}\cdot\text{s}^{-1}$ ]
10	0.2160	0.0048
20	0.3380	0.0014
30	0.4006	0.0017
40	0.4619	0.0054
50	0.4886	0.0031

8.5  $^1\text{H}$  NMR- und  $^{13}\text{C}$  NMR-Spektren

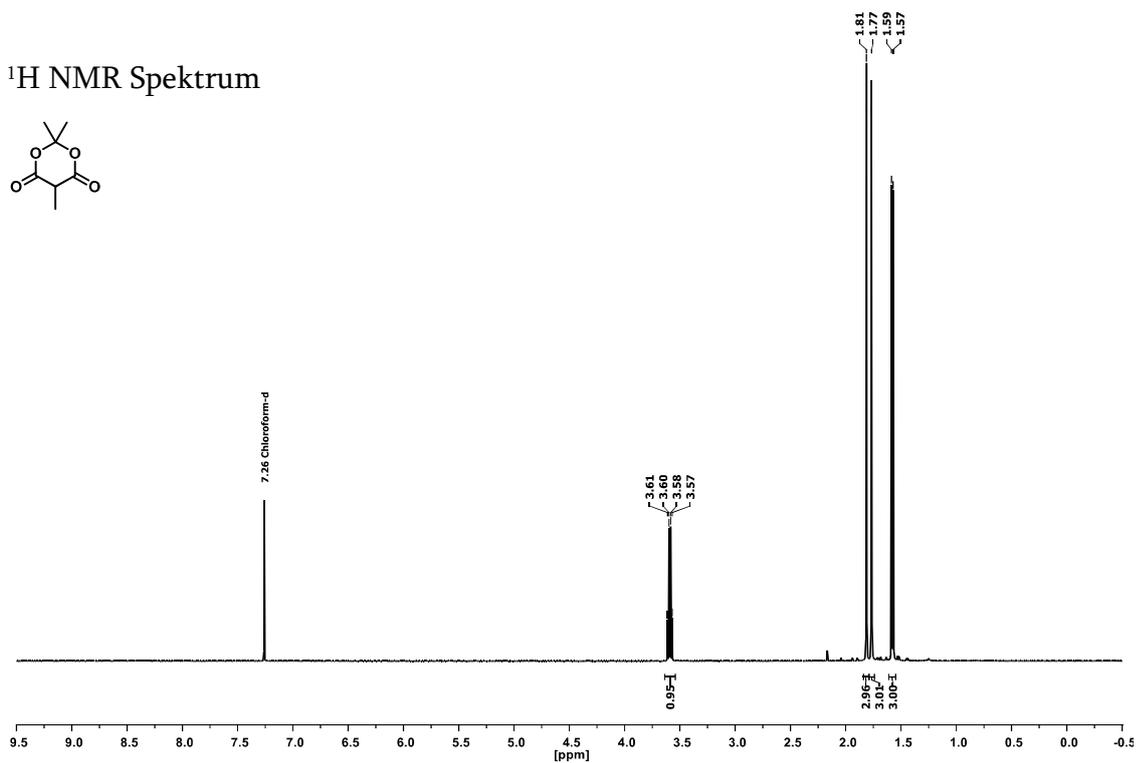
## 8.5.1 Malonsäurehalbthioester und Vorläufer

## 2,2-Dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (55a)

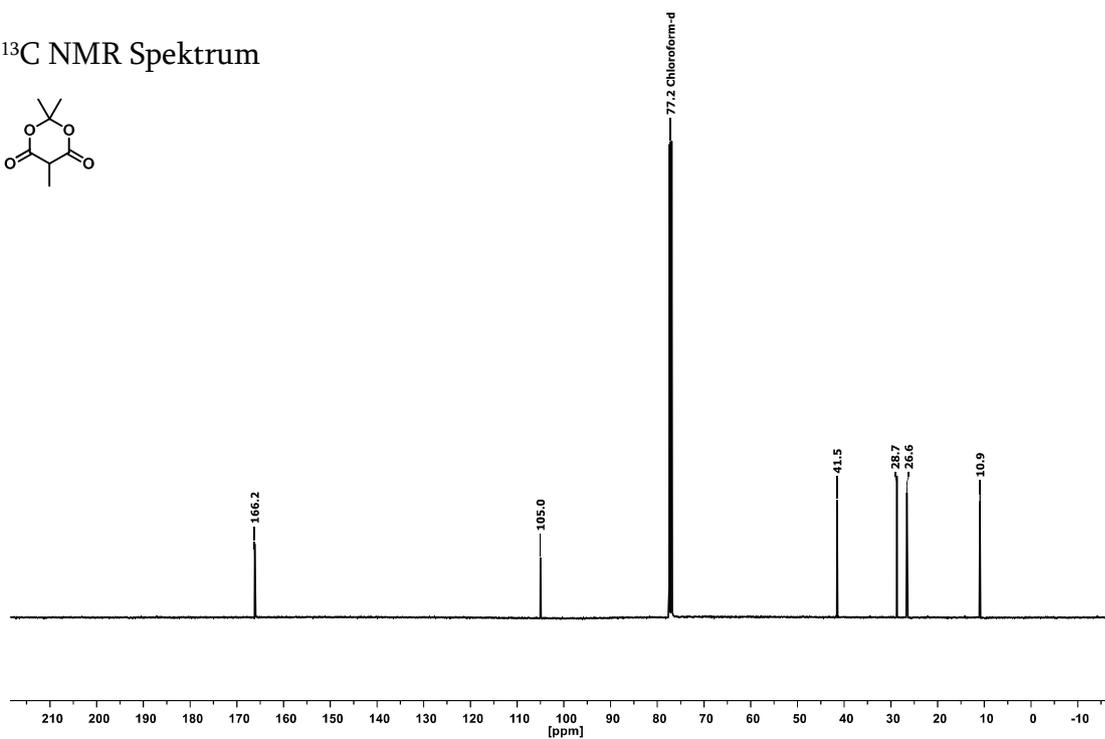
 $^1\text{H}$  NMR Spektrum $^{13}\text{C}$  NMR Spektrum

## 2,2,5-Trimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (55b)

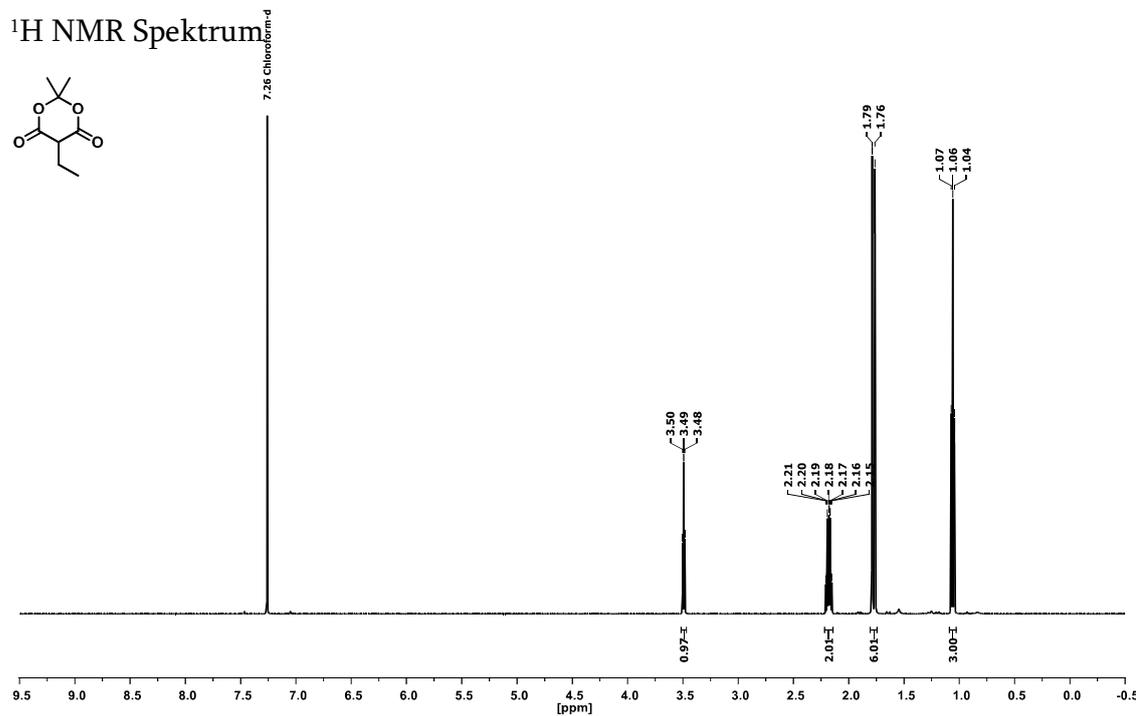
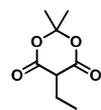
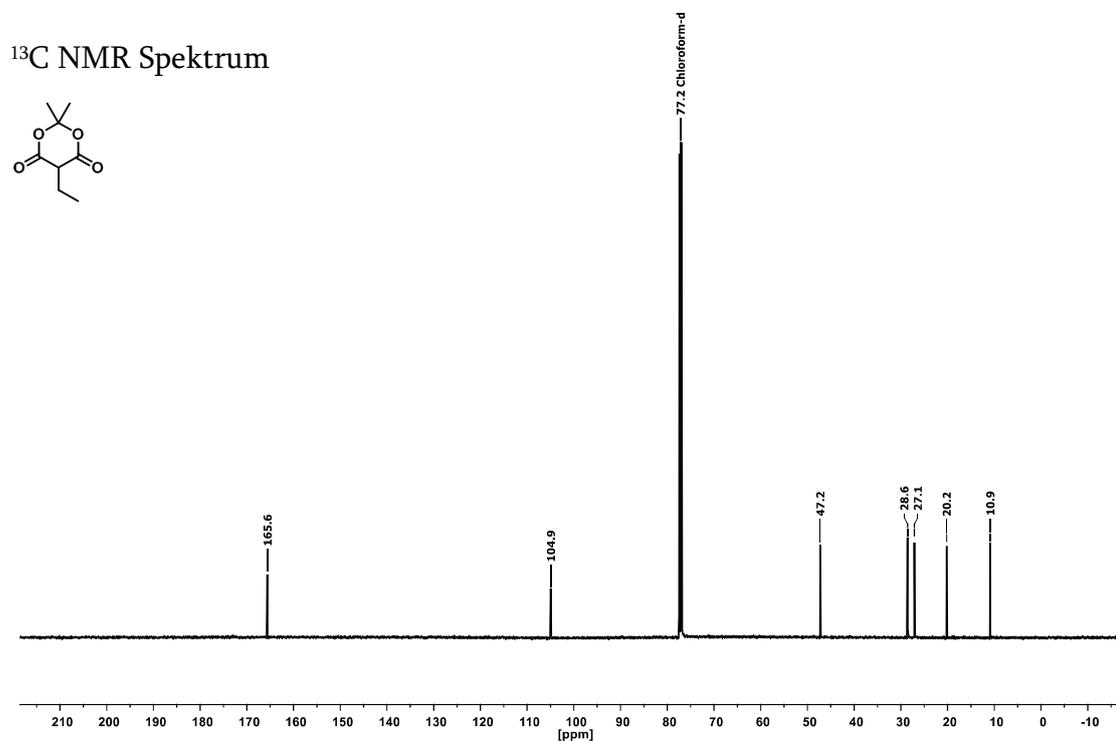
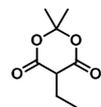
$^1\text{H}$  NMR Spektrum



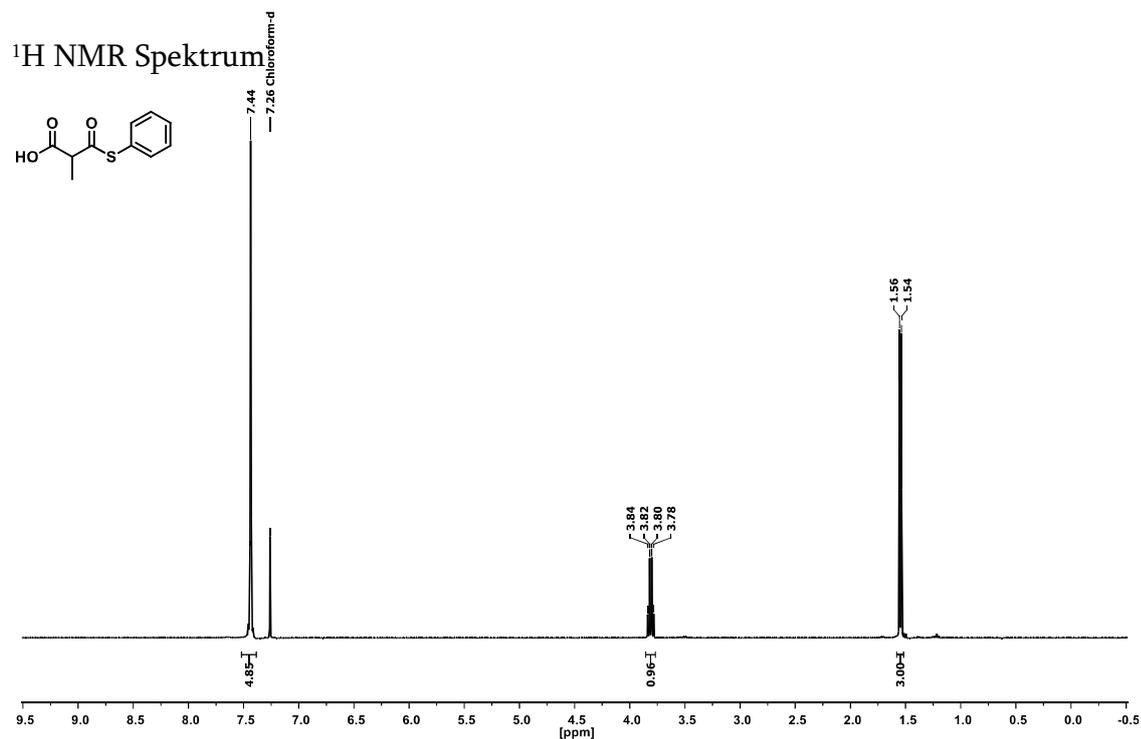
$^{13}\text{C}$  NMR Spektrum



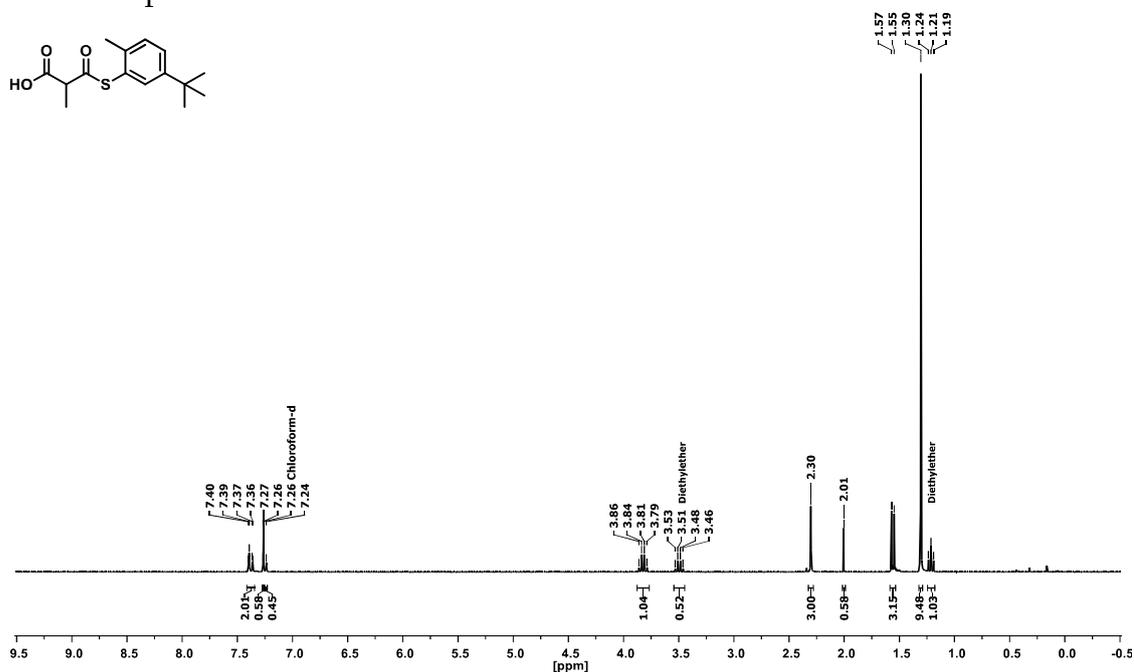
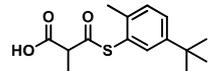
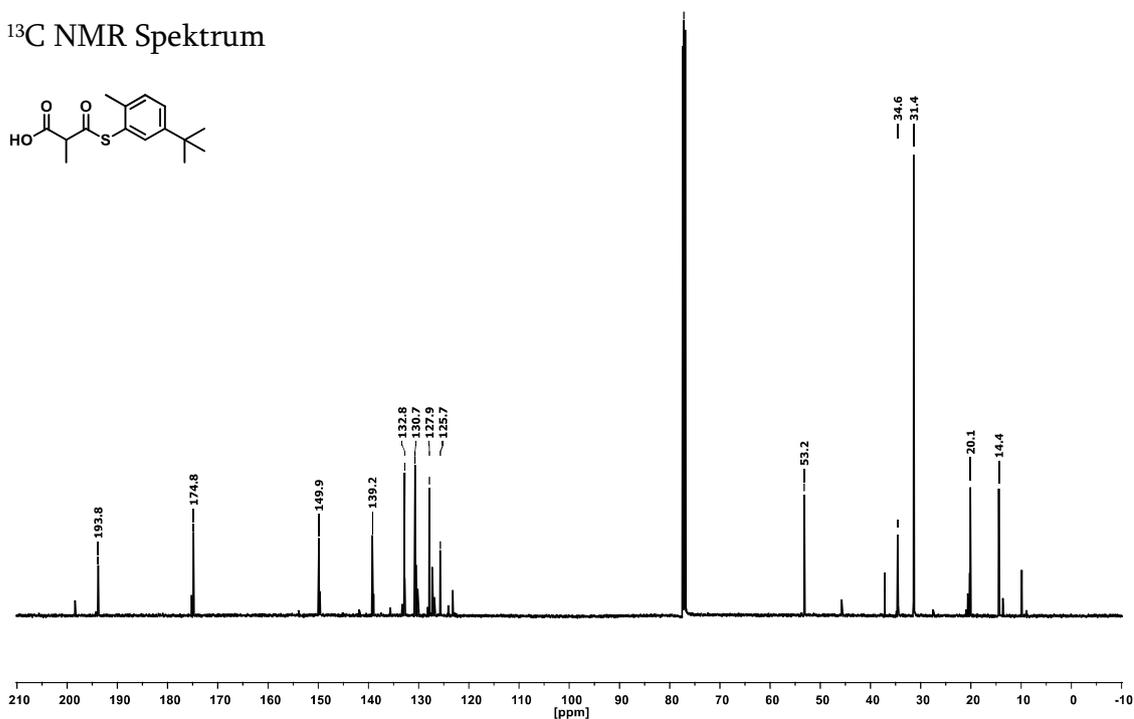
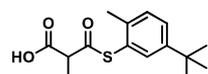
## 5-Ethyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (55c)

<sup>1</sup>H NMR Spektrum<sup>13</sup>C NMR Spektrum

## 2-Methyl-3-oxo-3-(phenylthio)propansäure (53)

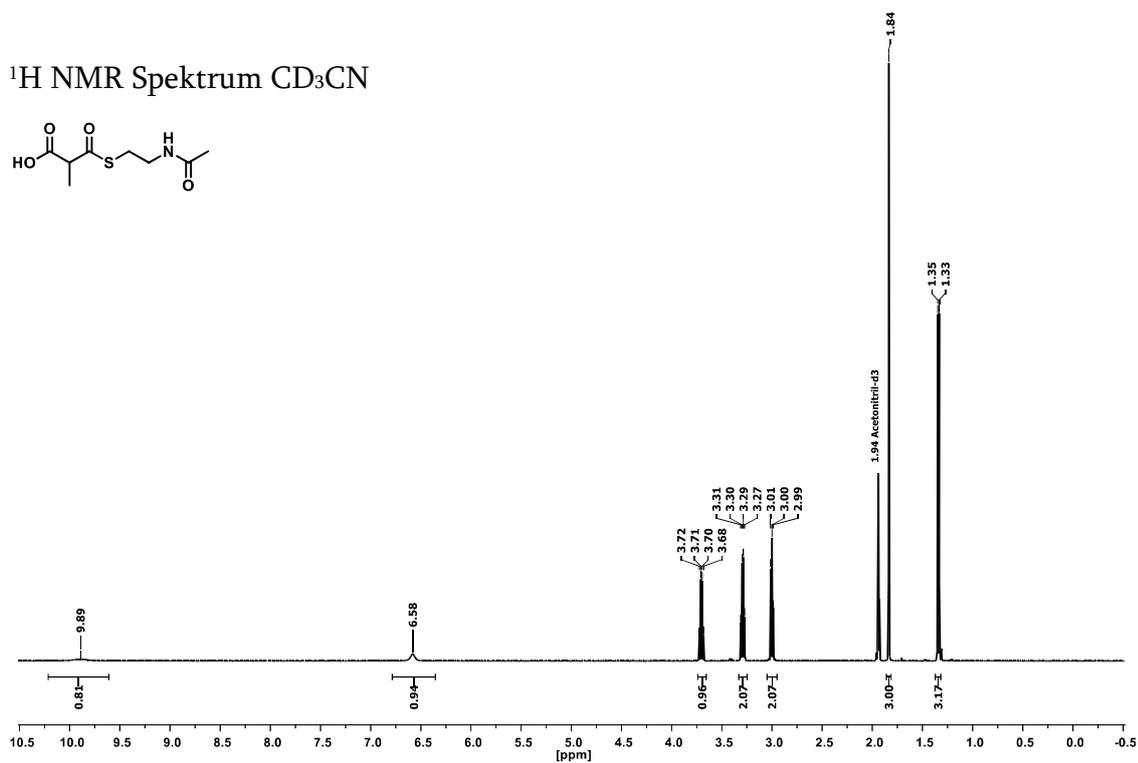
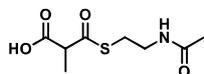


## <sup>13</sup>C NMR Spektrum

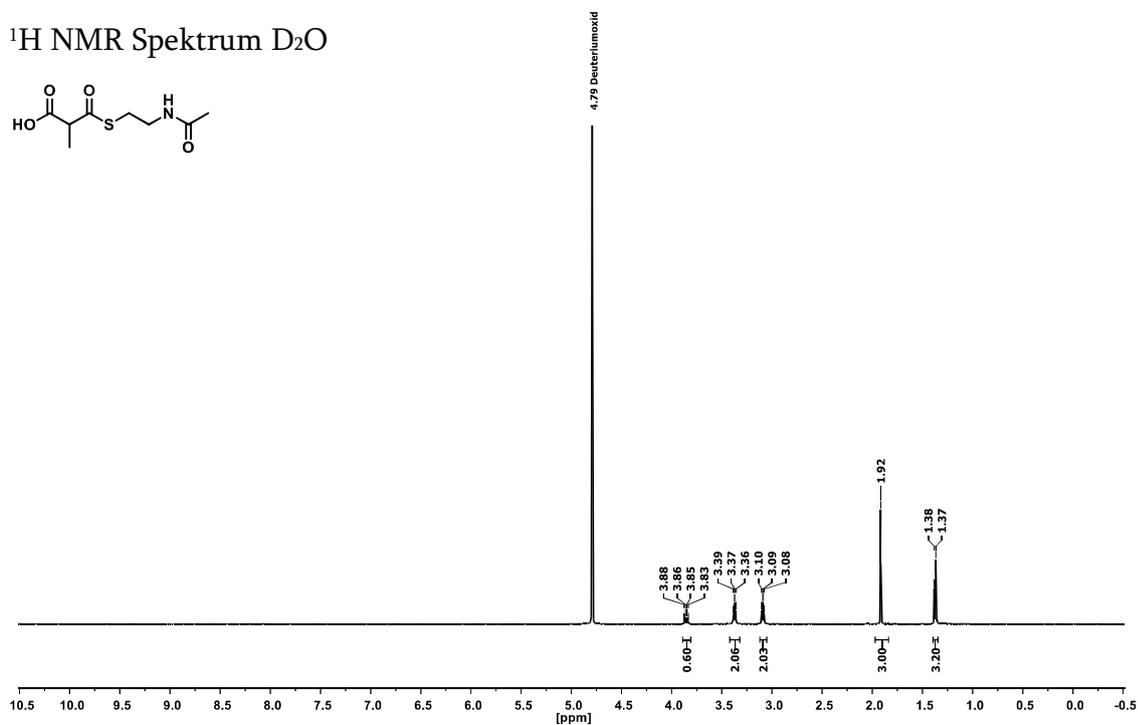
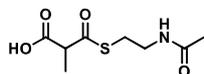
3-((5-*tert*-Butyl-2-methylphenyl)thio)-2-methyl-3-oxopropansäure (62) $^1\text{H}$  NMR Spektrum $^{13}\text{C}$  NMR Spektrum

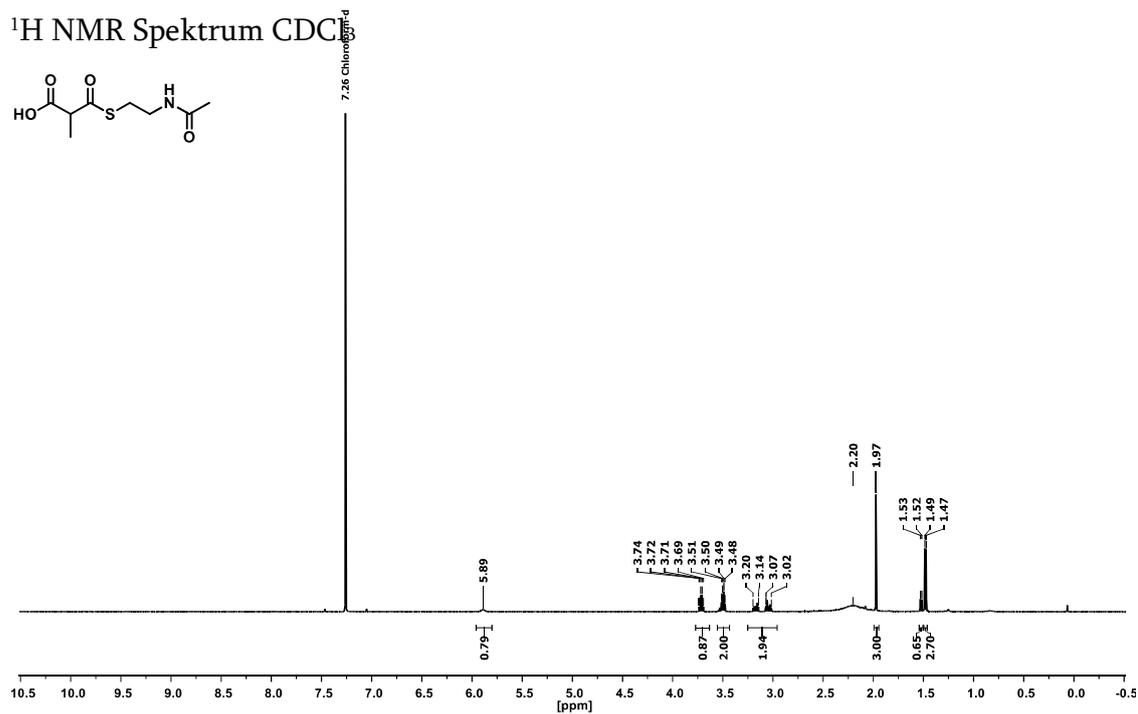
## 2-Methyl-3-oxopropionsäure(SNAC)halbthioester (50)

$^1\text{H}$  NMR Spektrum  $\text{CD}_3\text{CN}$

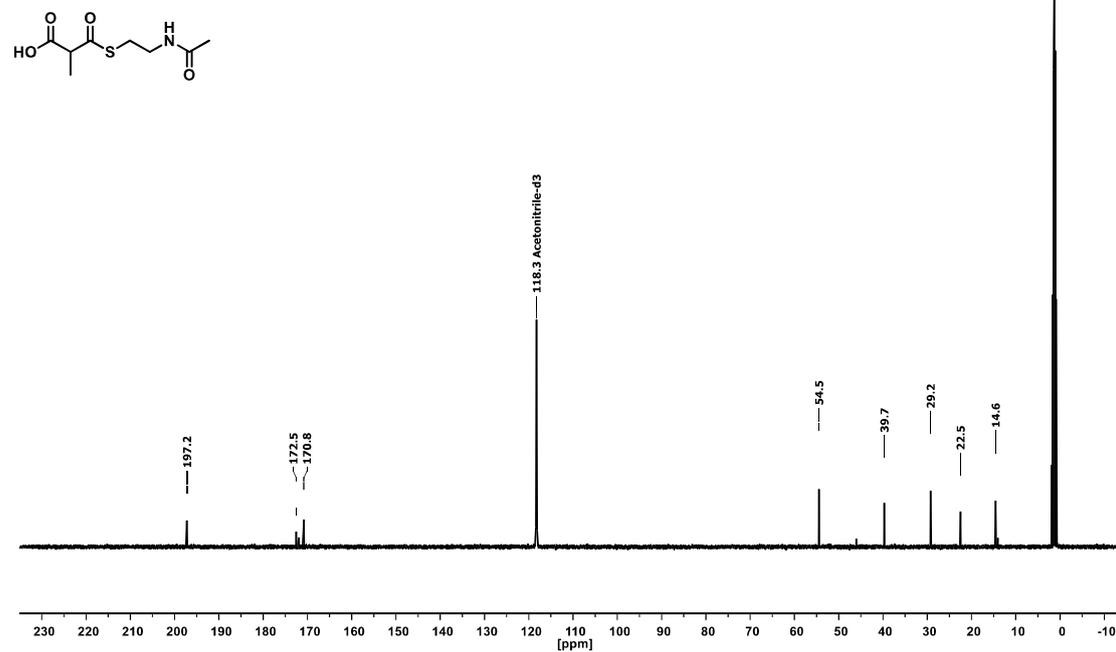


$^1\text{H}$  NMR Spektrum  $\text{D}_2\text{O}$



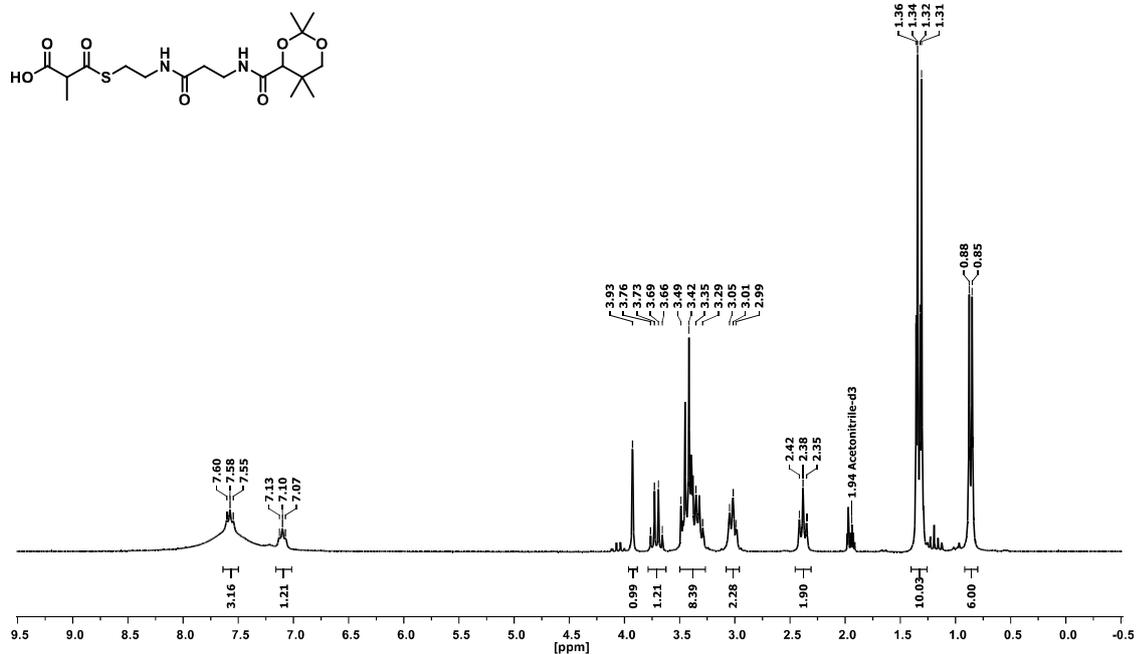


<sup>13</sup>C NMR Spektrum CD<sub>3</sub>CN

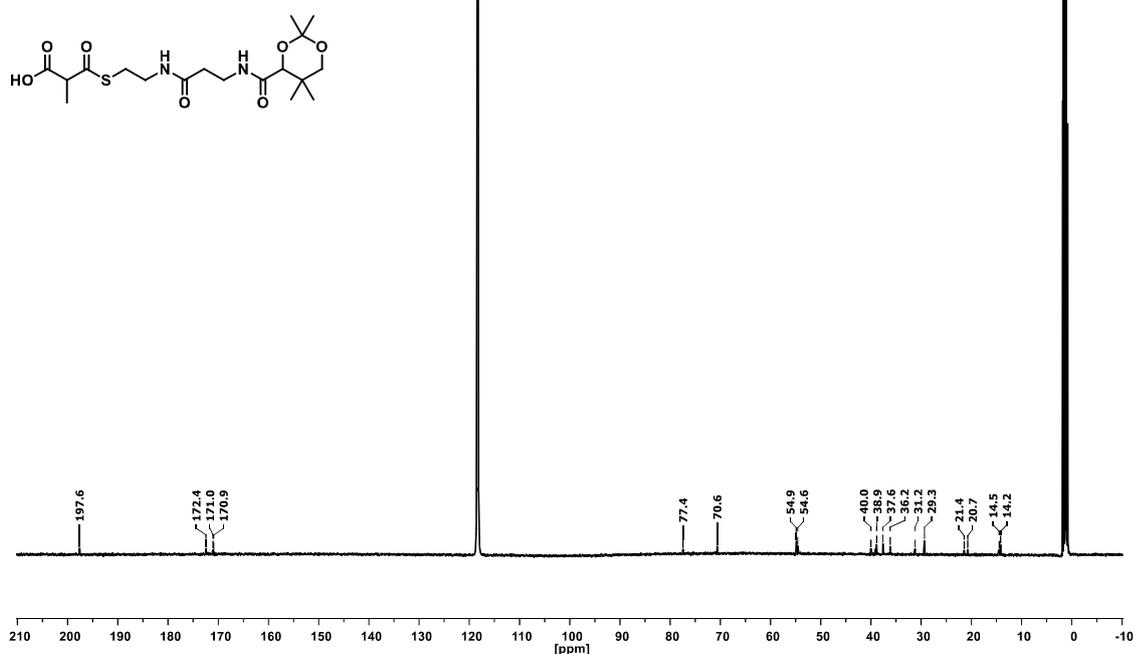


**2-Methyl-3-oxo-3-((2-(3-(2,2,5,5-tetramethyl-1,3-dioxan-4-carboxamido)propanamido)ethyl)thio)propanoic acid (64)**

<sup>1</sup>H NMR Spektrum CD<sub>3</sub>CN

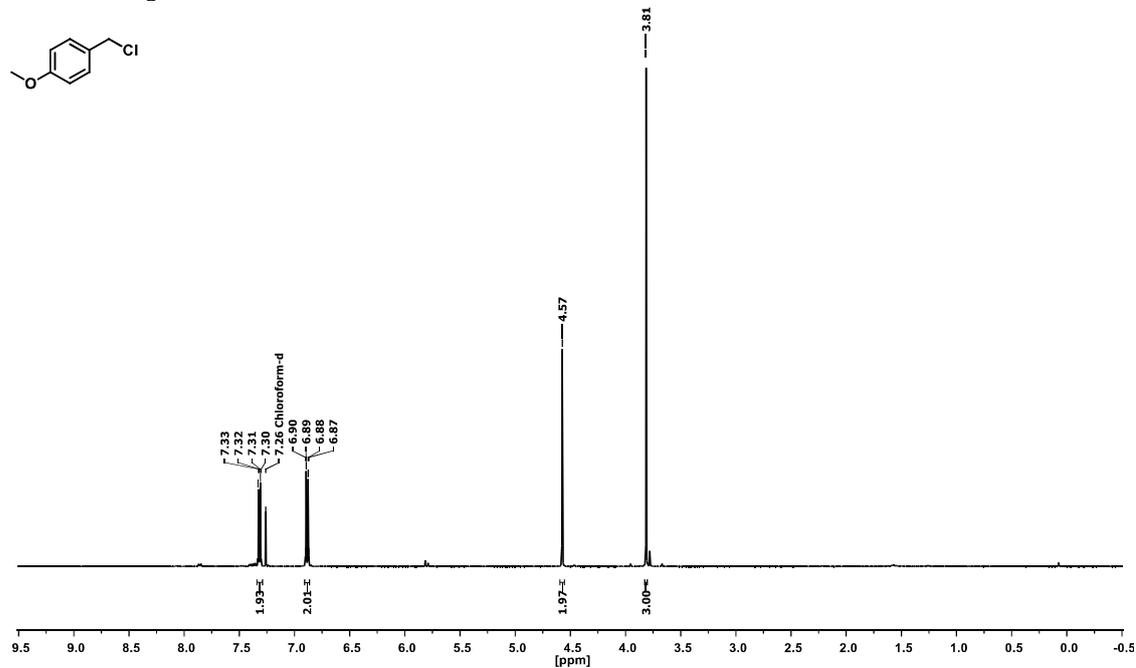
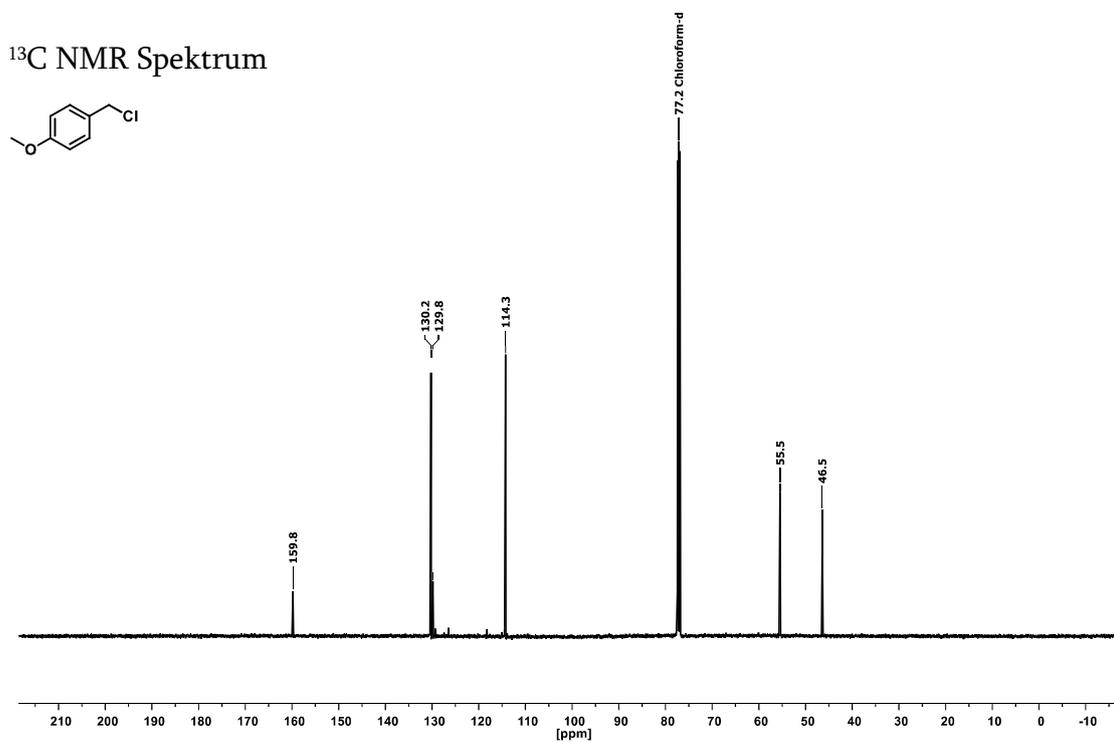


<sup>13</sup>C NMR Spektrum CD<sub>3</sub>CN



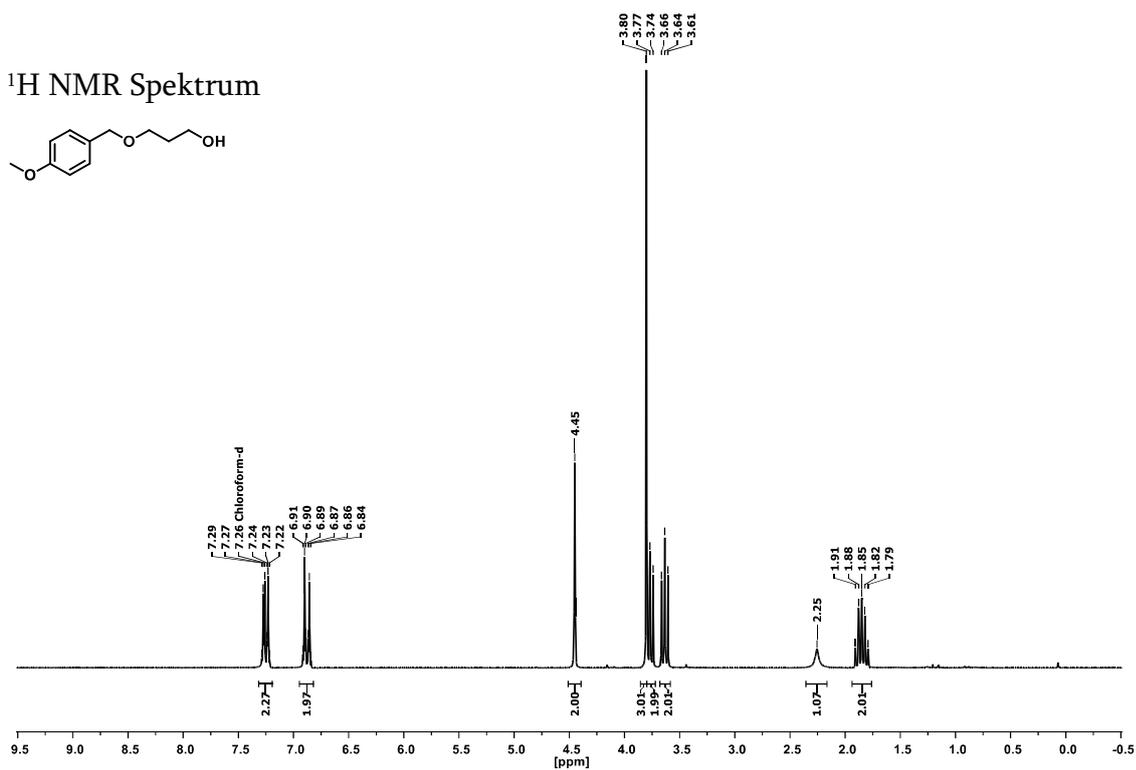
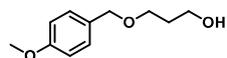
## 8.5.2 Keto-Fragmente/Carbonsäuren und Vorläufer

## 4-Methoxybenzylchlorid (164)

<sup>1</sup>H NMR Spektrum<sup>13</sup>C NMR Spektrum

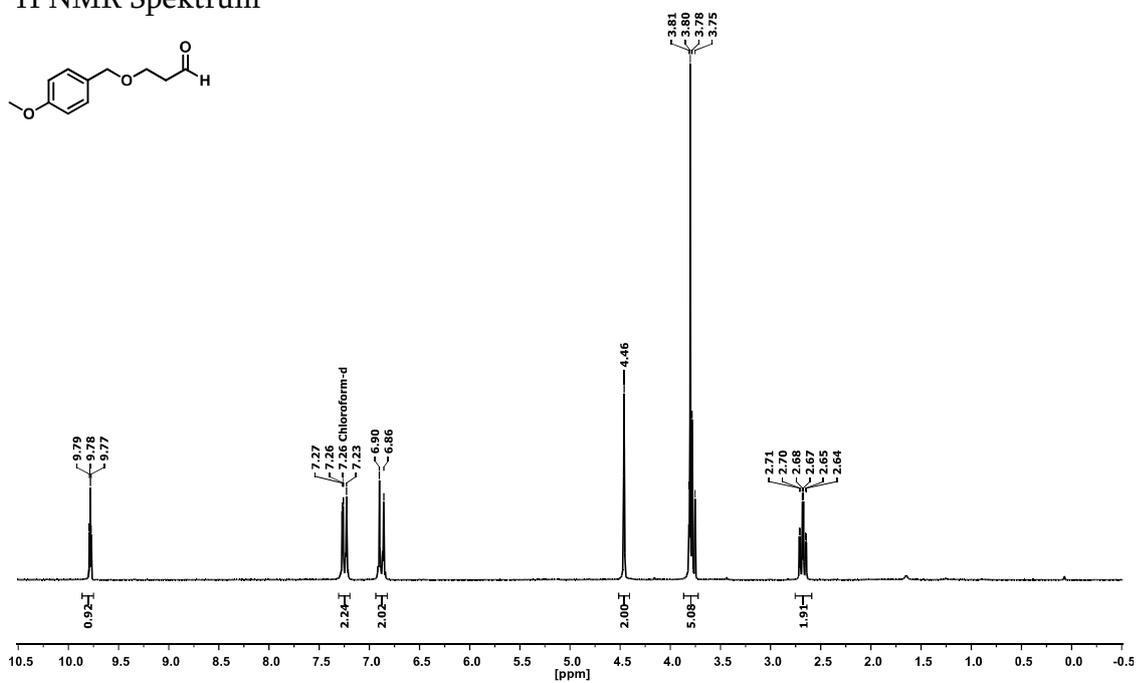
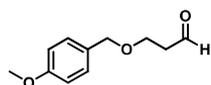
### 3-((4-Methoxybenzyl)oxy)-1-propanol (74)

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

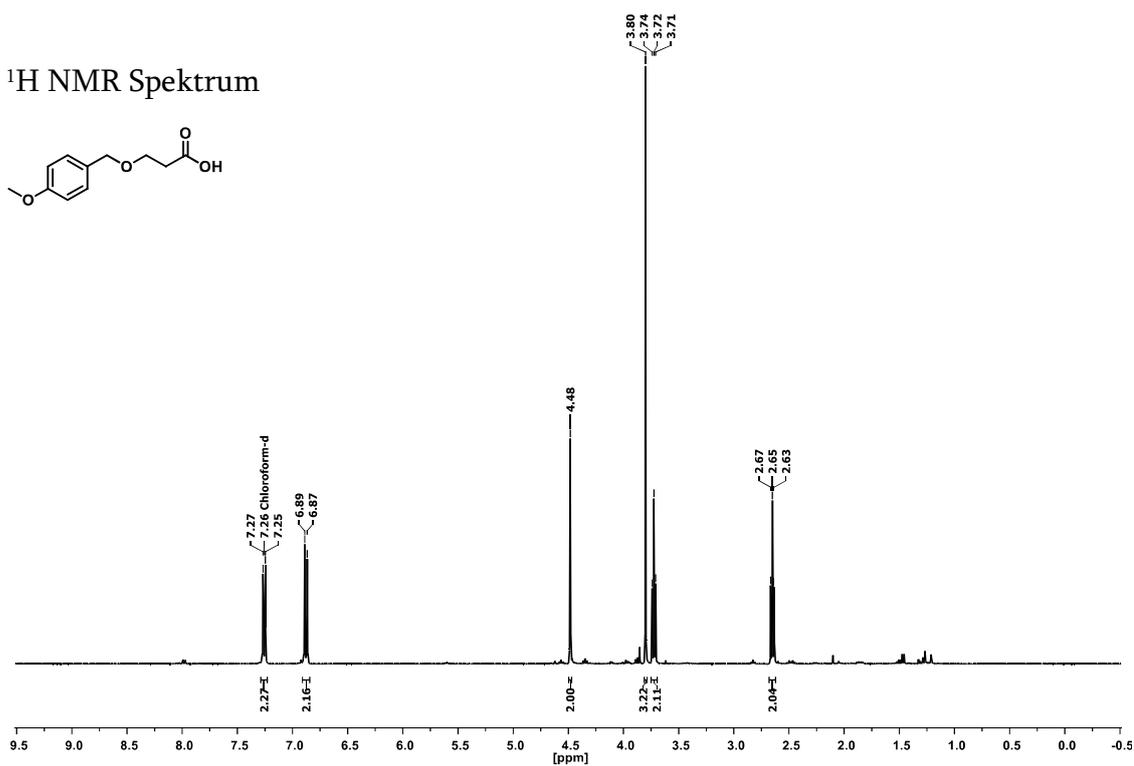
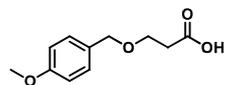
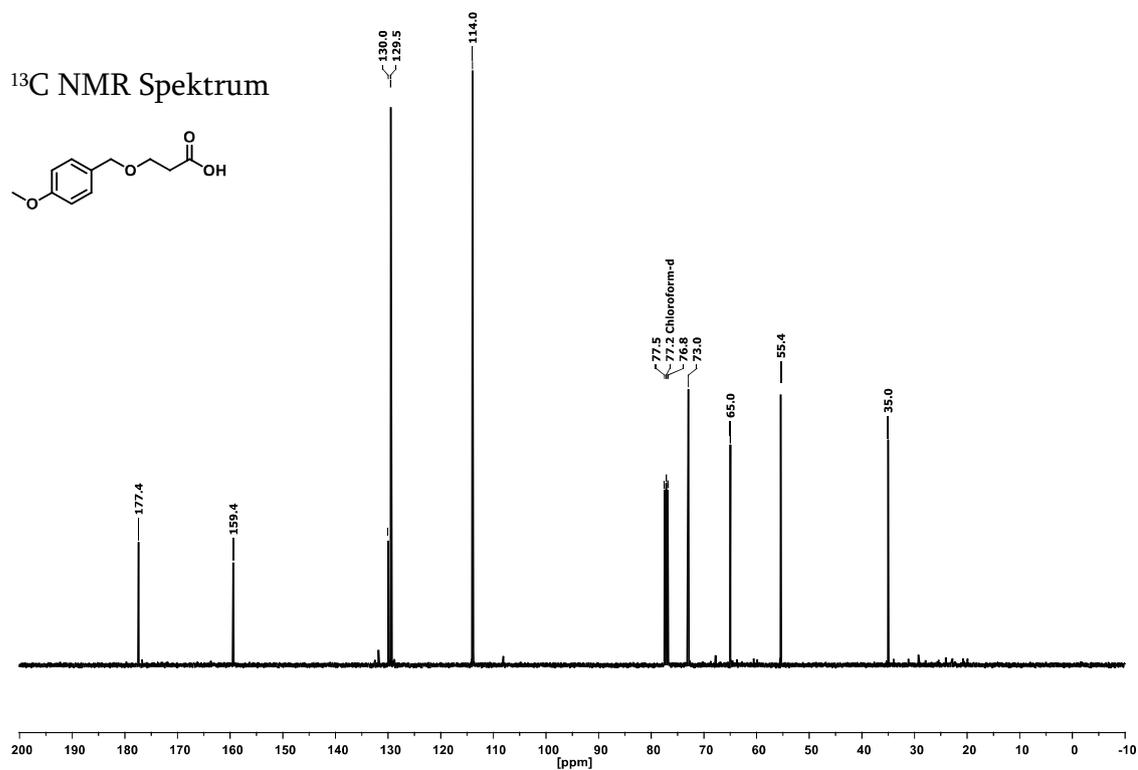
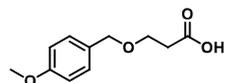


### 3-((4-Methoxybenzyl)oxy)-1-propanal (167)

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

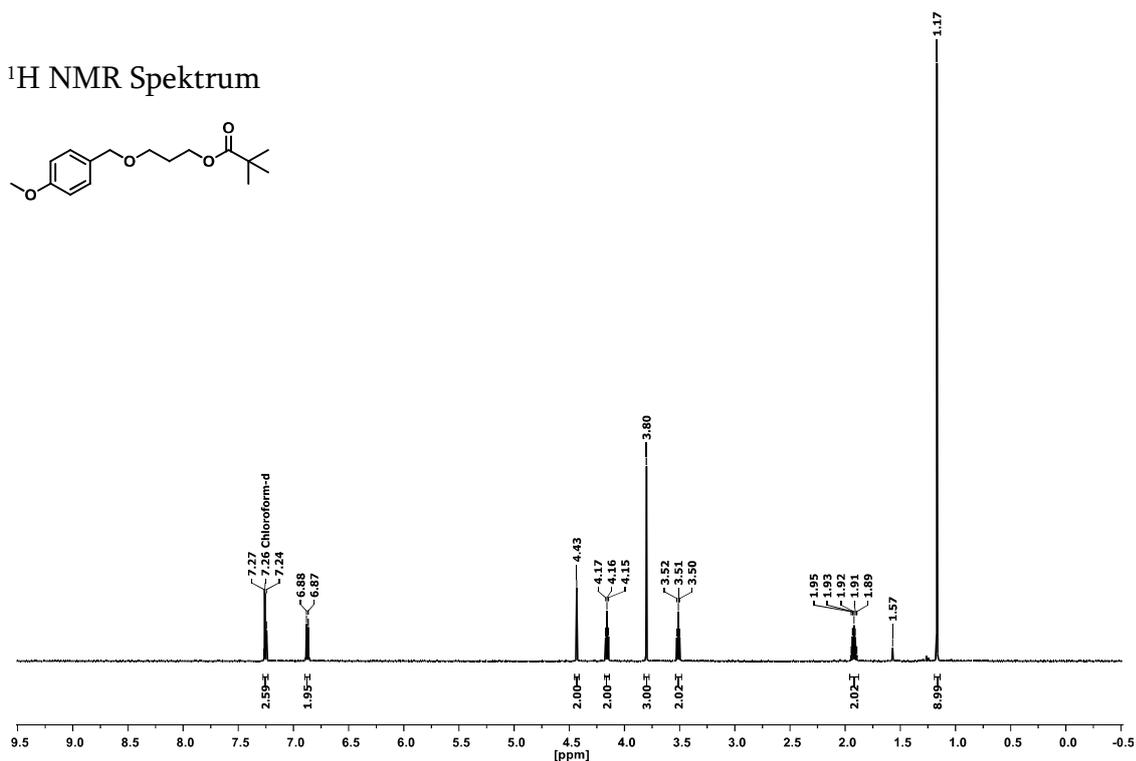
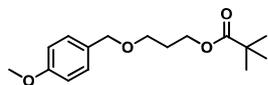


## 3-((4-Methoxybenzyl)oxy)propansäure (67)

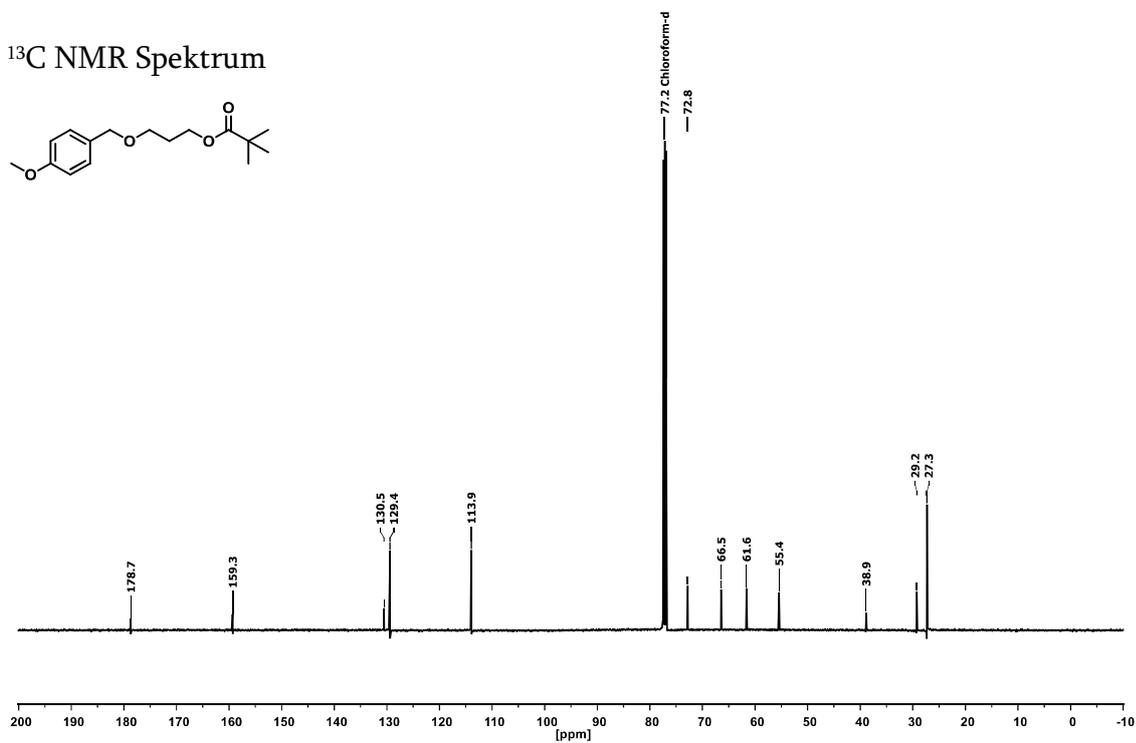
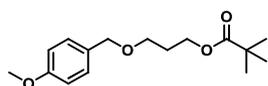
<sup>1</sup>H NMR Spektrum<sup>13</sup>C NMR Spektrum

### 3-((4-Methoxybenzyl)oxy)propylpivalat (75)

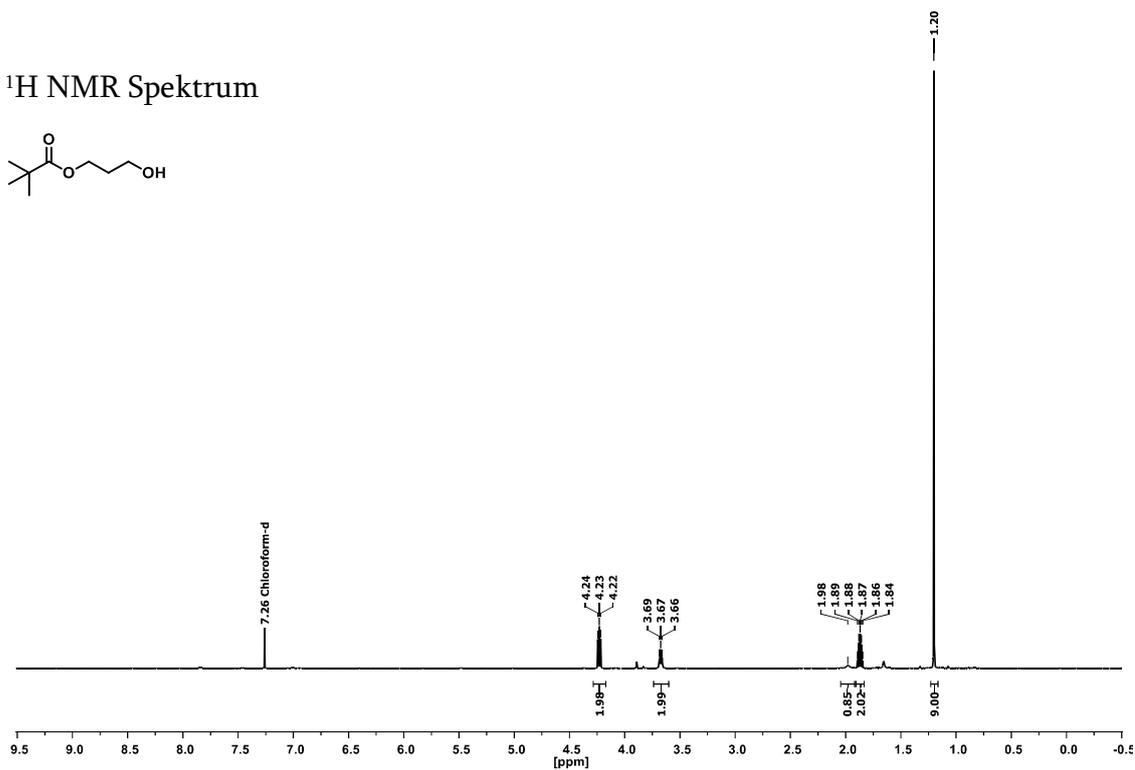
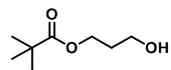
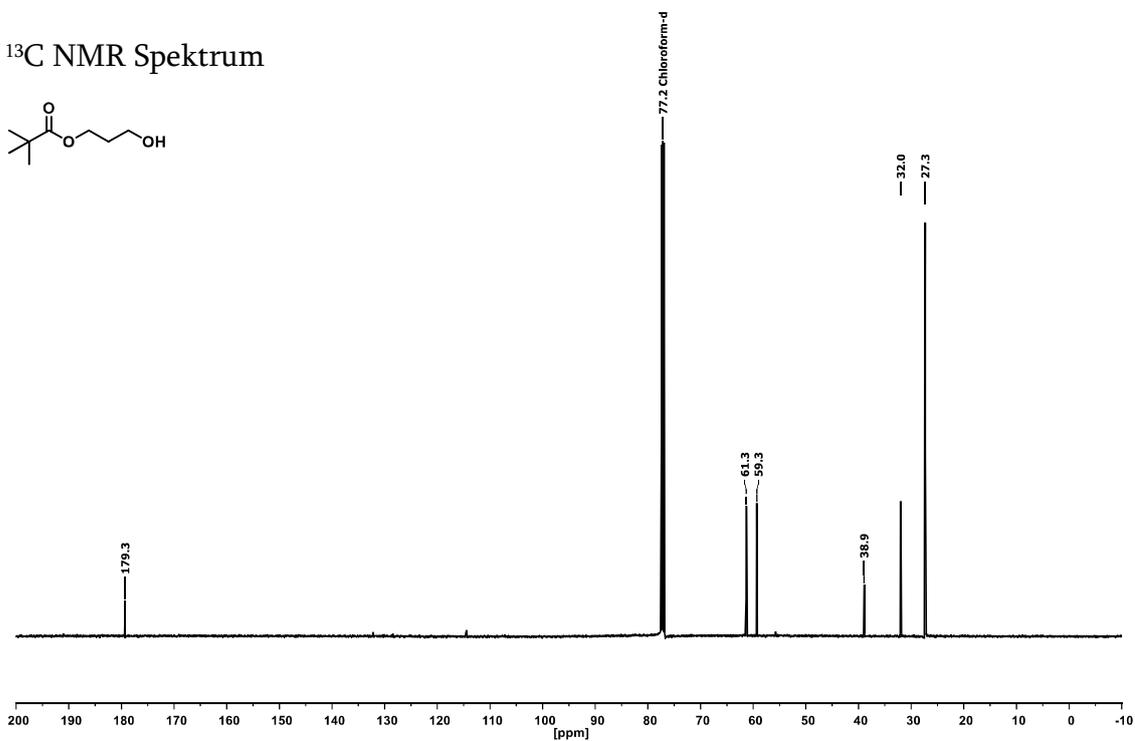
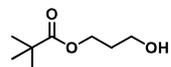
<sup>1</sup>H NMR Spektrum



<sup>13</sup>C NMR Spektrum

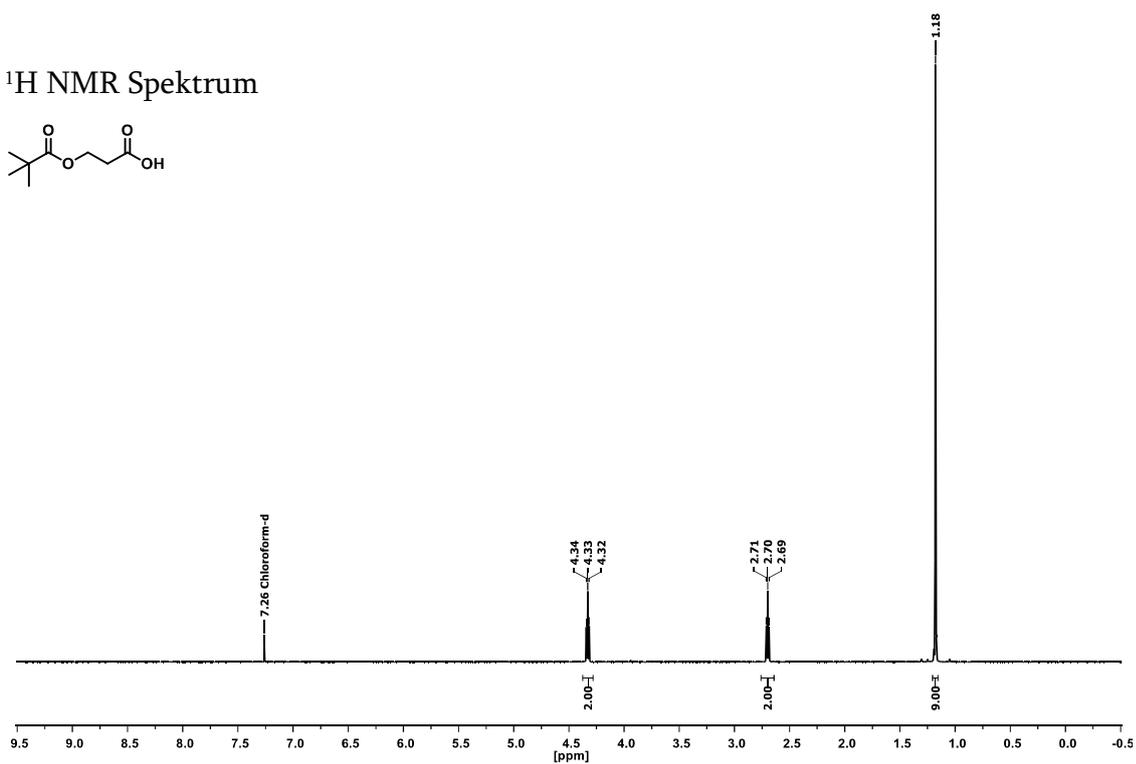
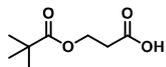


## 3-Hydroxypropylpivalat (76)

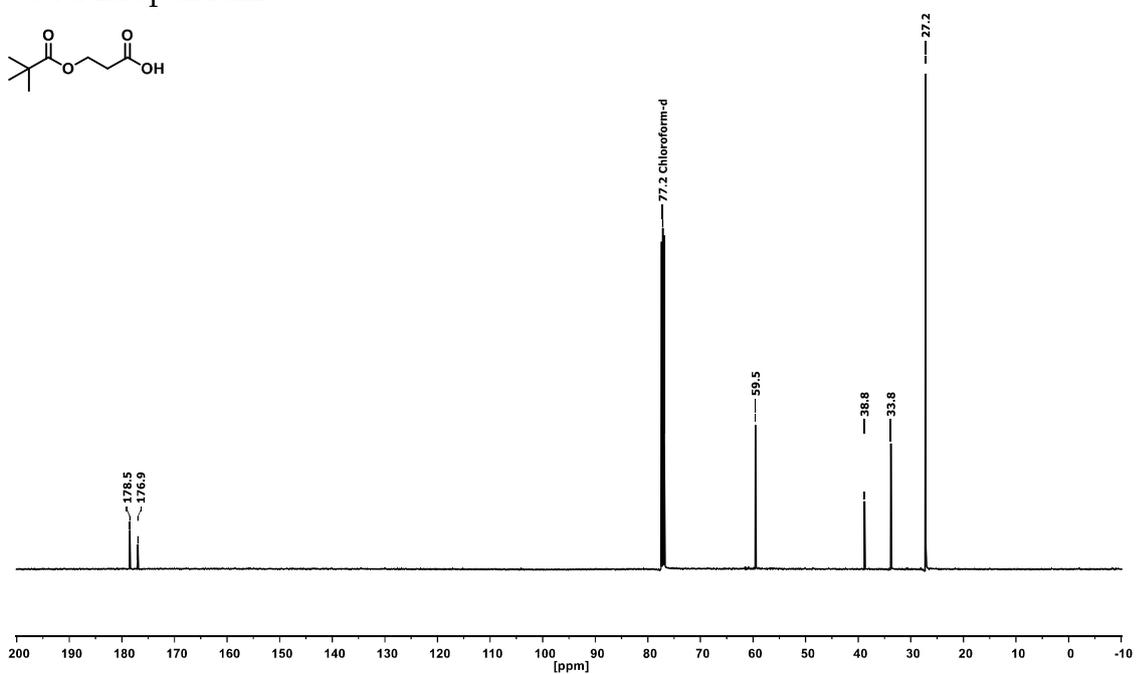
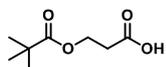
 $^1\text{H}$  NMR Spektrum $^{13}\text{C}$  NMR Spektrum

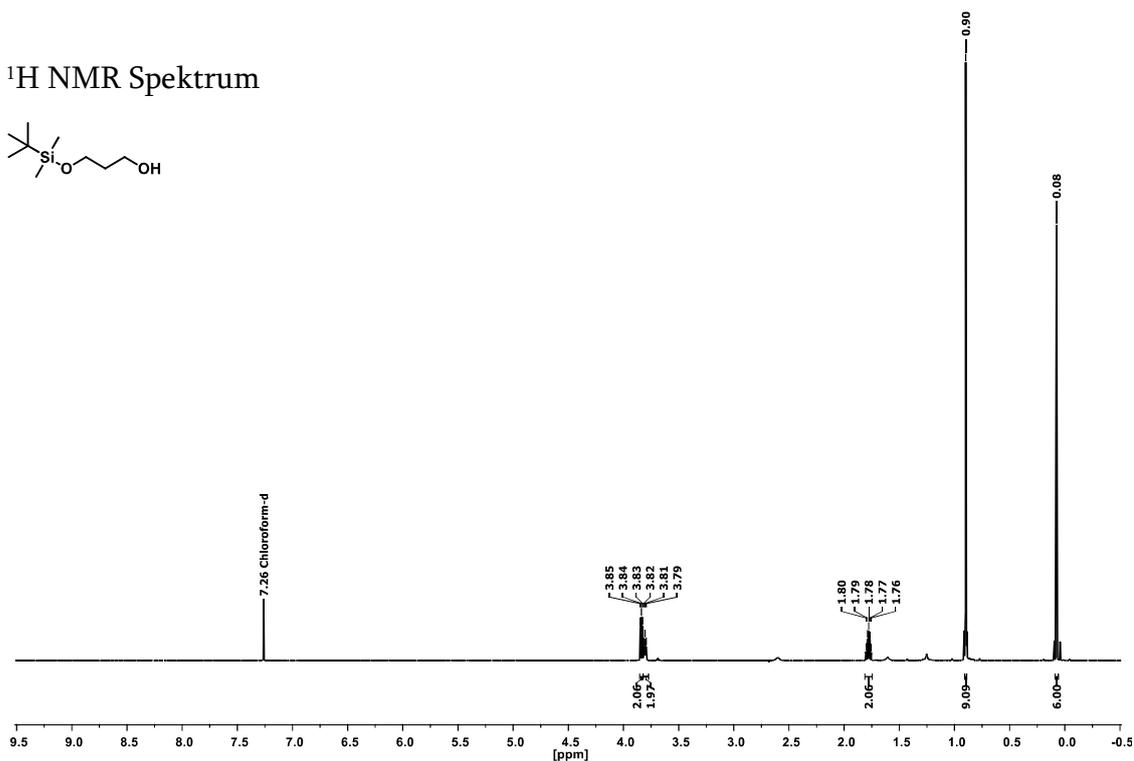
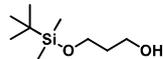
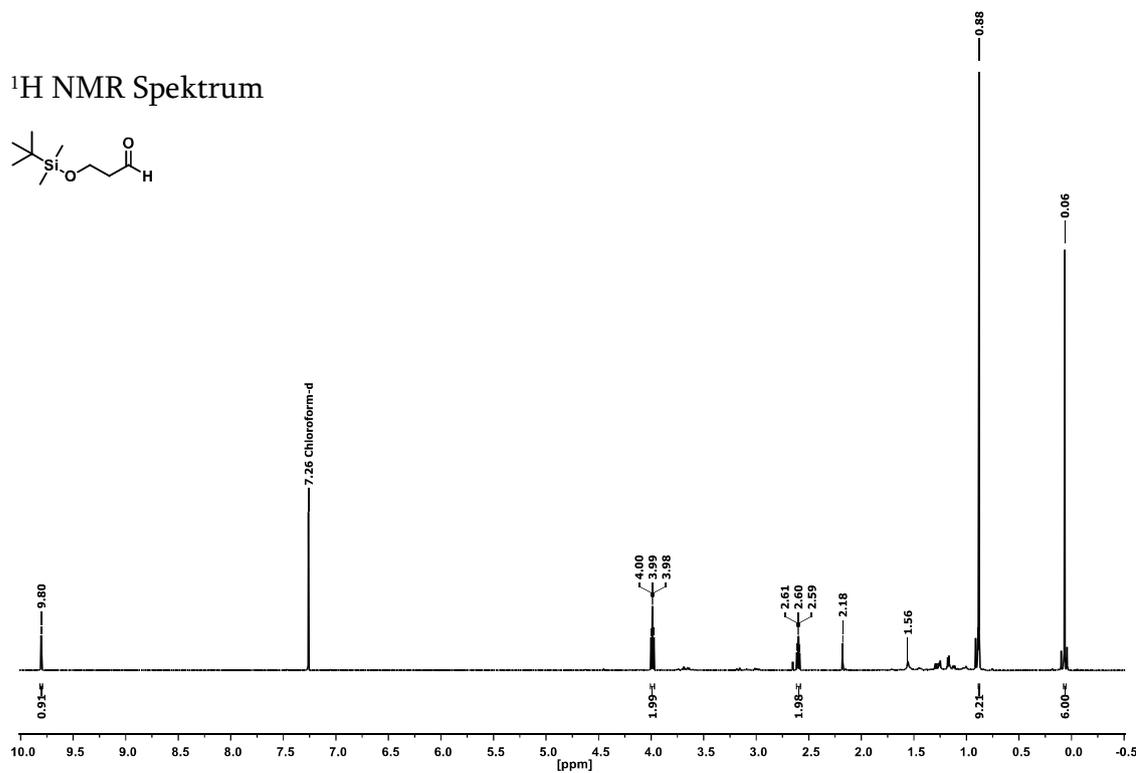
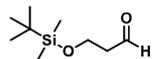
### 3-(Pivaloyloxy)propansäure (68)

$^1\text{H}$  NMR Spektrum



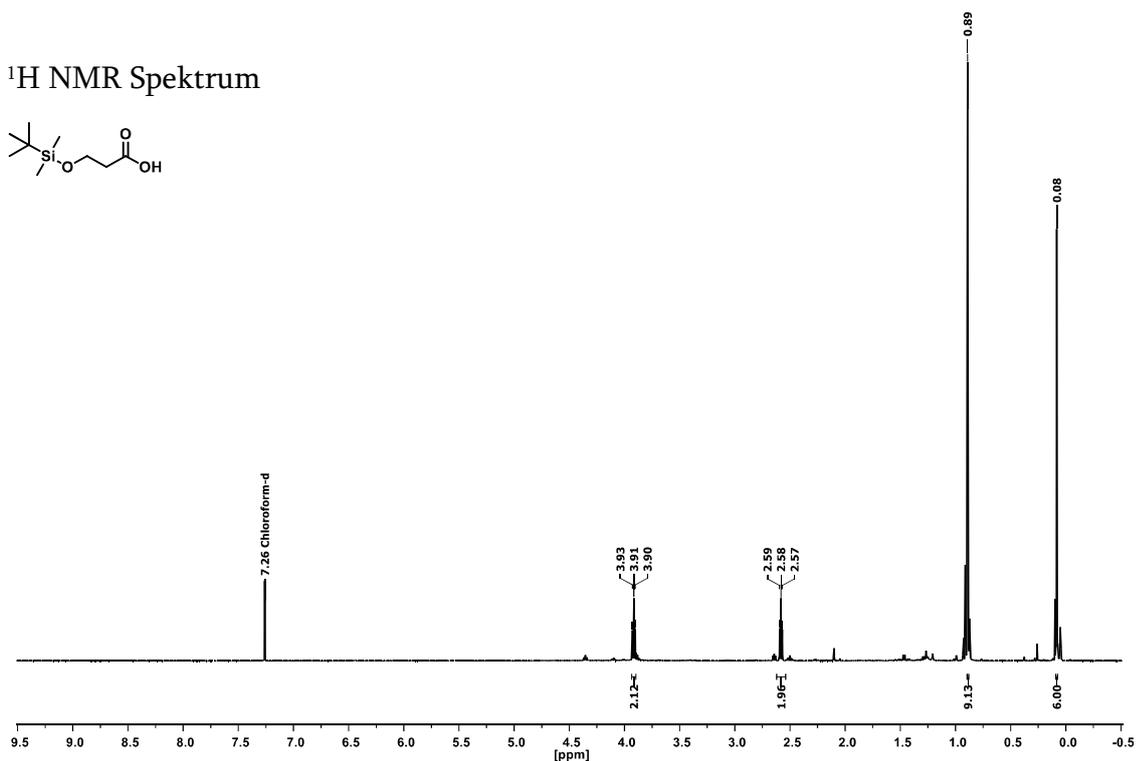
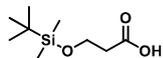
$^{13}\text{C}$  NMR Spektrum



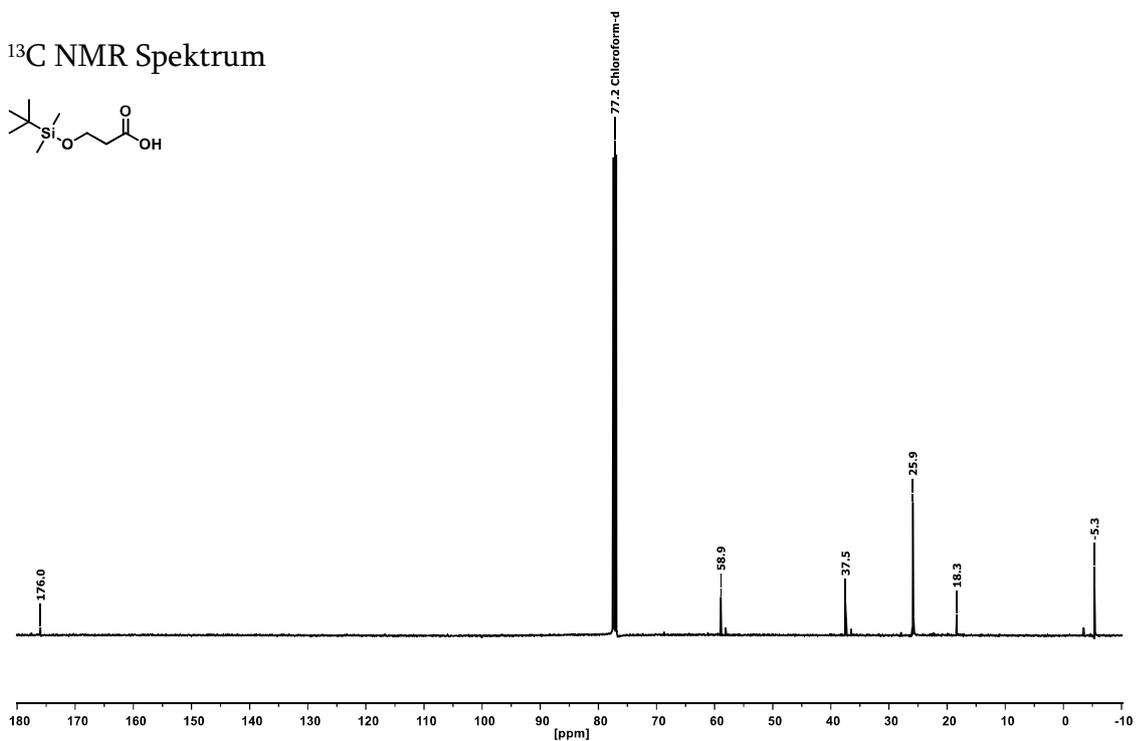
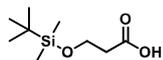
3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-1-propanol (72)<sup>1</sup>H NMR Spektrum3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)propanal (165)<sup>1</sup>H NMR Spektrum

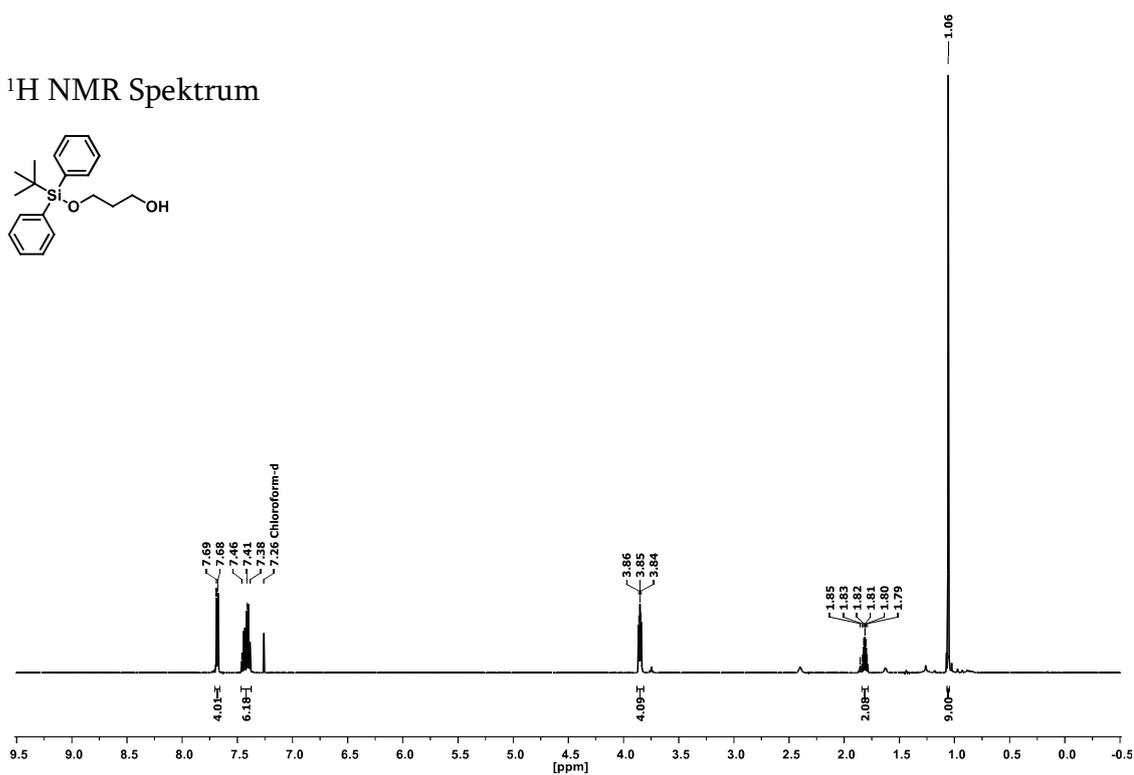
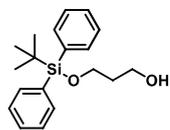
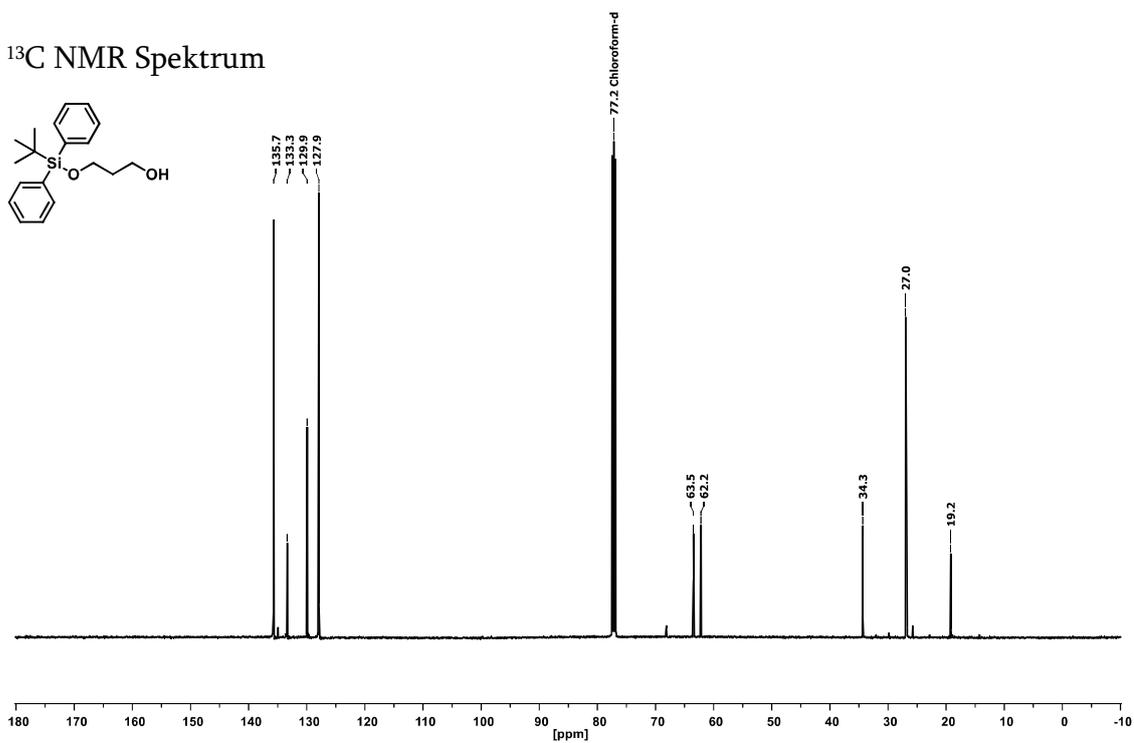
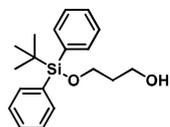
### 3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)propansäure (65)

$^1\text{H}$  NMR Spektrum



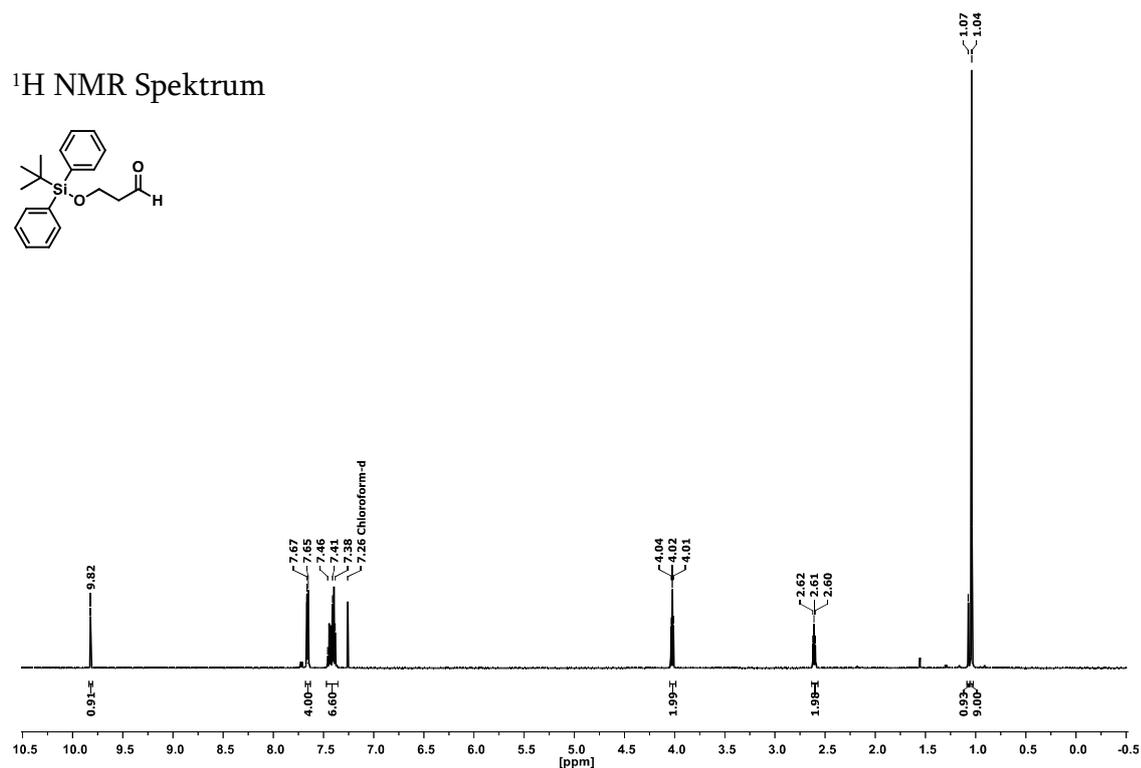
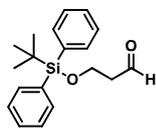
$^{13}\text{C}$  NMR Spektrum



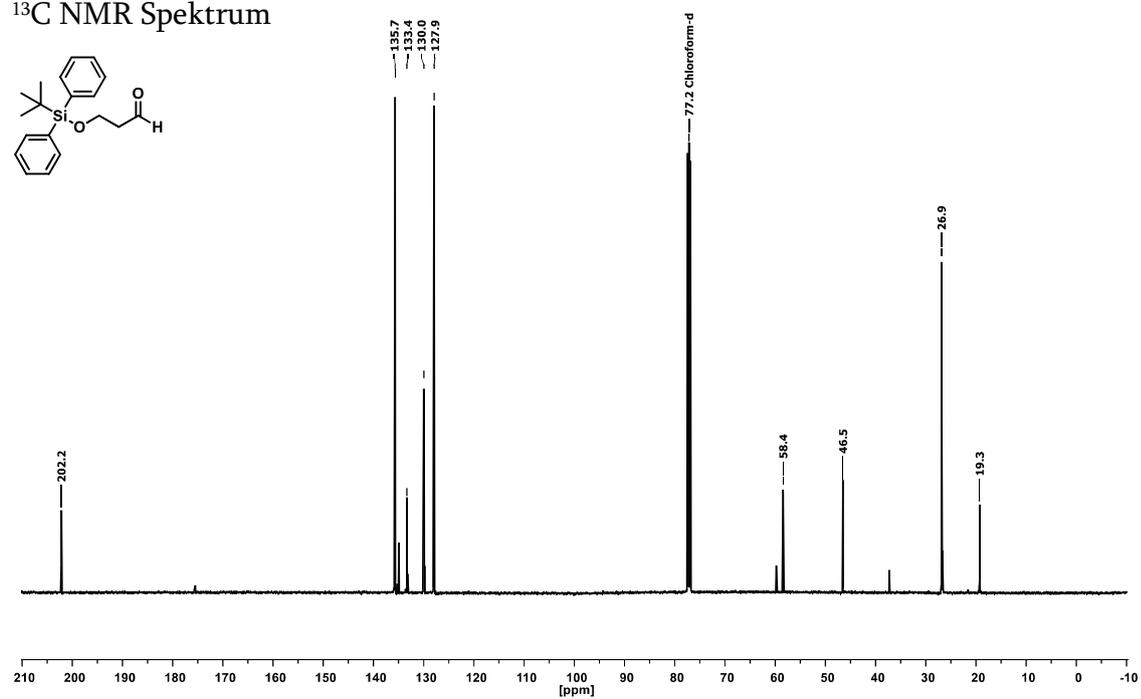
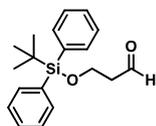
3-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)-1-propanol (73)<sup>1</sup>H NMR Spektrum<sup>13</sup>C NMR Spektrum

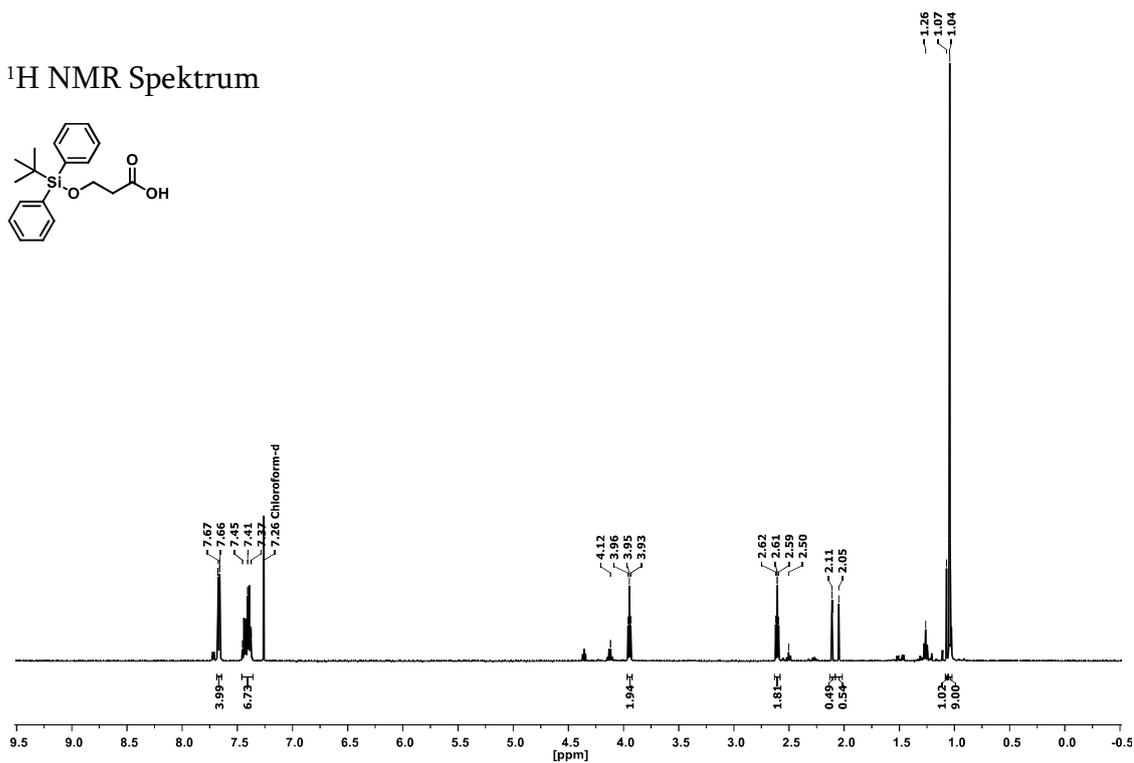
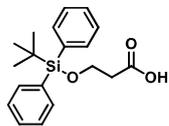
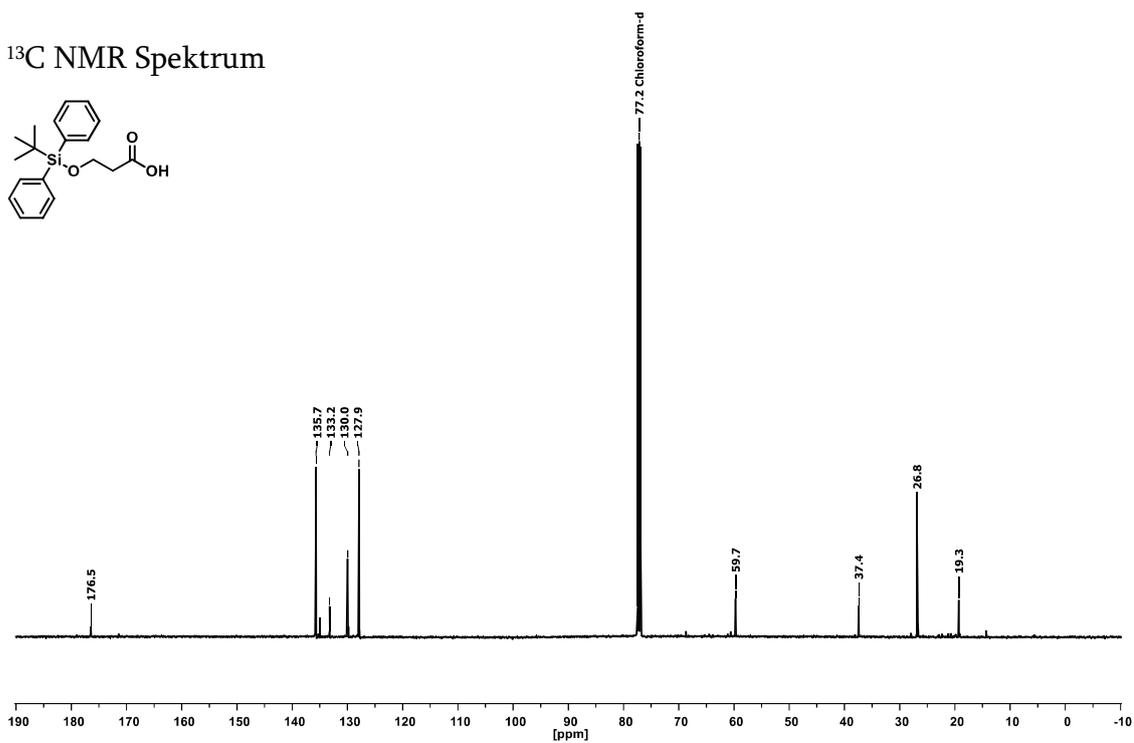
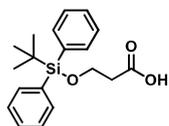
### 3-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)propanal (166)

<sup>1</sup>H NMR Spektrum



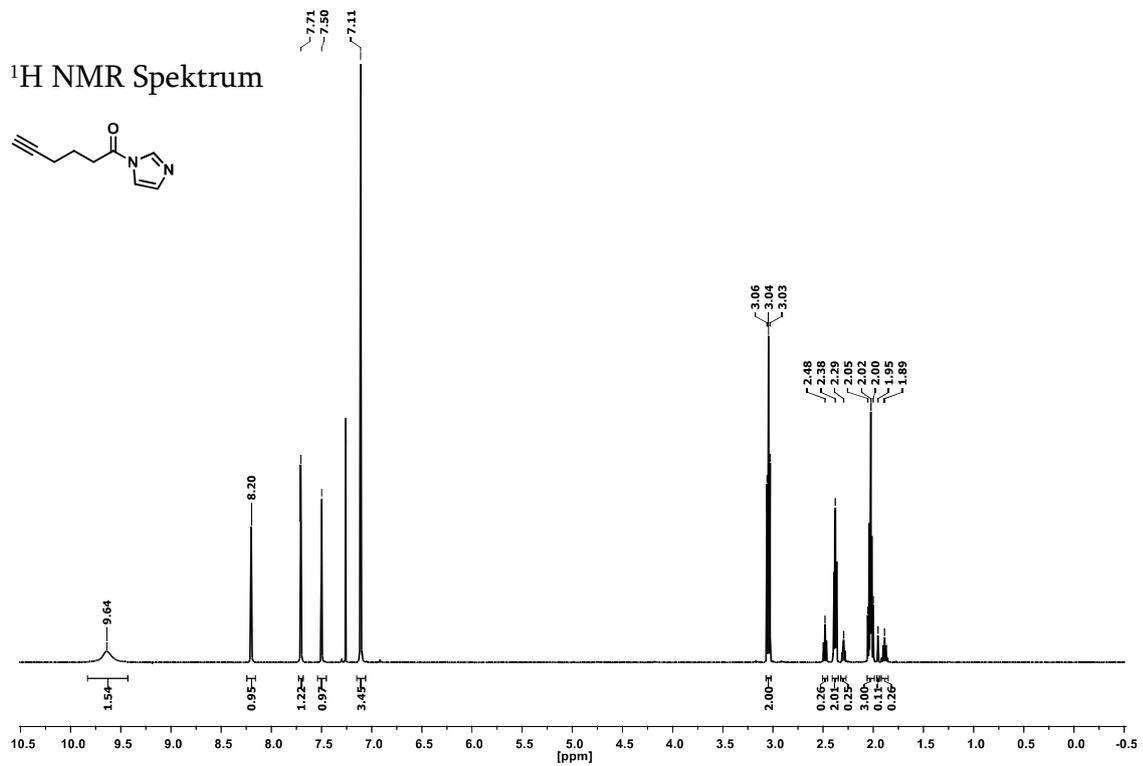
<sup>13</sup>C NMR Spektrum



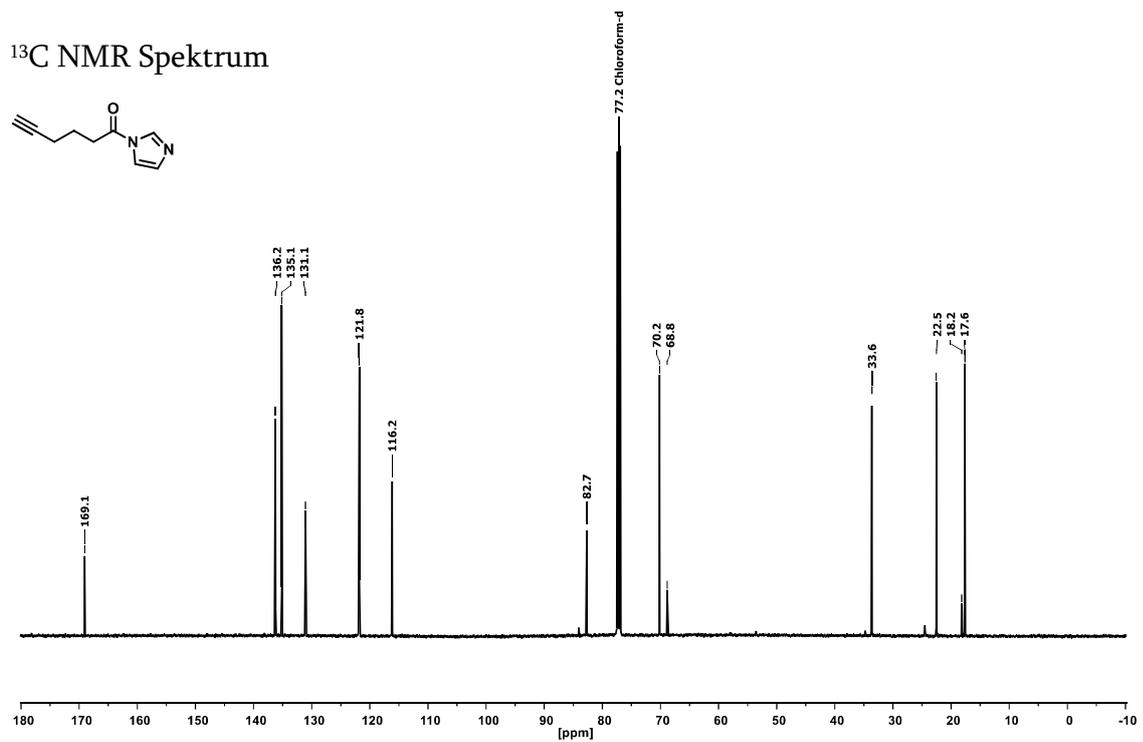
3-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)propansäure (66)<sup>1</sup>H NMR Spektrum<sup>13</sup>C NMR Spektrum

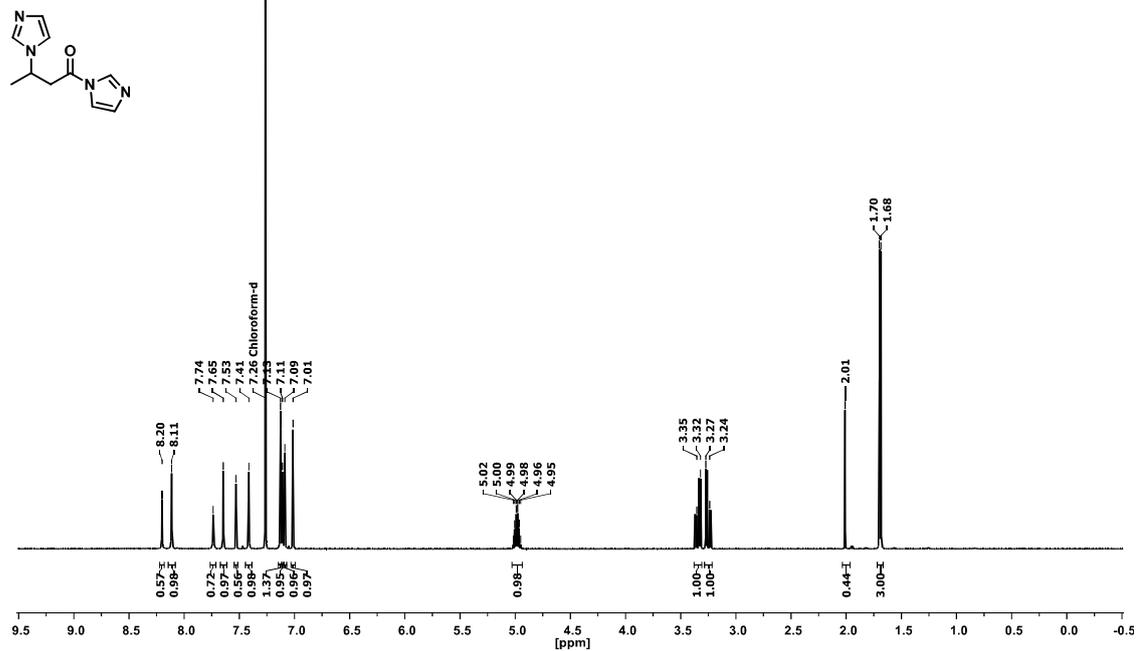
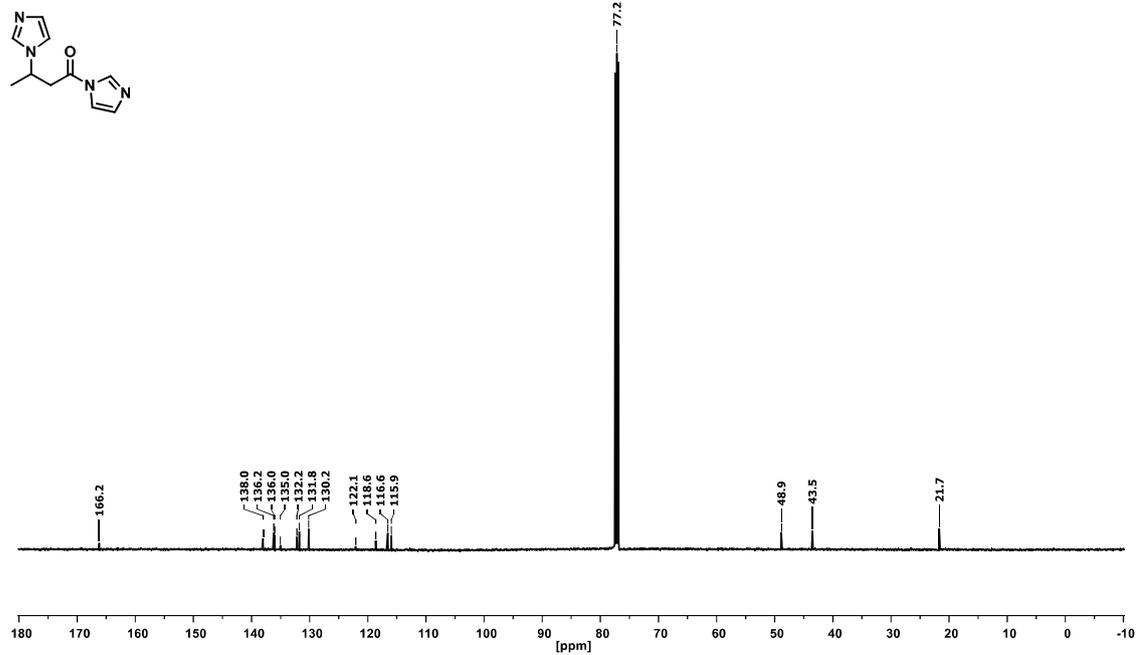
### 8.5.3 $\beta$ -Ketothiophenolester und Vorläufer

#### 1-(1H-Imidazol-1-yl)-5-hexin-1-on (80)



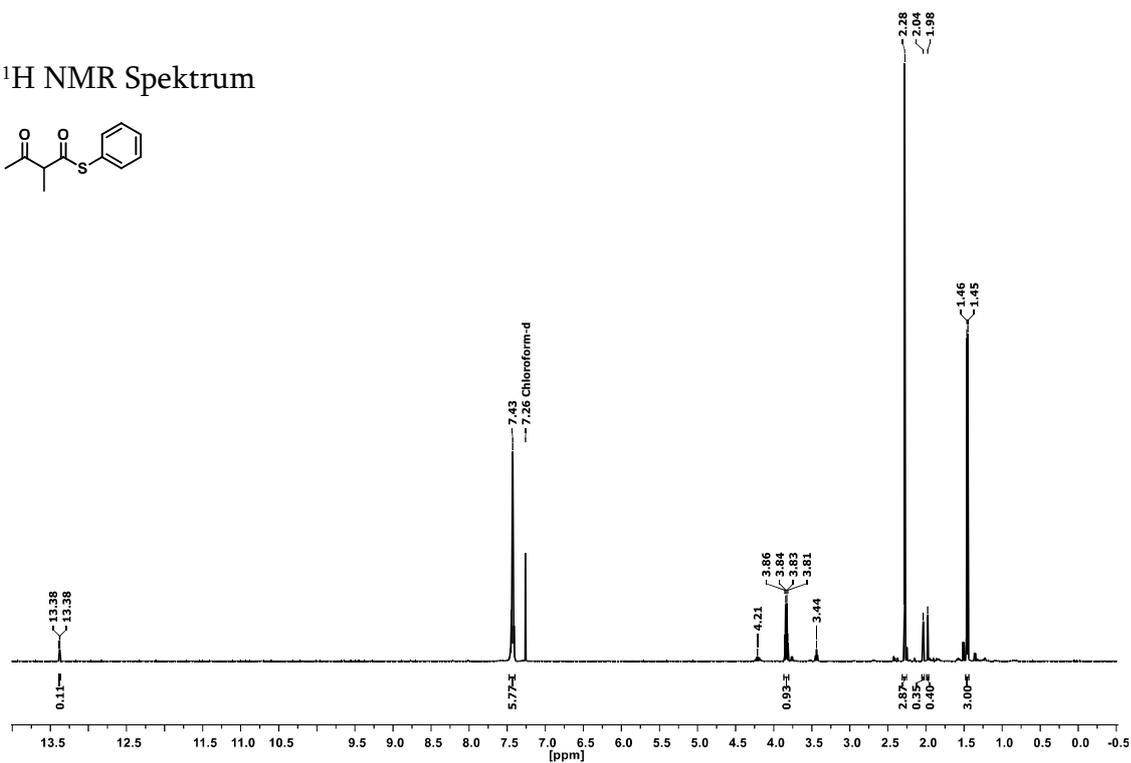
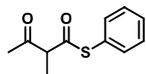
#### <sup>13</sup>C NMR Spektrum



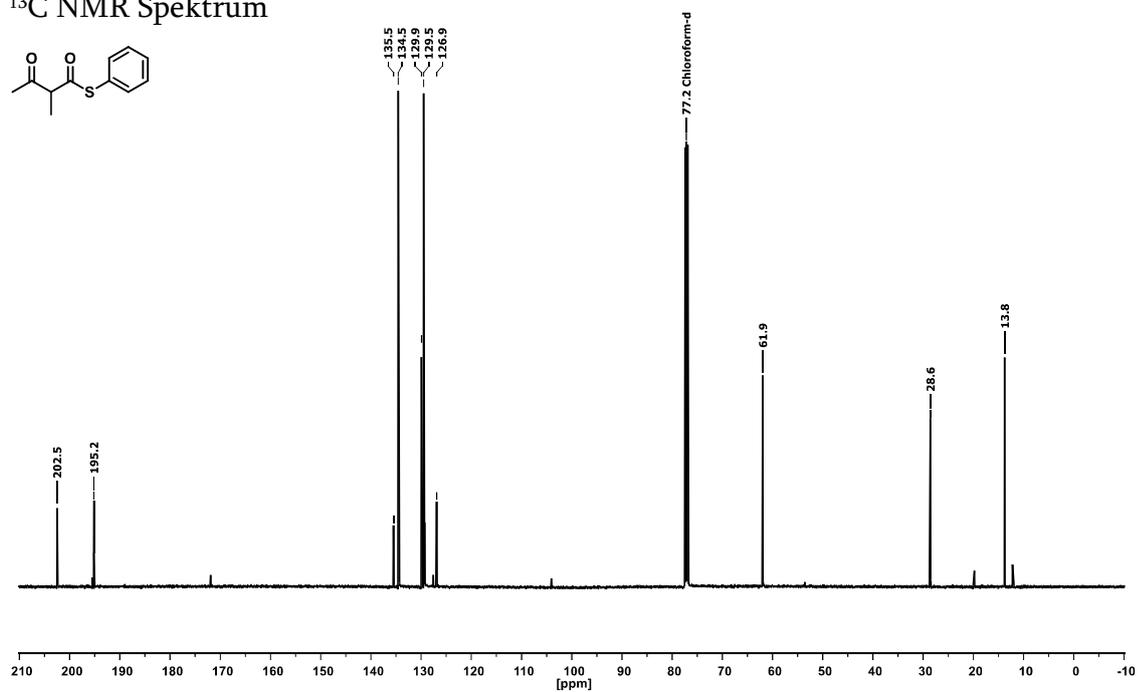
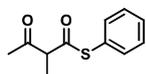
1,3-Di(1*H*-imidazol-1-yl)-1-butanon (84)<sup>1</sup>H NMR Spektrum<sup>13</sup>C NMR Spektrum

## 2-Methyl-3-oxobutansäurethiophenolester (90)

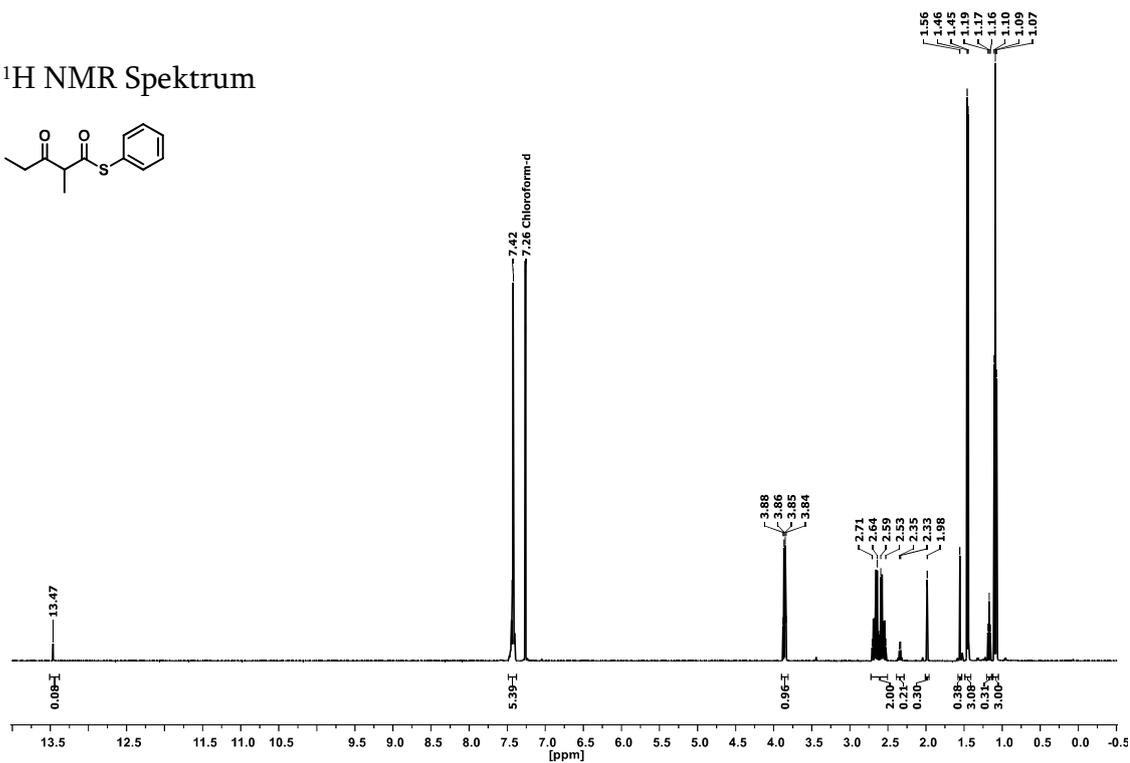
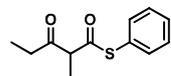
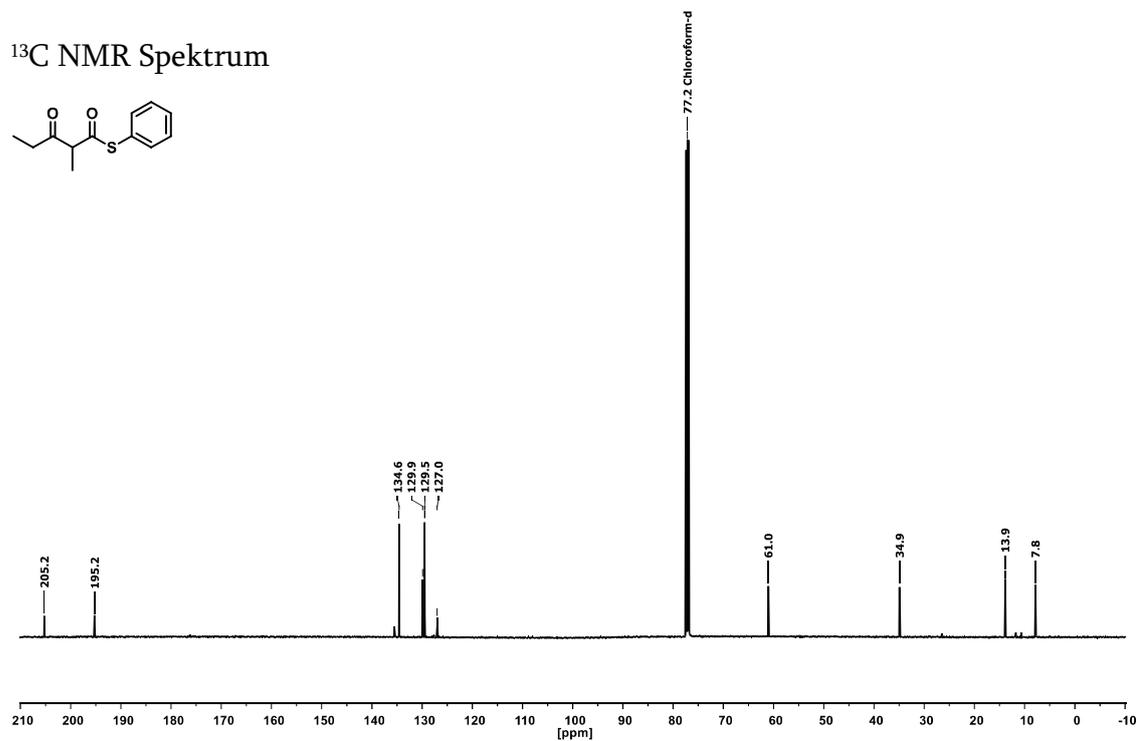
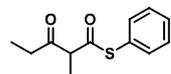
$^1\text{H}$  NMR Spektrum



$^{13}\text{C}$  NMR Spektrum

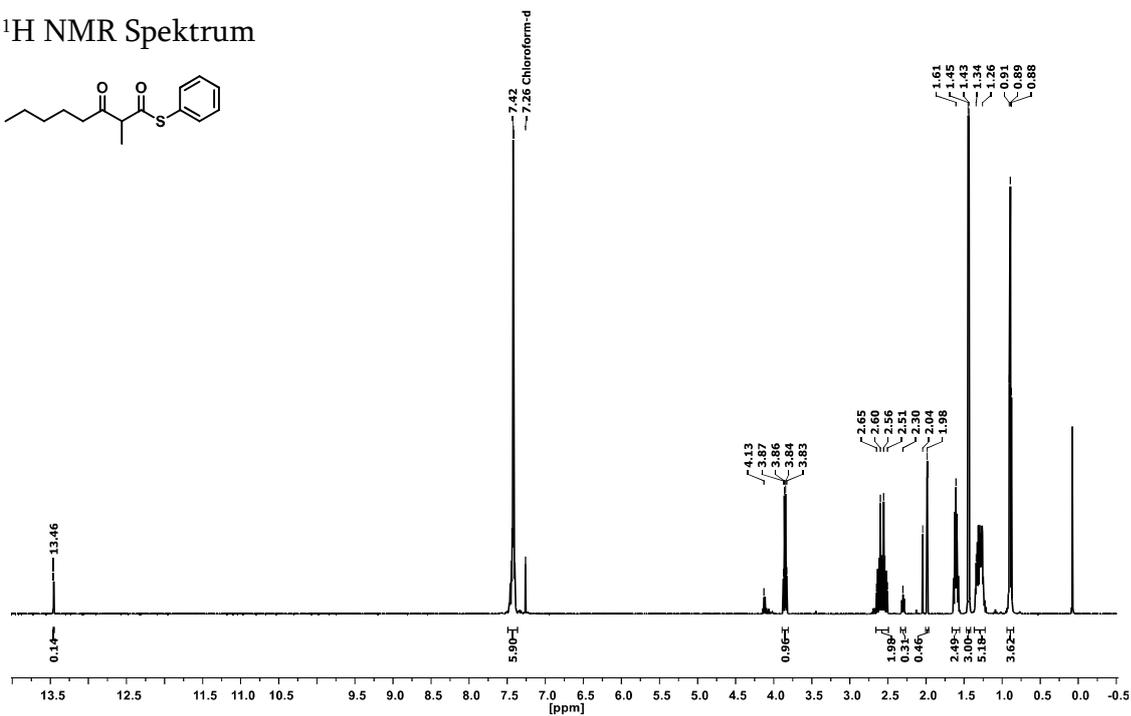
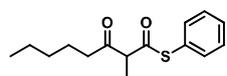


## 2-Methyl-3-oxopentansäurethiophenolester (59)

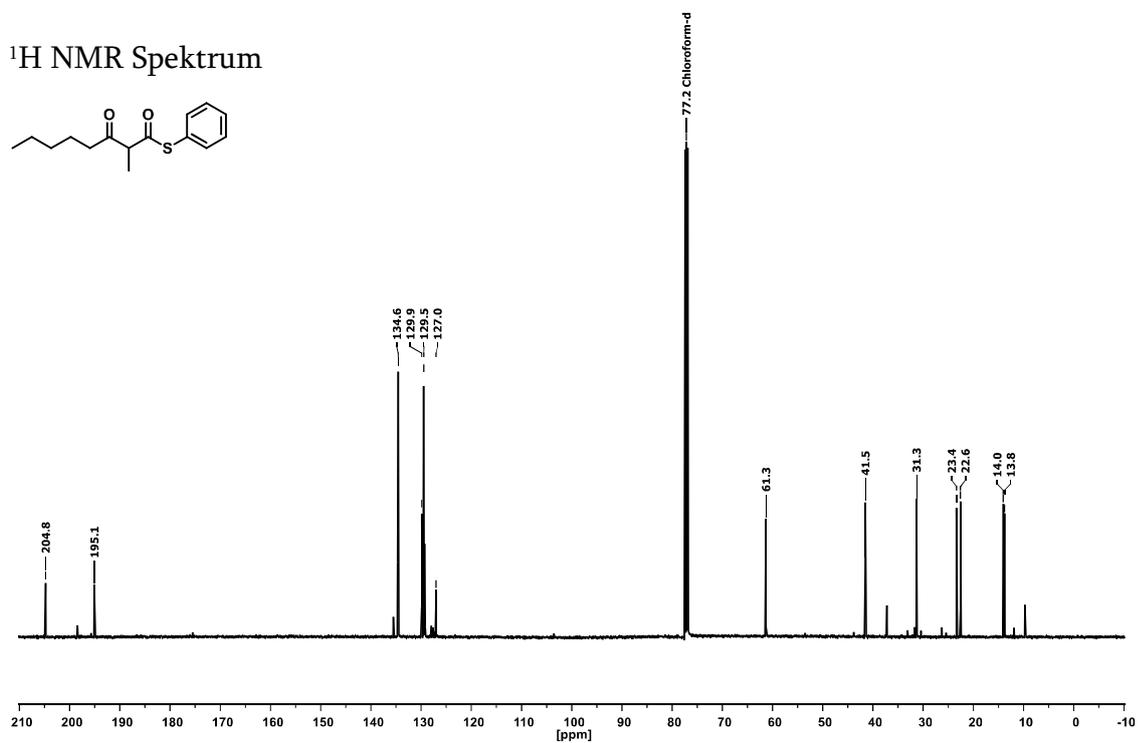
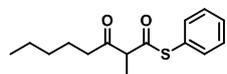
 $^1\text{H}$  NMR Spektrum $^{13}\text{C}$  NMR Spektrum

## 2-Methyl-3-oxooctansäurethiophenolester (91)

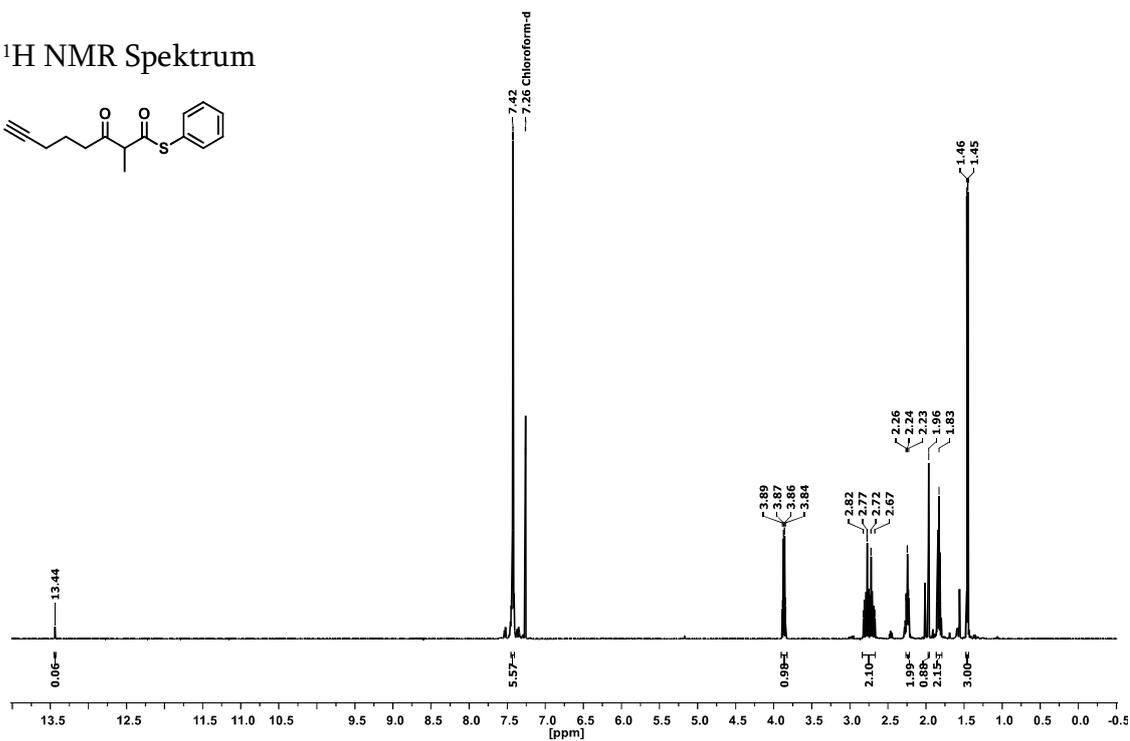
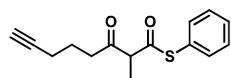
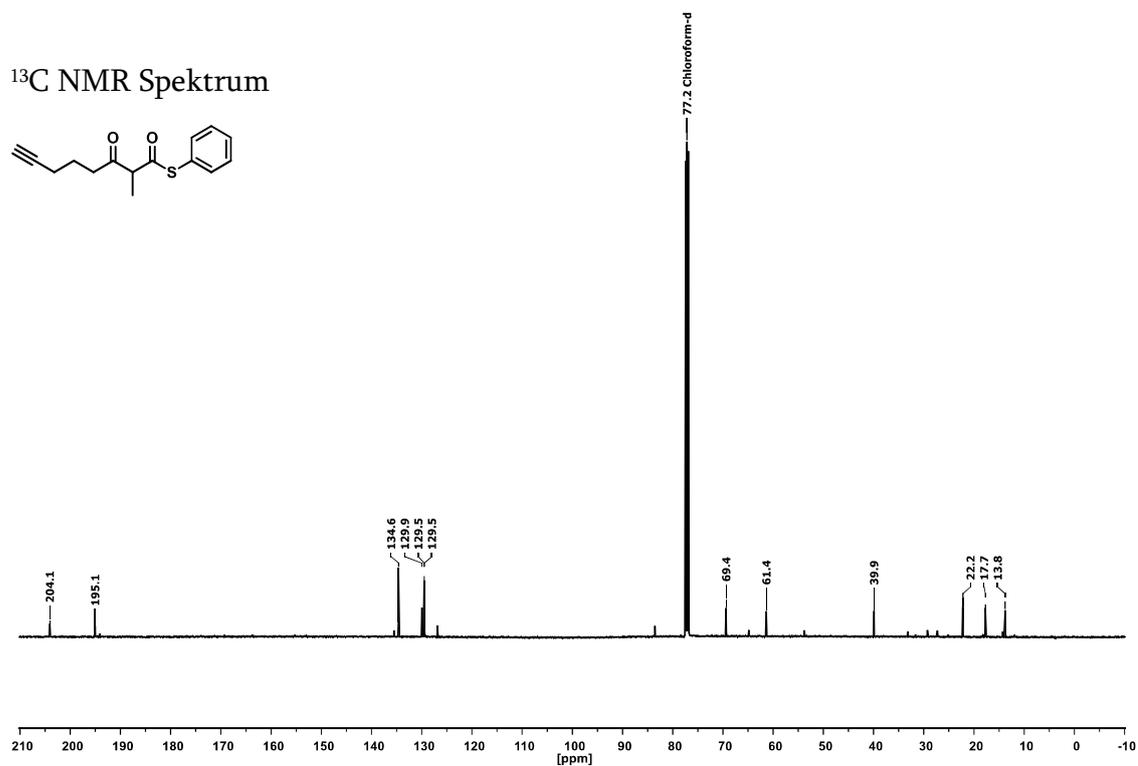
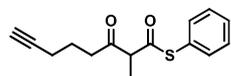
$^1\text{H}$  NMR Spektrum



$^1\text{H}$  NMR Spektrum

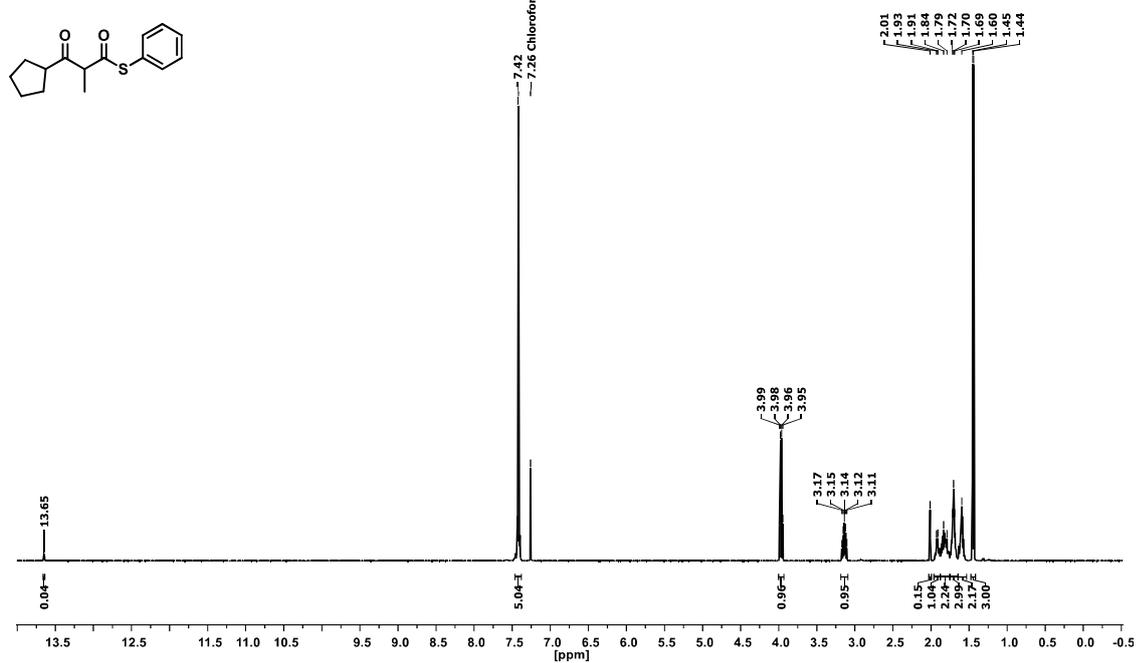


## 2-Methyl-3-oxo-7-octinsäurethiophenolester (81)

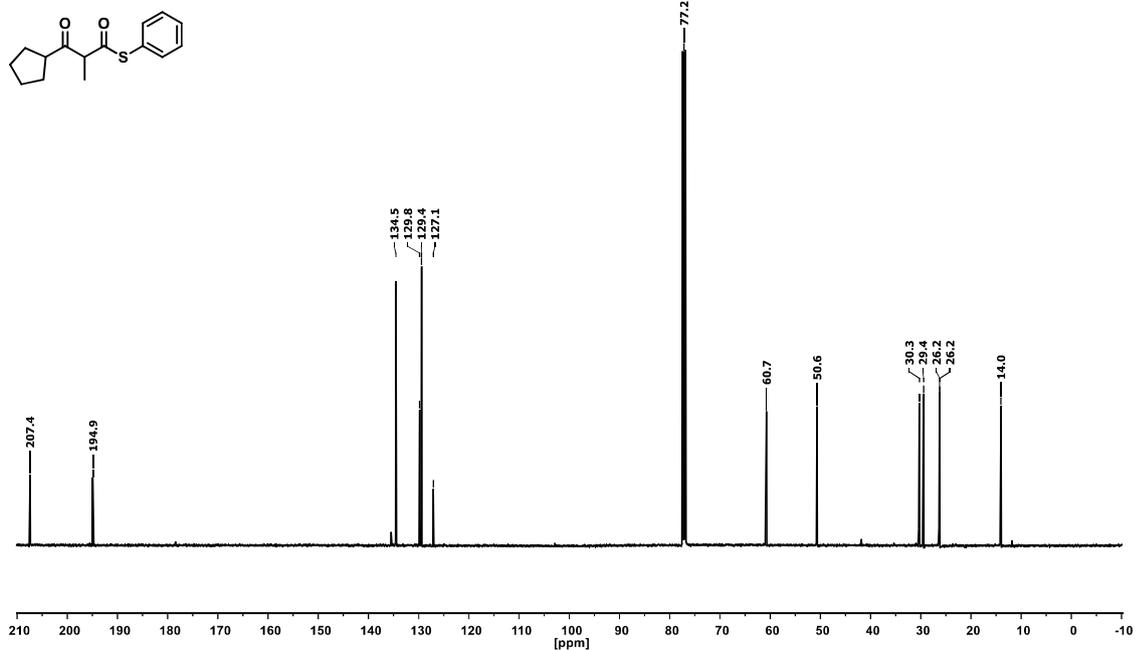
<sup>1</sup>H NMR Spektrum<sup>13</sup>C NMR Spektrum

### 3-Cyclopentyl-2-methyl-3-oxopropansäurethiophenolester (92)

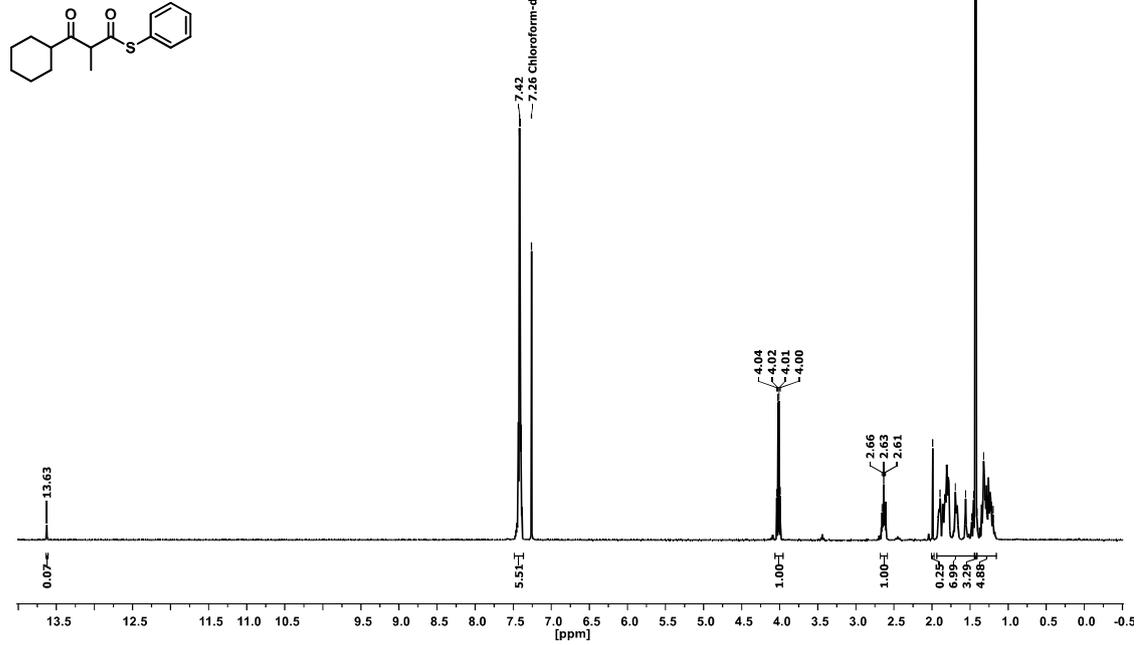
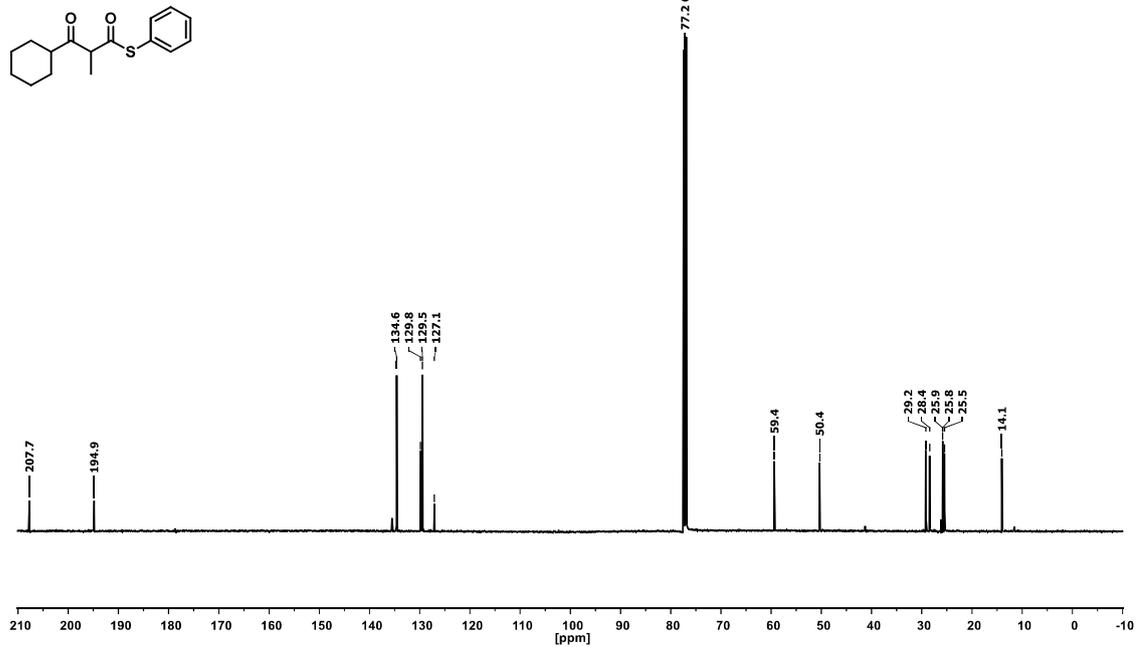
#### <sup>1</sup>H NMR Spektrum



#### <sup>13</sup>C NMR Spektrum

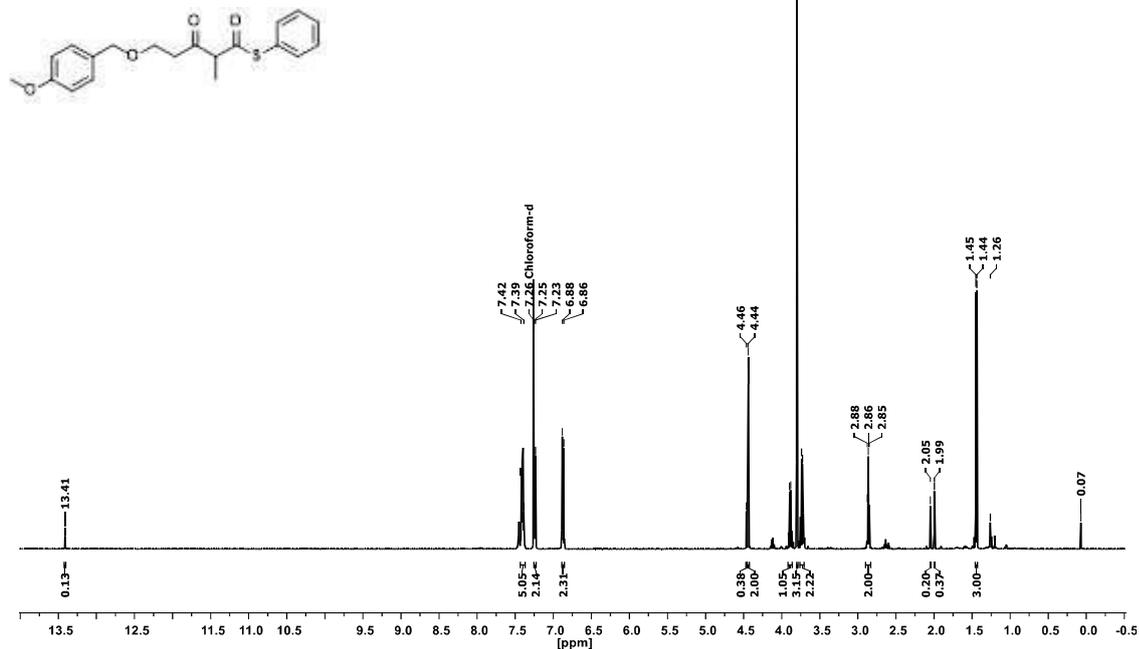


## 3-Cyclohexyl-2-methyl-3-oxopropansäurethiophenolester (93)

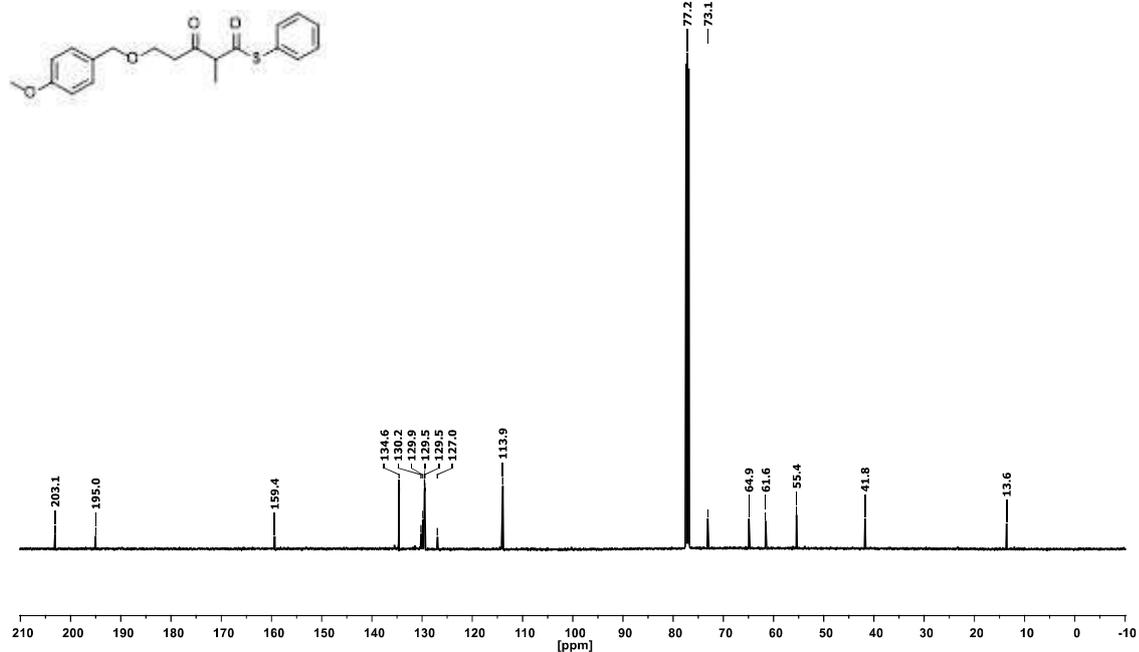
<sup>1</sup>H NMR Spektrum<sup>13</sup>C NMR Spektrum

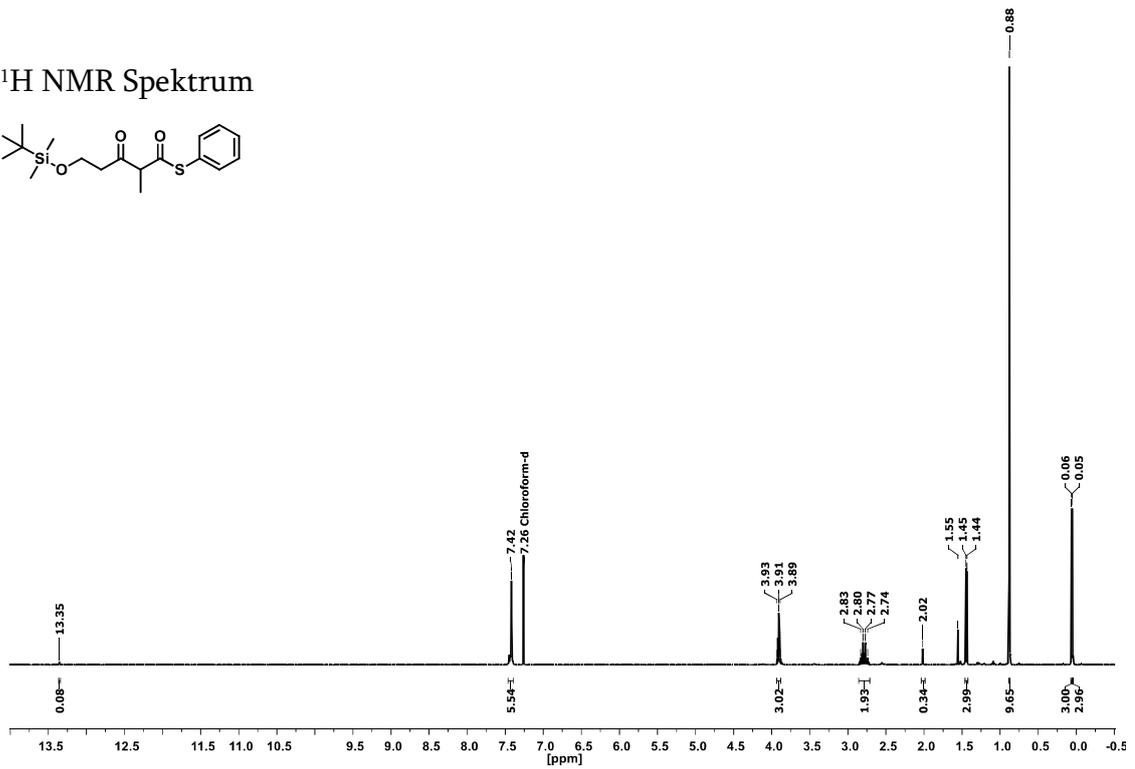
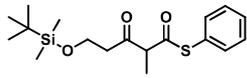
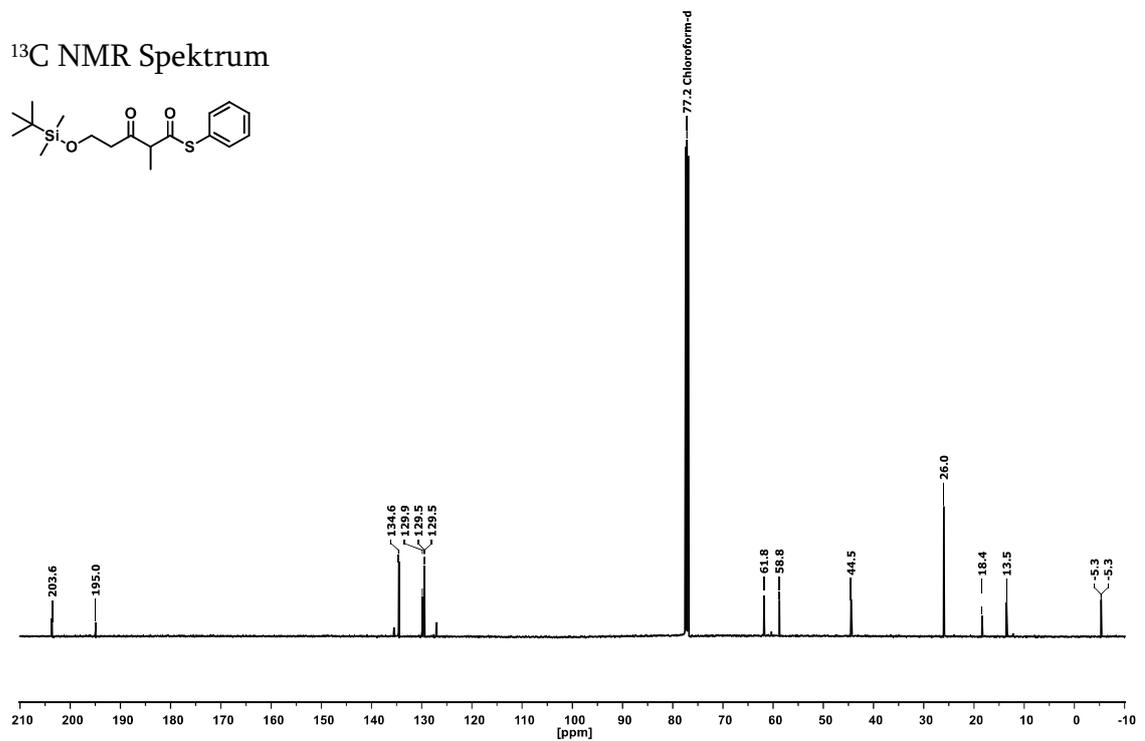
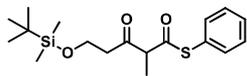
## 5-((4-Methoxybenzyl)oxy)-2-methyl-3-oxopentansäurethiophenolester (94)

<sup>1</sup>H NMR Spektrum



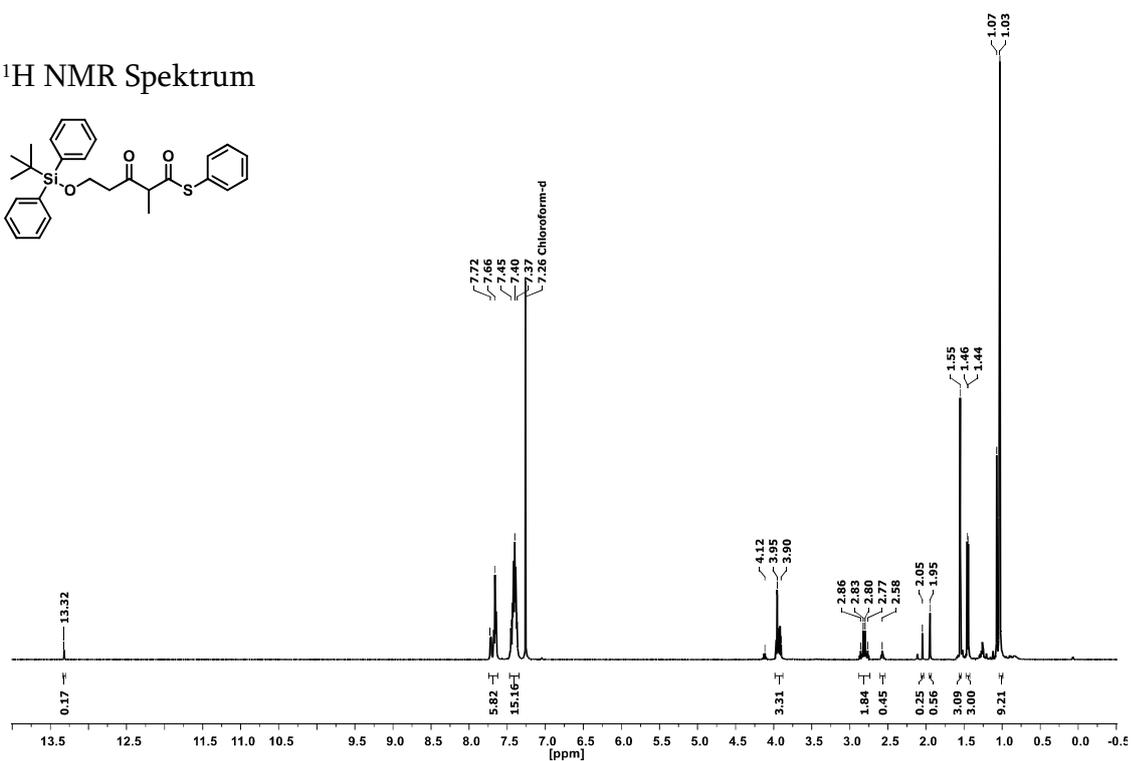
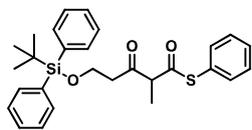
<sup>13</sup>C NMR Spektrum



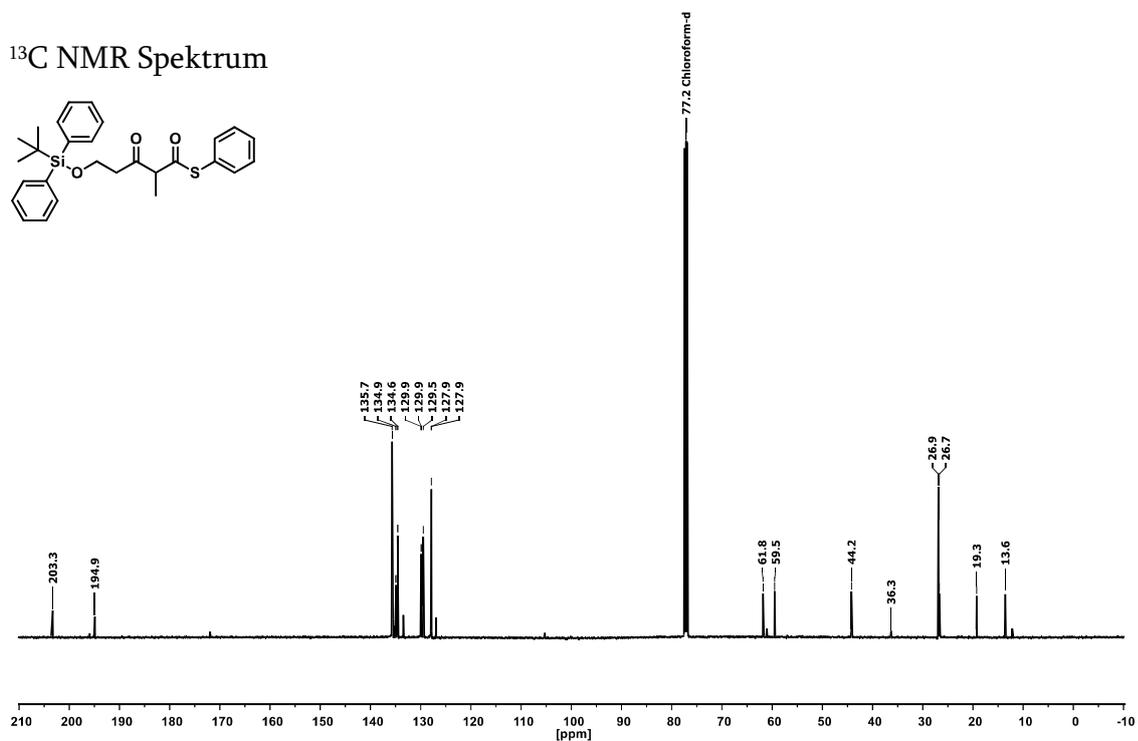
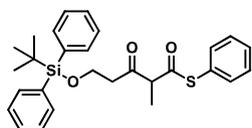
5-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-methyl-3-oxopentansäurethiophenolester (95)<sup>1</sup>H NMR Spektrum<sup>13</sup>C NMR Spektrum

# 5-((*tert*-Butyldiphenylsilyl)oxy)-2-methyl-3-oxopentansäurethiophenolester (96)

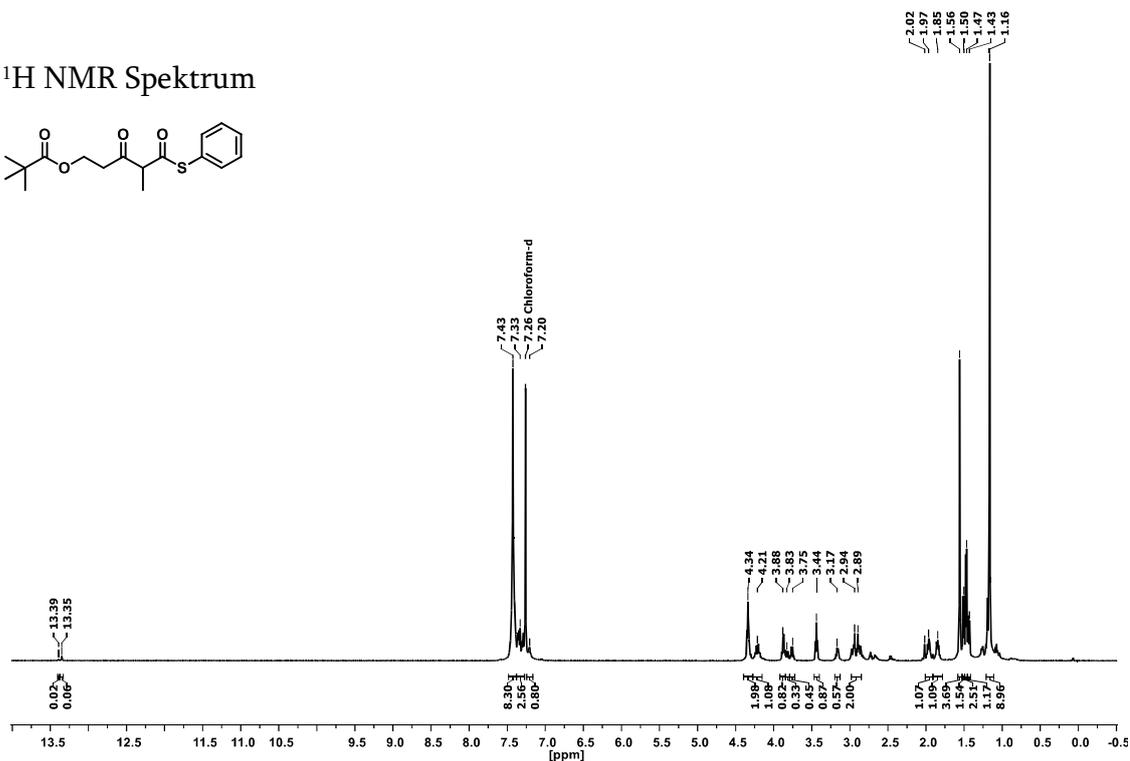
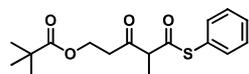
## <sup>1</sup>H NMR Spektrum



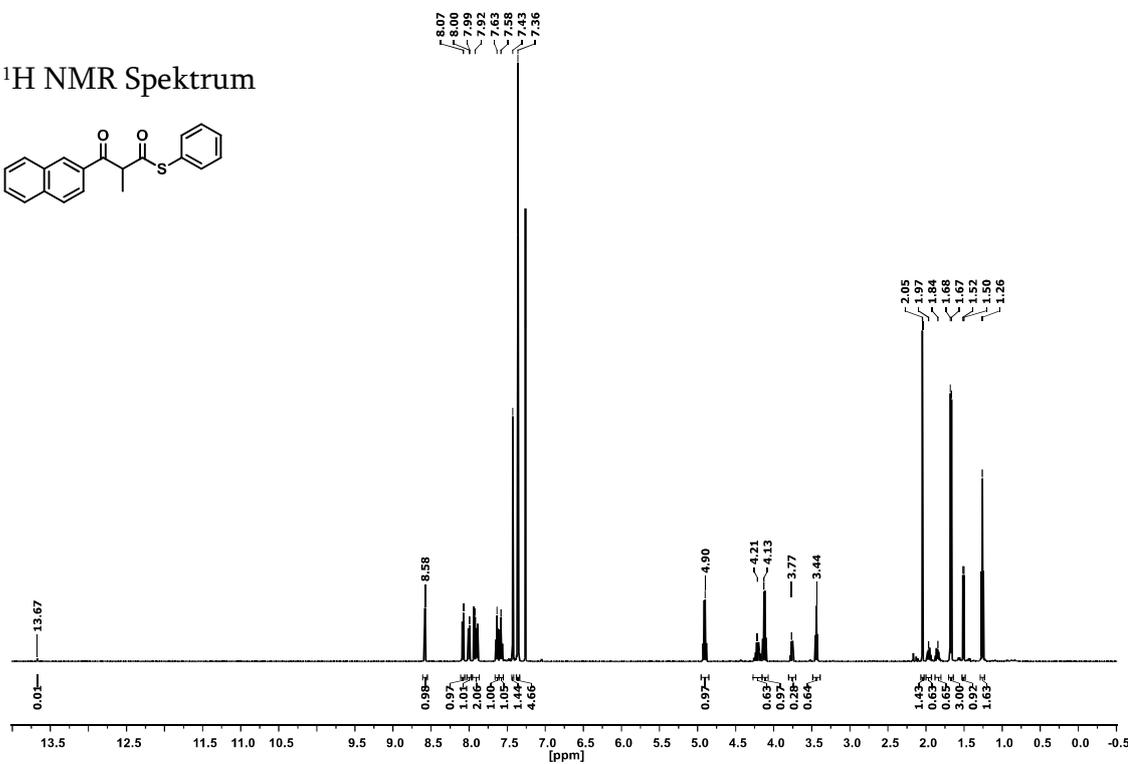
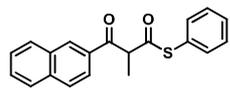
## <sup>13</sup>C NMR Spektrum



## 4-Methyl-3,5-dioxo-5-(thiophenyl)pentylpivalat (97)

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

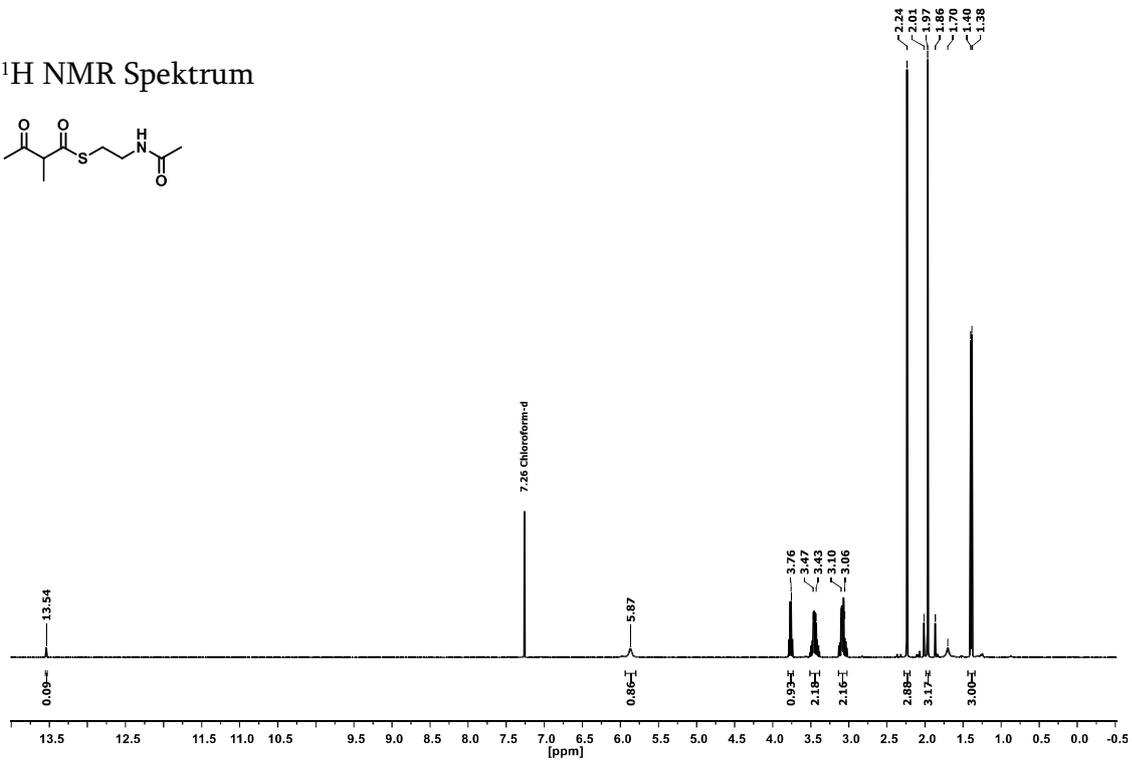
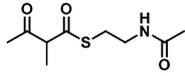
## 2-Methyl-3-(naphthalen-2-yl)-3-oxopropansäurethiophenolester (98)

<sup>1</sup>H NMR Spektrum

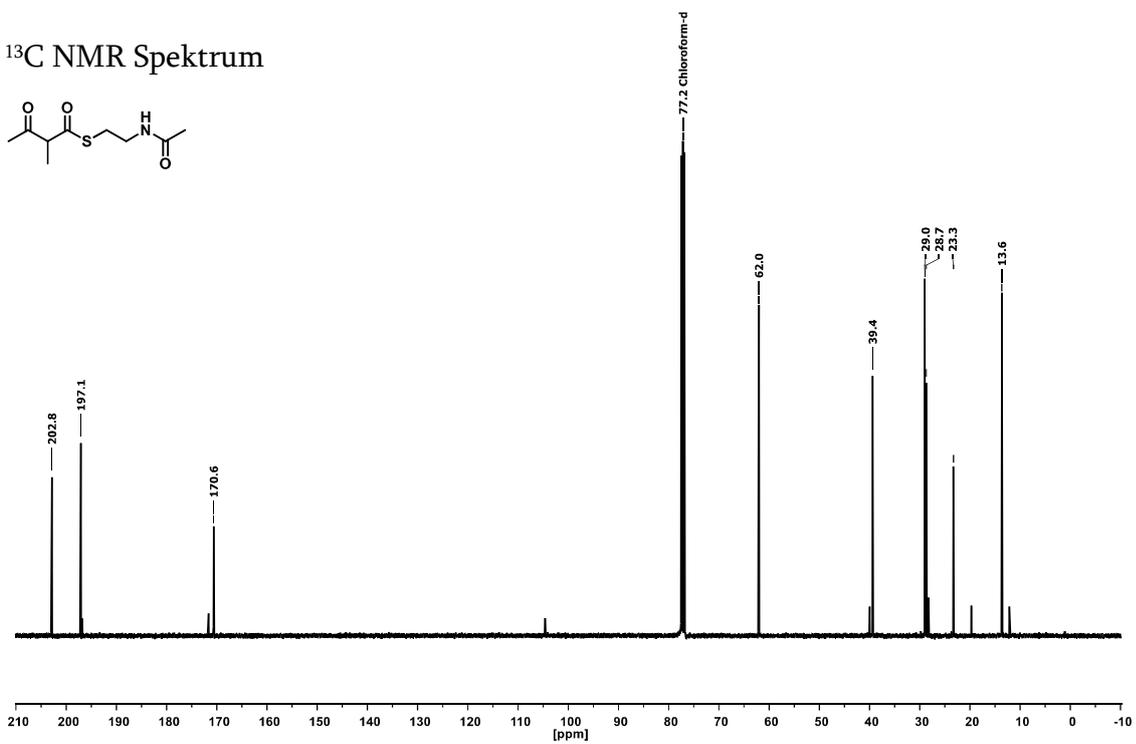
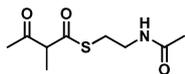
## 8.5.4 $\beta$ -Keto-SNAC-thioester und *N*-Acetylcysteamin

### 2-Methyl-3-oxobutansäure(SNAC)thioester (34)

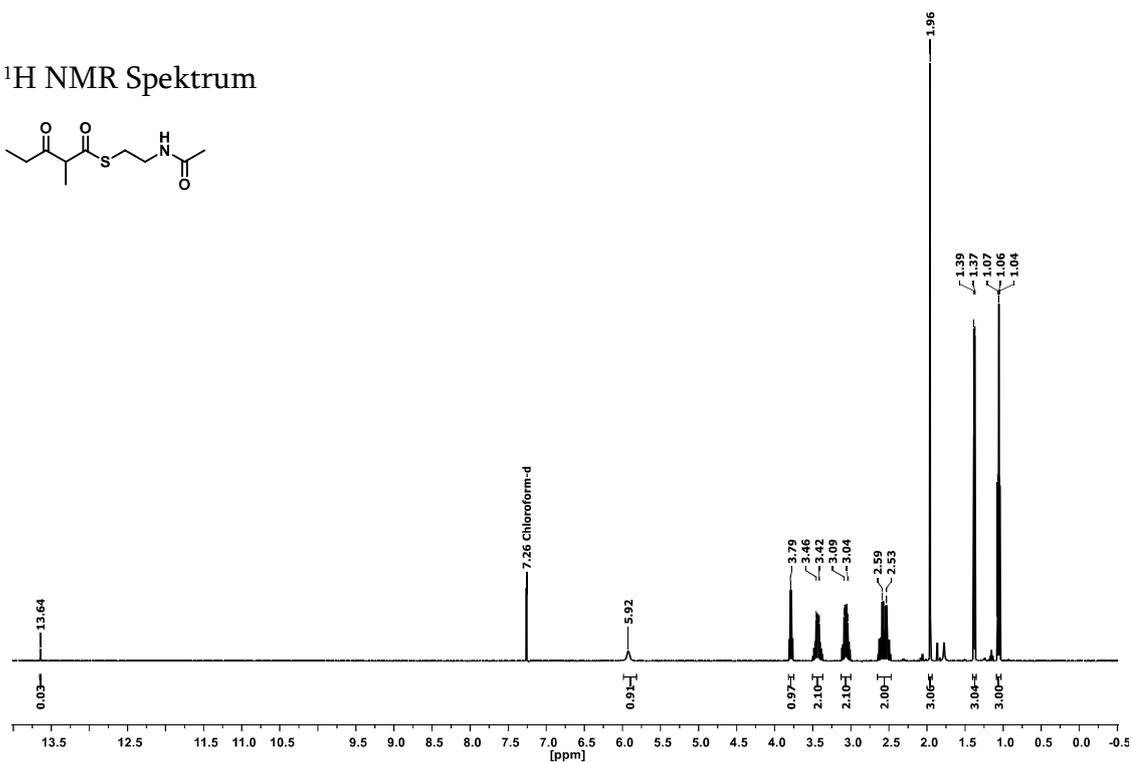
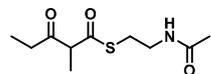
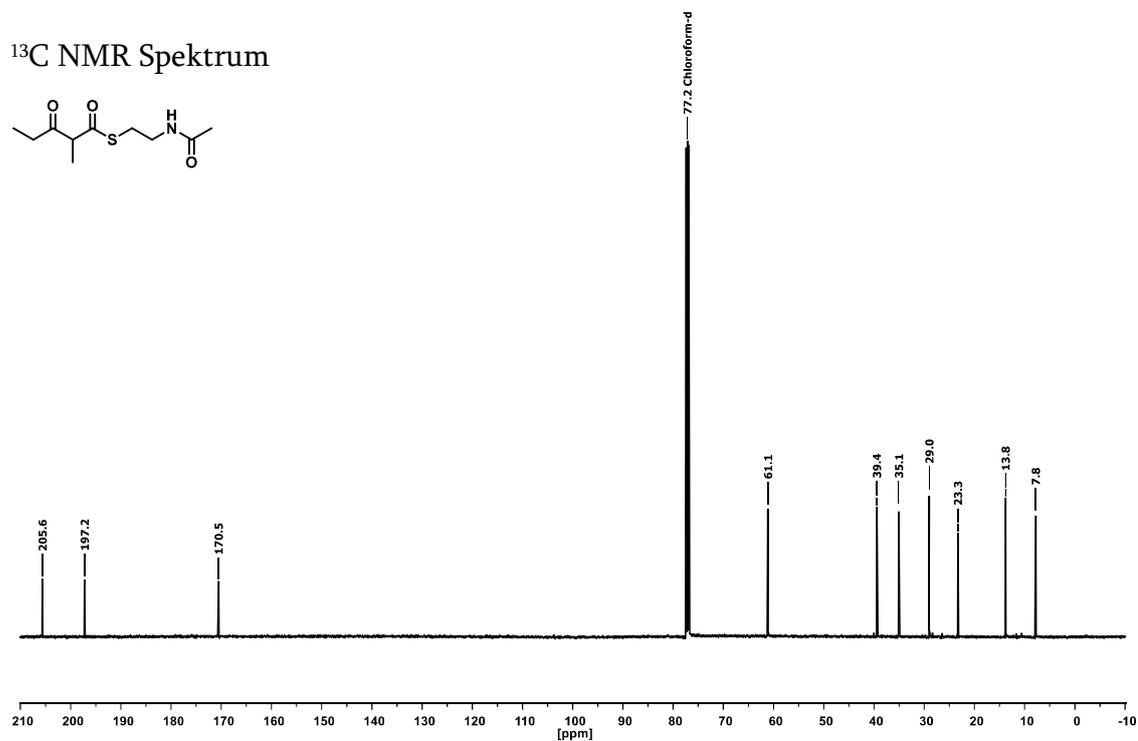
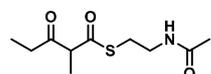
$^1\text{H}$  NMR Spektrum



$^{13}\text{C}$  NMR Spektrum

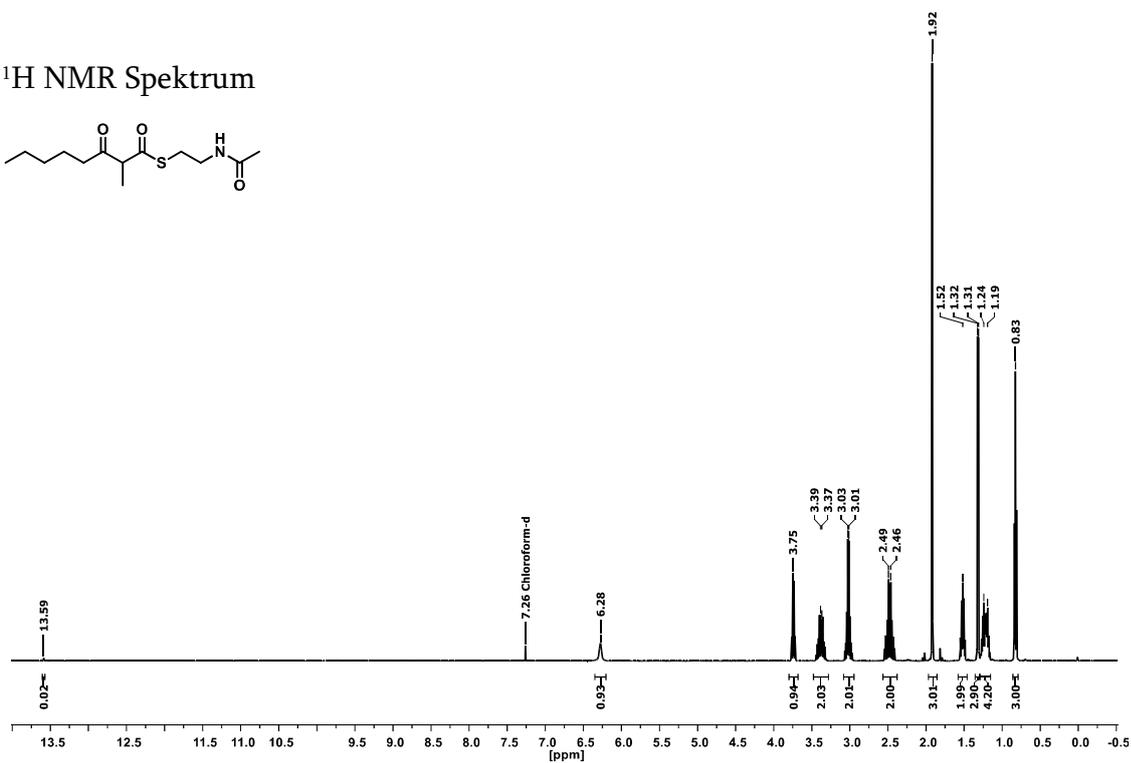
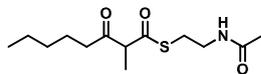


## 2-Methyl-3-oxopentansäure(SNAC)thioester (35)

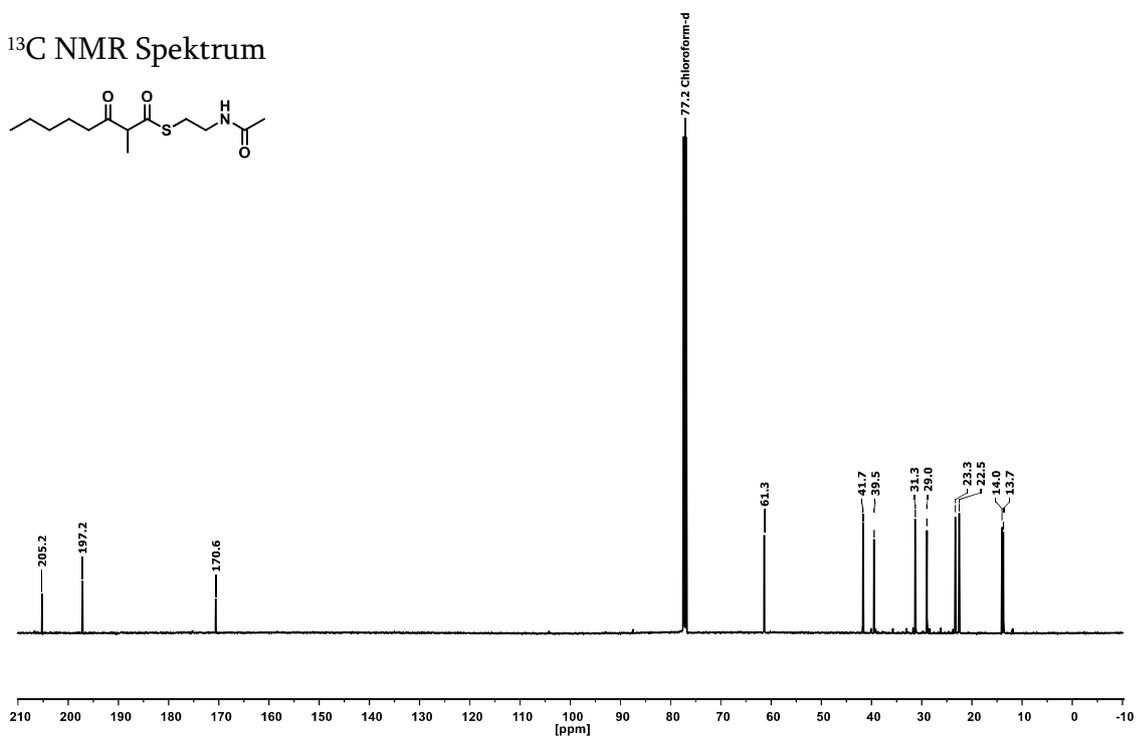
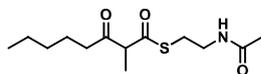
 $^1\text{H}$  NMR Spektrum $^{13}\text{C}$  NMR Spektrum

## 2-Methyl-3-oxooctansäure(SNAC)thioester (101)

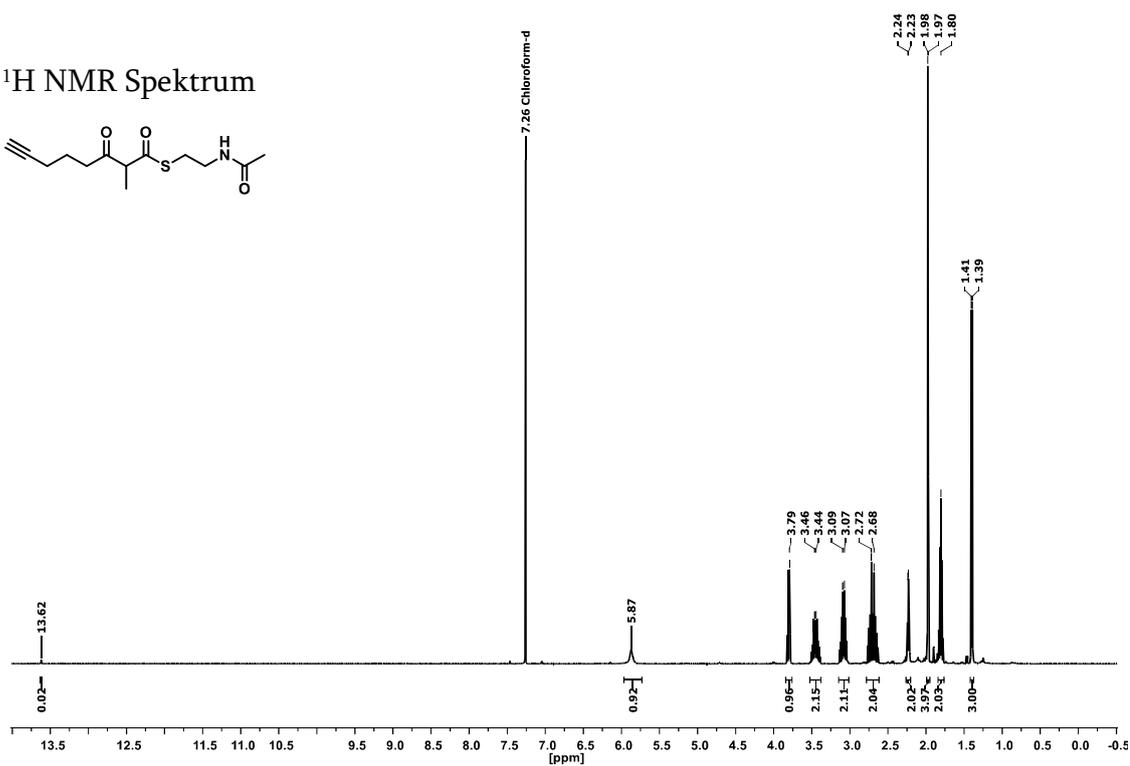
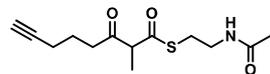
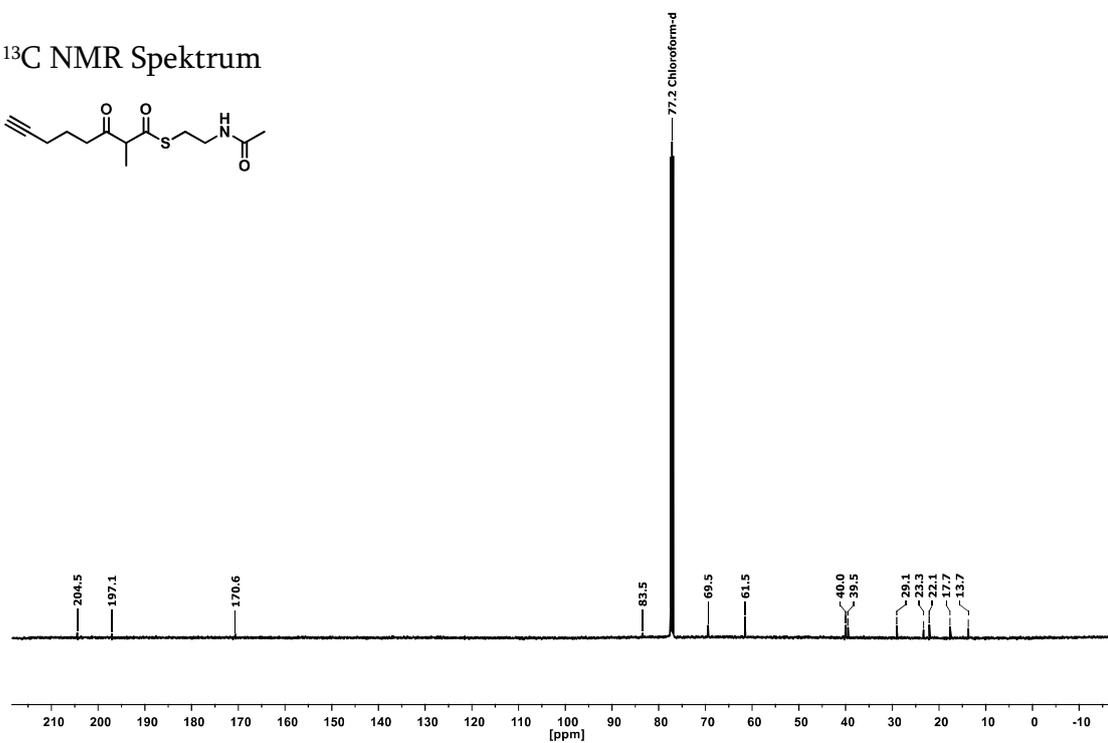
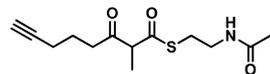
<sup>1</sup>H NMR Spektrum



<sup>13</sup>C NMR Spektrum

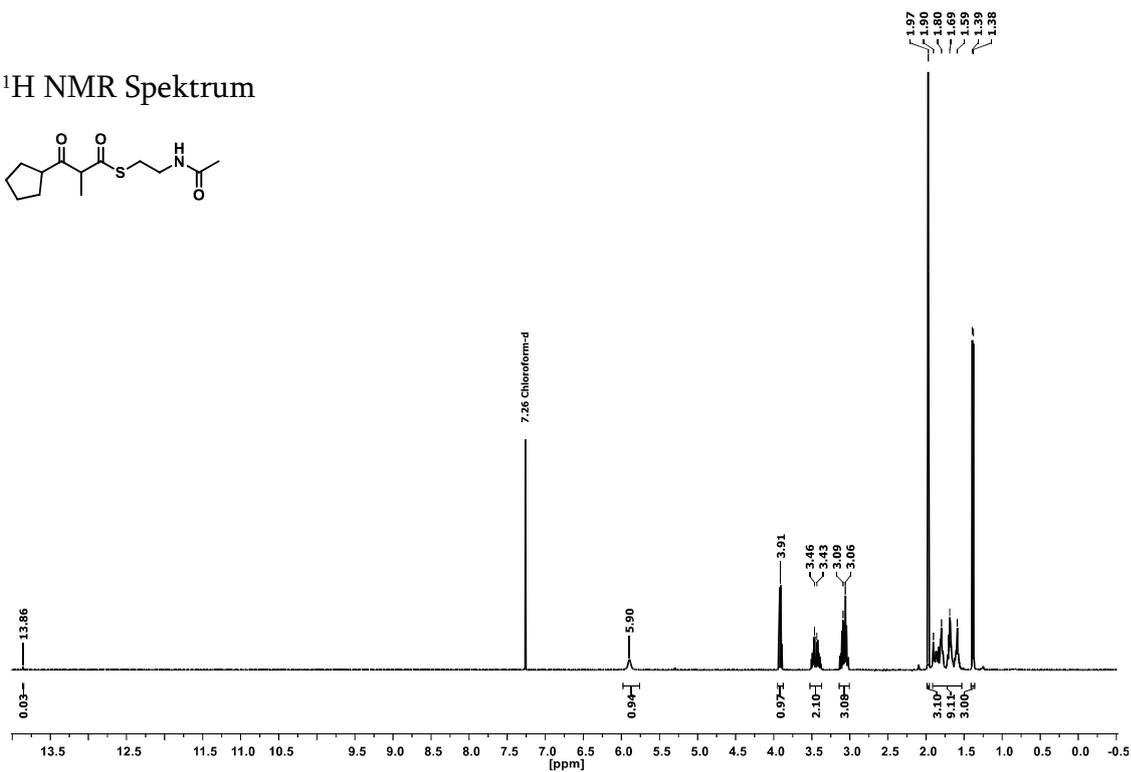
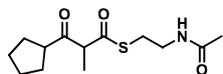


## 2-Methyl-3-oxo-7-octinsäure(SNAC)thioester (102)

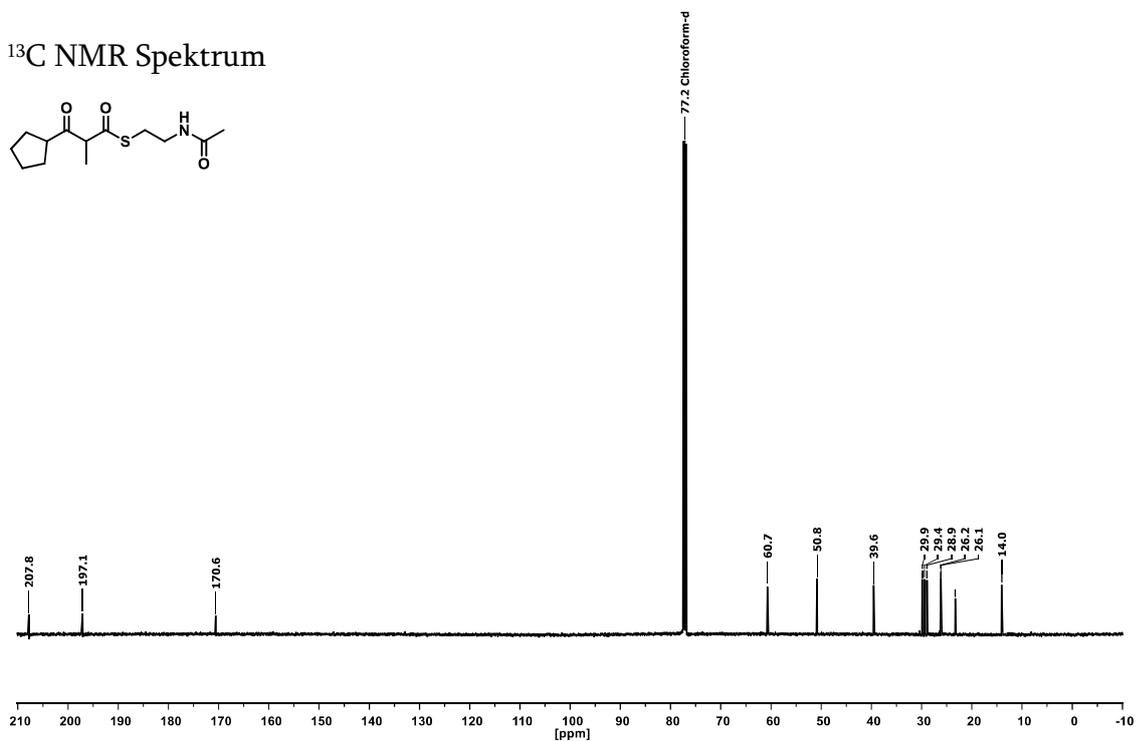
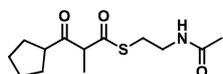
<sup>1</sup>H NMR Spektrum<sup>13</sup>C NMR Spektrum

### 3-Cyclopentyl-2-methyl-3-oxopropansäure(SNAC)thioester (103)

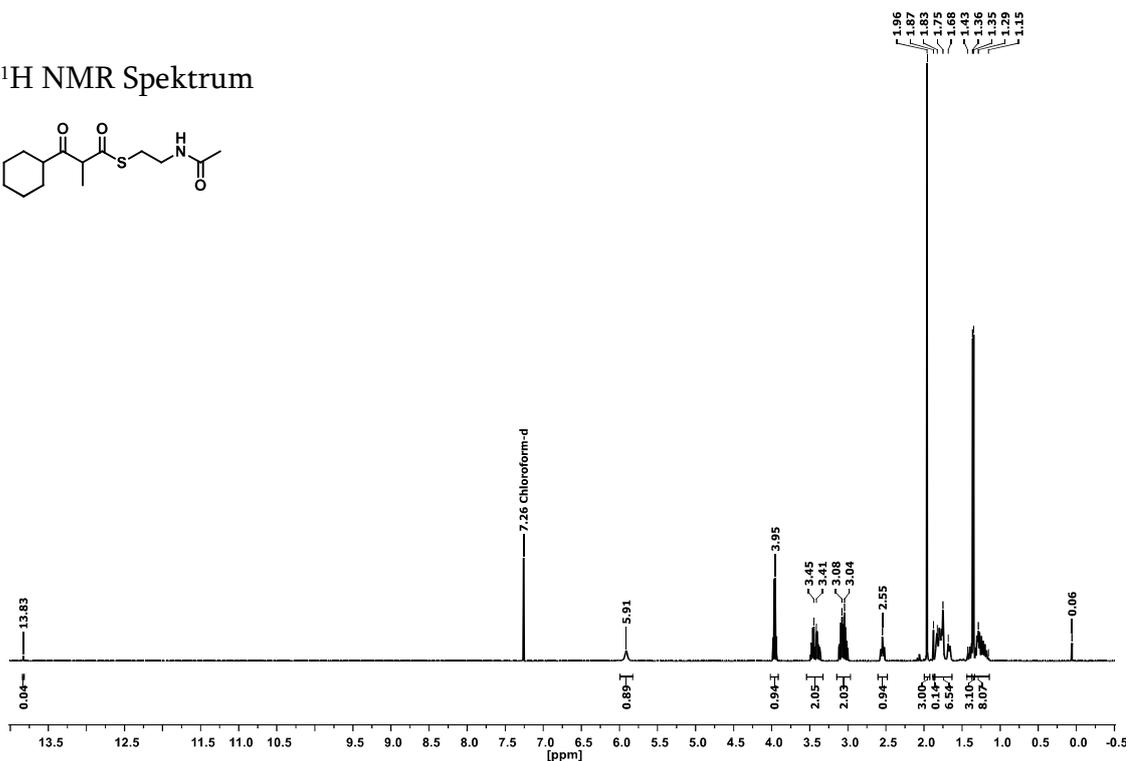
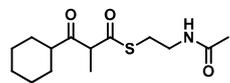
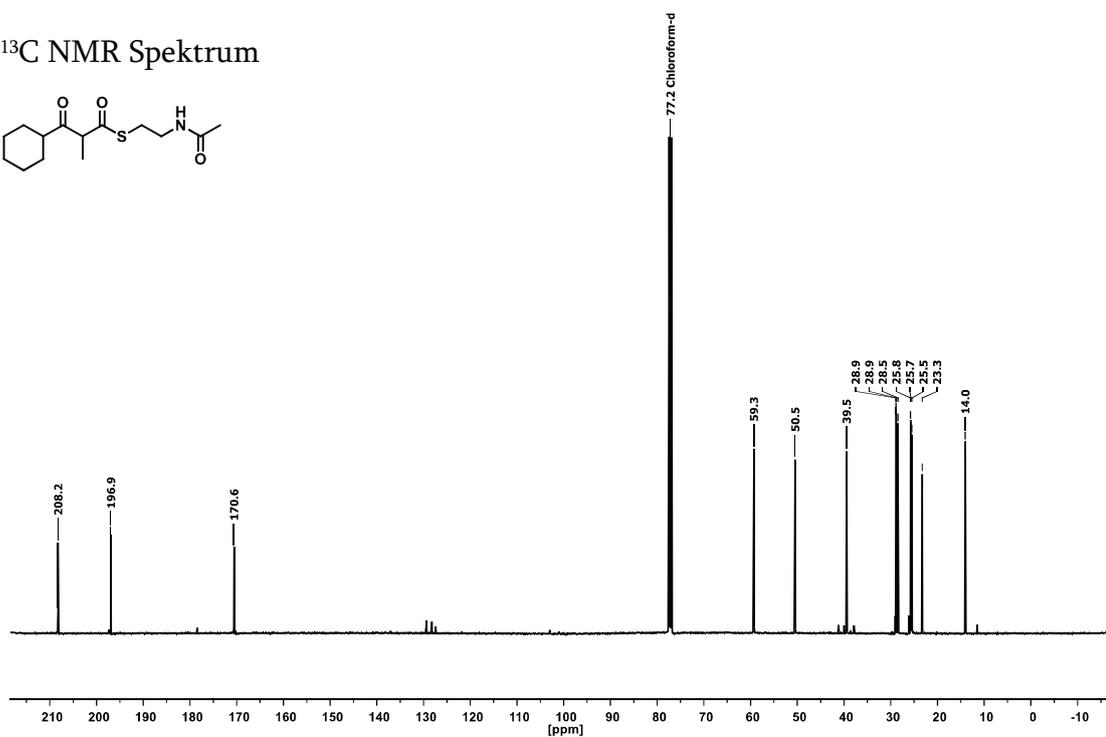
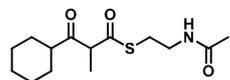
<sup>1</sup>H NMR Spektrum



<sup>13</sup>C NMR Spektrum

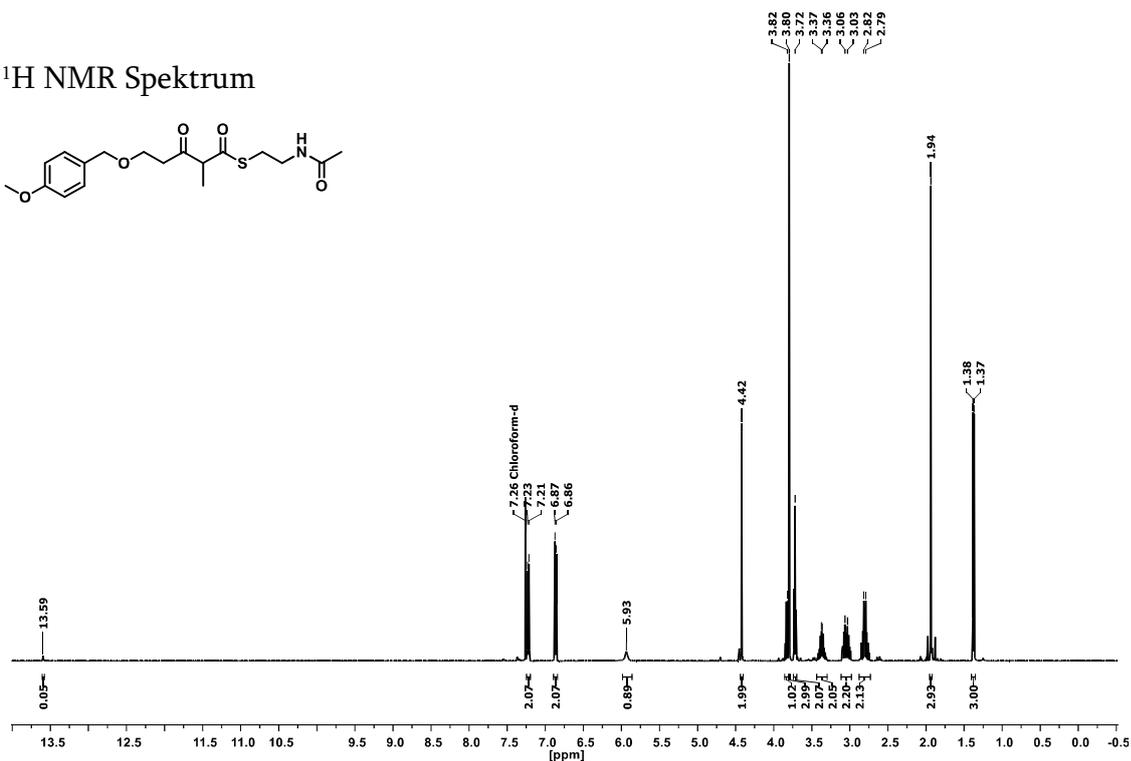
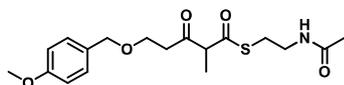


## 3-Cyclopentyl-2-methyl-3-oxopropansäure(SNAC)thioester (104)

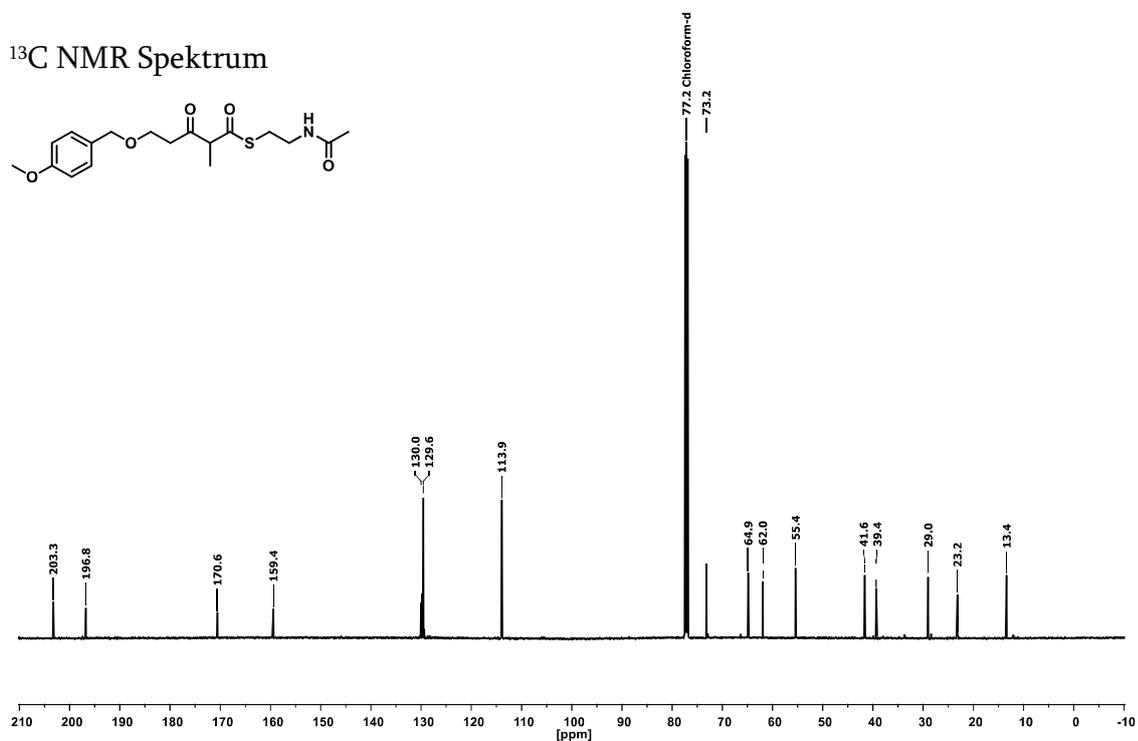
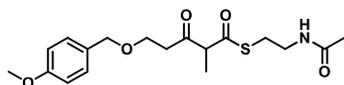
<sup>1</sup>H NMR Spektrum<sup>13</sup>C NMR Spektrum

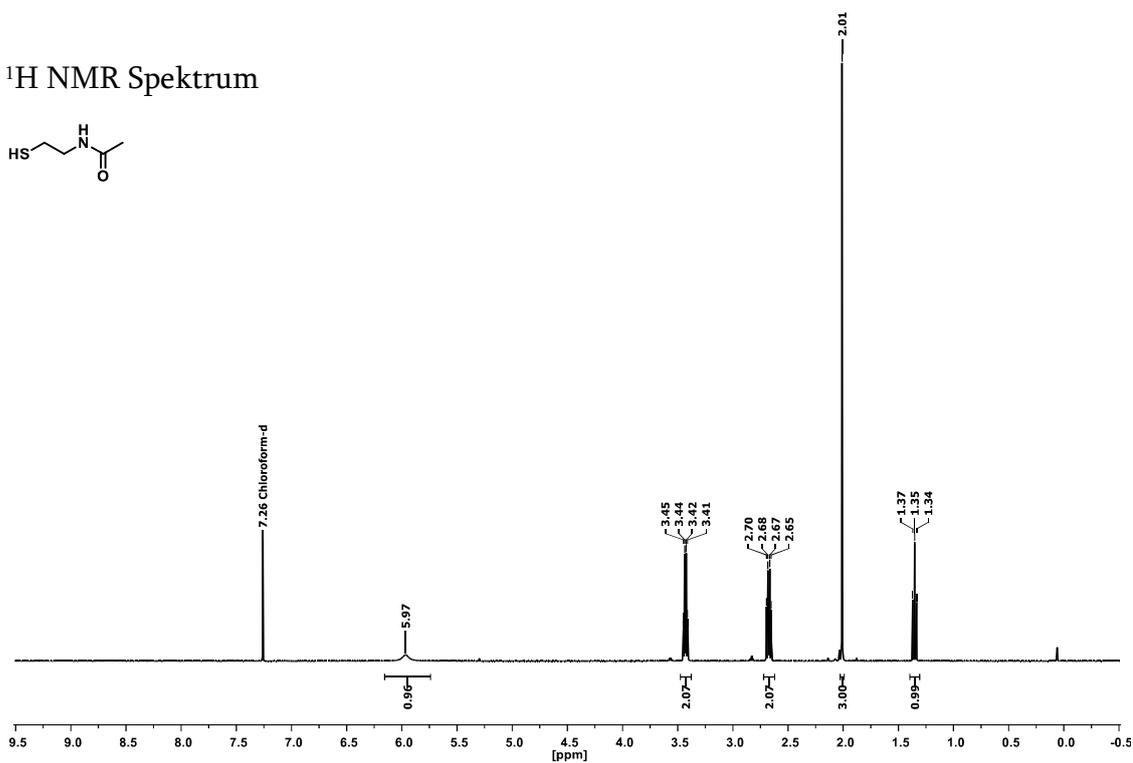
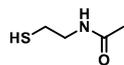
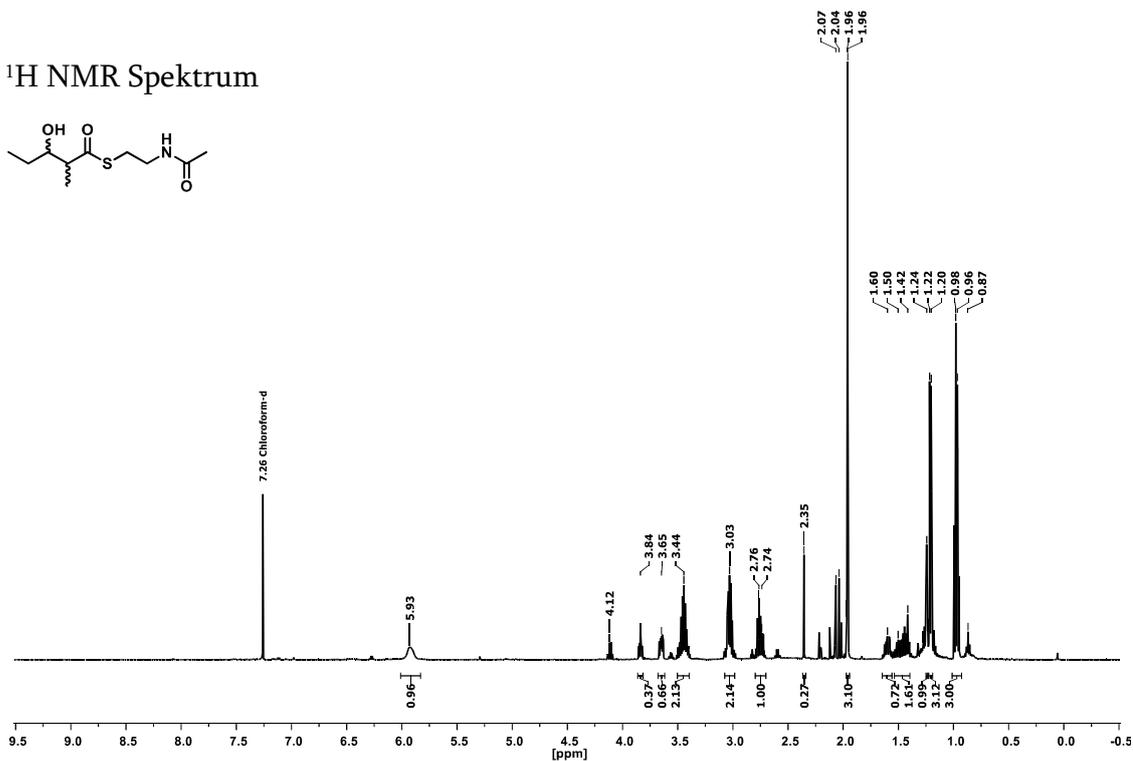
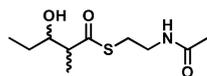
## 5-((4-Methoxybenzyl)oxy)-2-methyl-3-oxopentansäure(SNAC)thioester (105)

<sup>1</sup>H NMR Spektrum



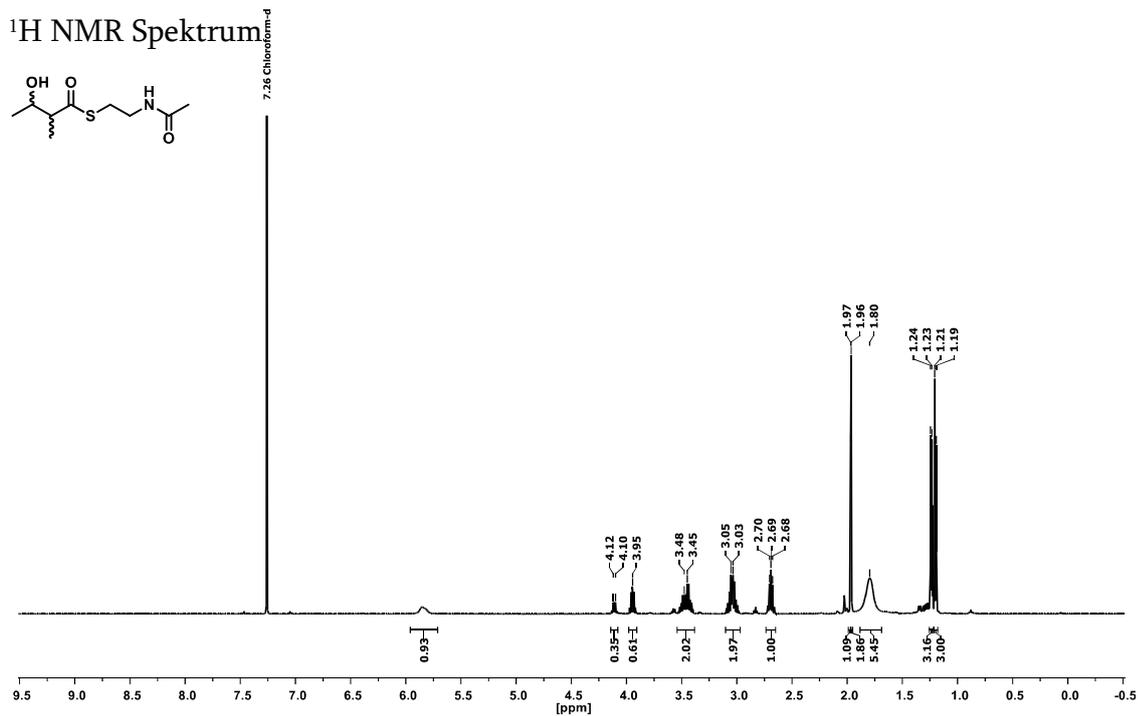
<sup>13</sup>C NMR Spektrum



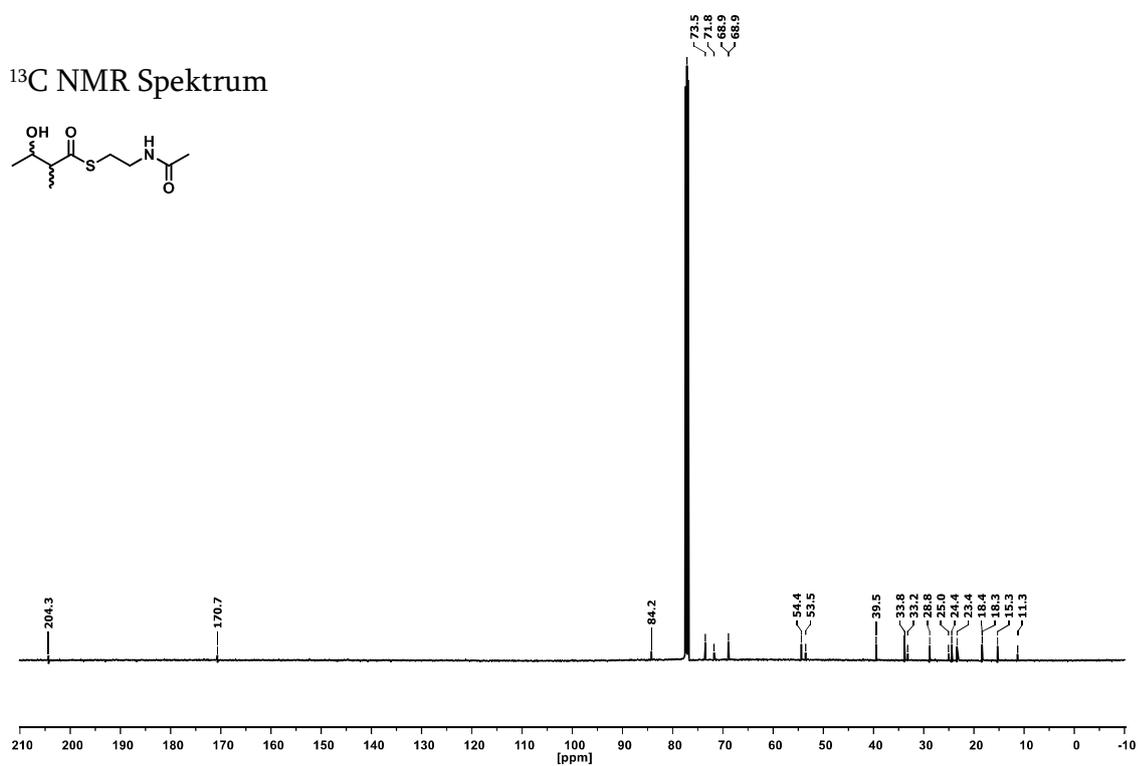
**N-Acetylcysteamin (58)**<sup>1</sup>H NMR Spektrum**8.5.5 β-Alkohol-SNAC-thioester****3-Hydroxy-2-methylpentansäure(SNAC)thioester (107)**<sup>1</sup>H NMR Spektrum

### 3-Hydroxy-2-methylbutansäure(SNAC)thioester (108)

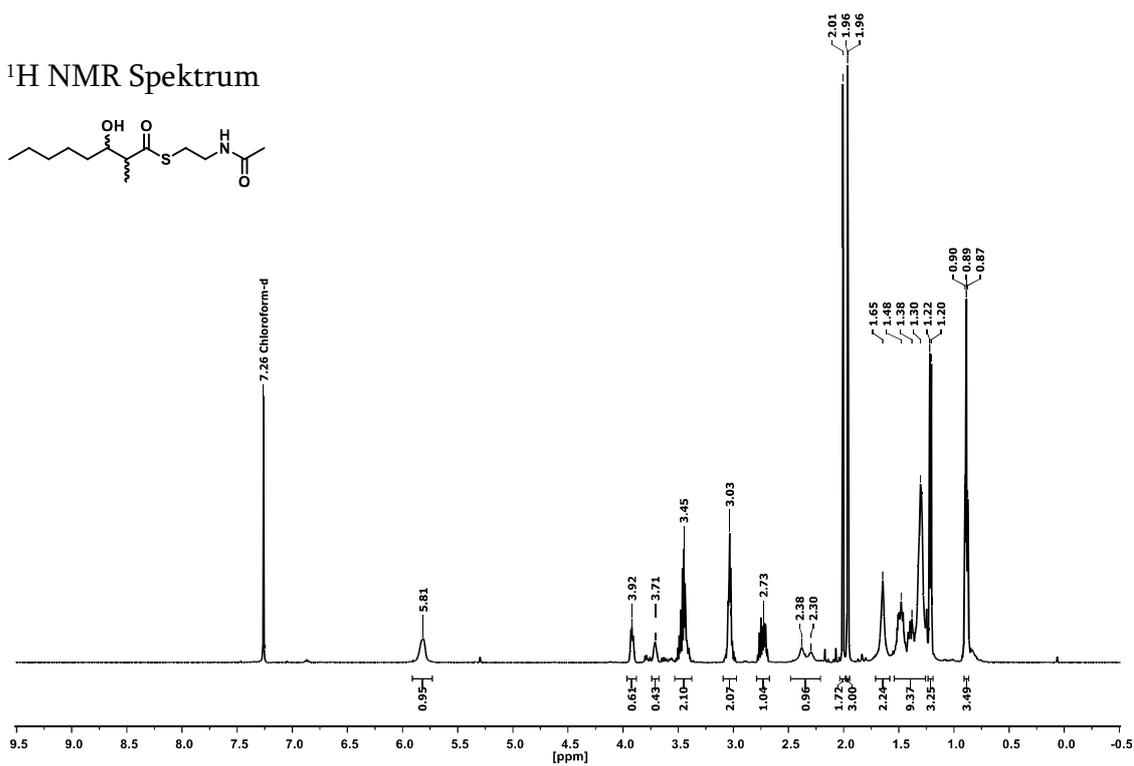
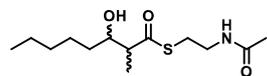
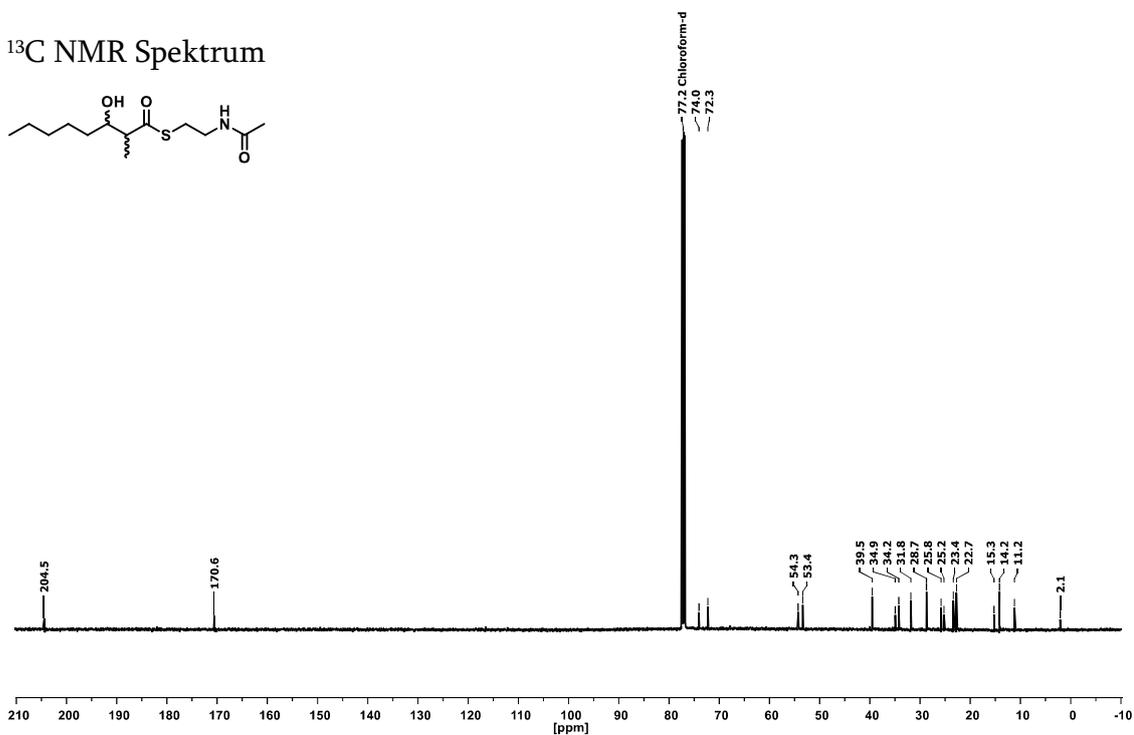
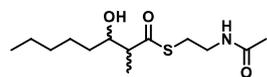
<sup>1</sup>H NMR Spektrum



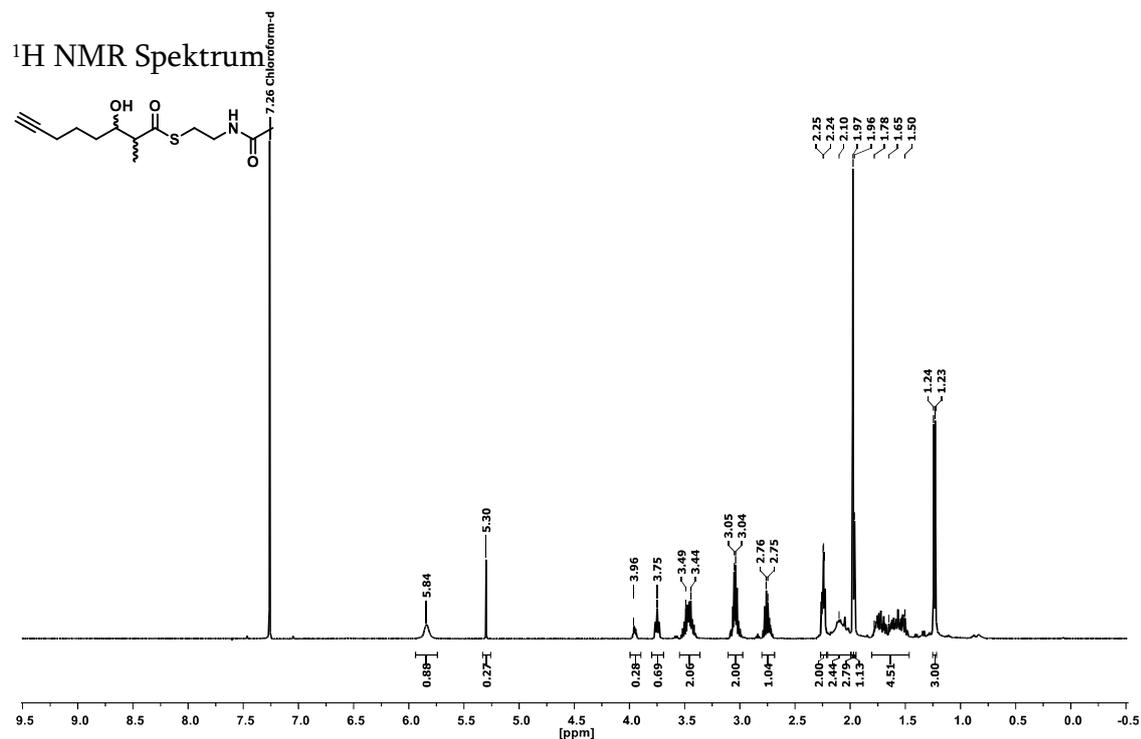
<sup>13</sup>C NMR Spektrum



## 3-Hydroxy-2-methyloctansäure(SNAC)thioester (109)

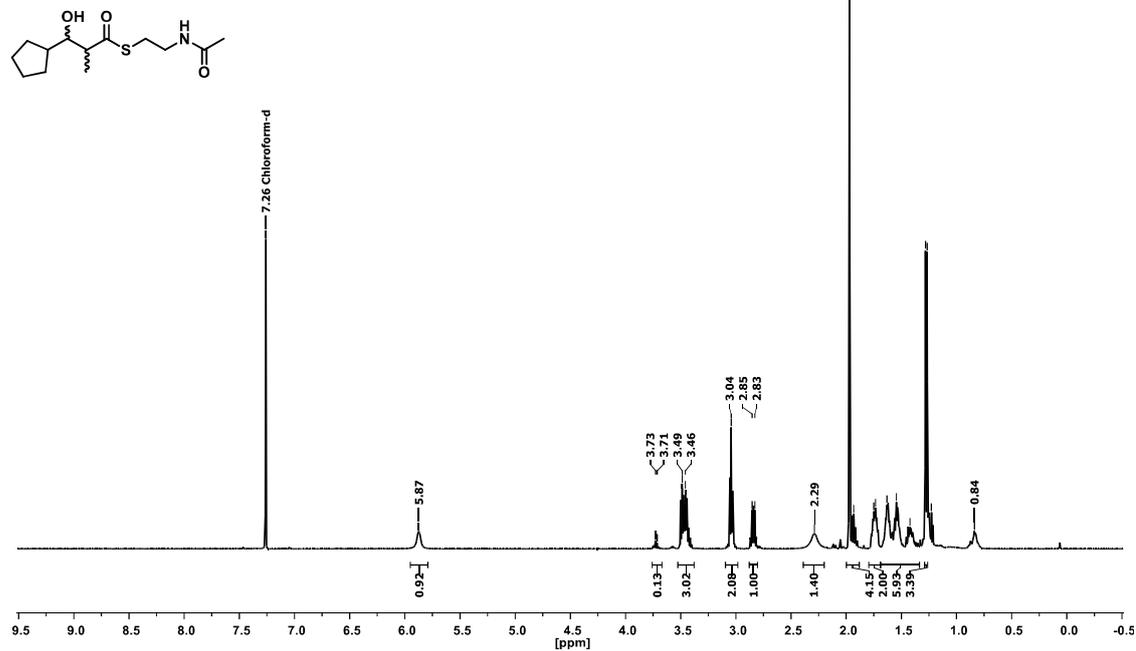
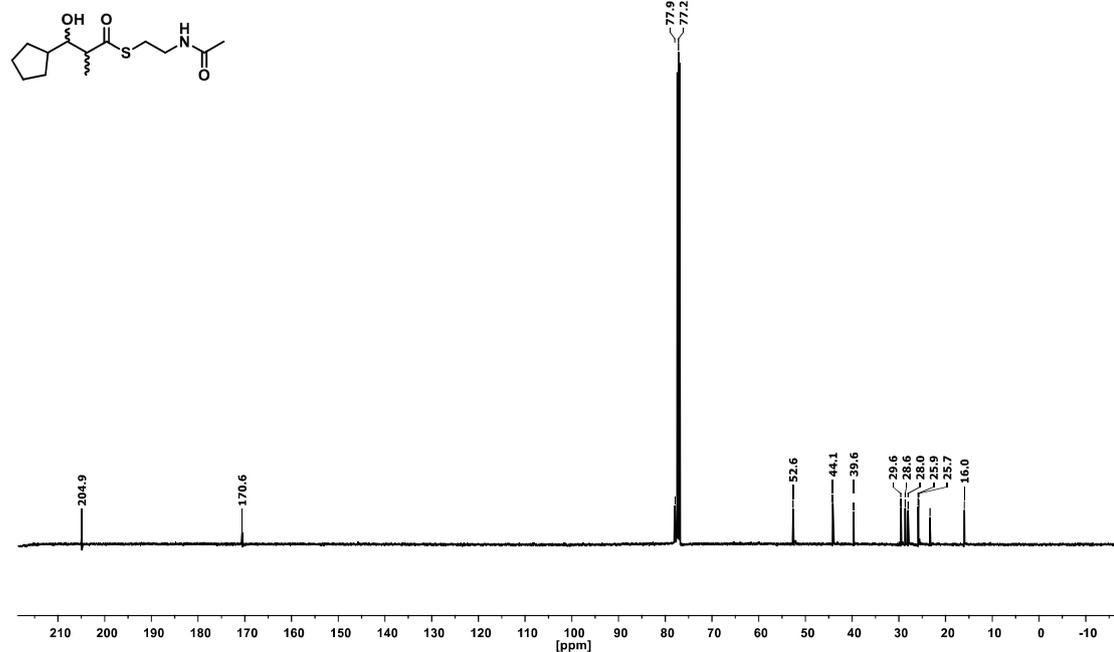
<sup>1</sup>H NMR Spektrum<sup>13</sup>C NMR Spektrum

### 3-Hydroxy-2-methyl-7-octinsäure(SNAC)thioester (110)



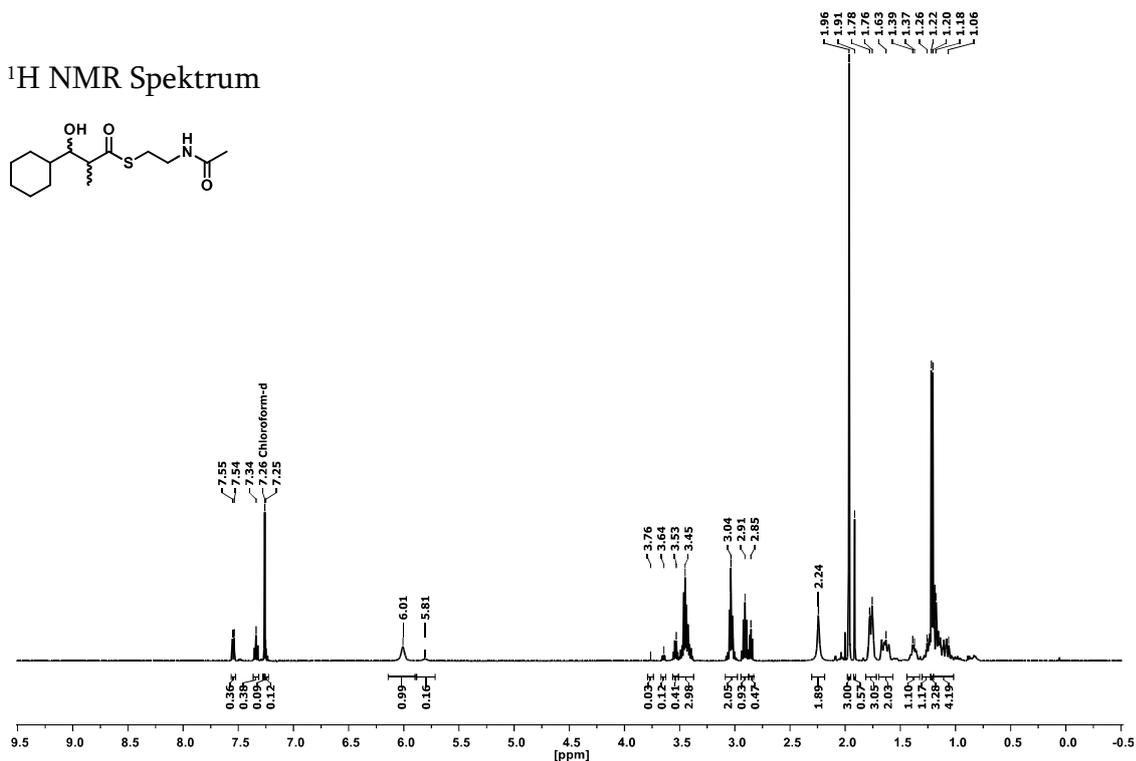
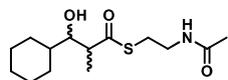
### <sup>13</sup>C NMR Spektrum

## 3-Cyclopentyl-3-hydroxy-2-methylpropansäure(SNAC)thioester (111)

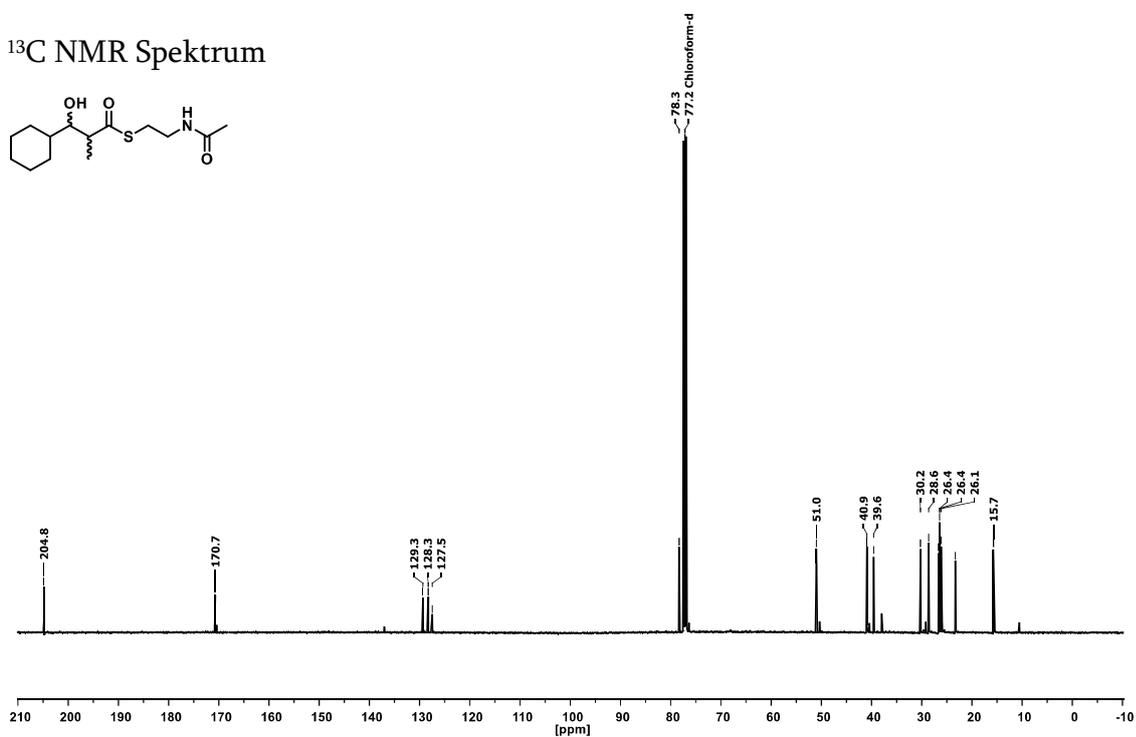
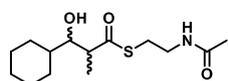
 $^1\text{H}$  NMR Spektrum $^{13}\text{C}$  NMR Spektrum

### 3-Cyclohexyl-3-hydroxy-2-methylpropansäure(SNAC)thioester (112)

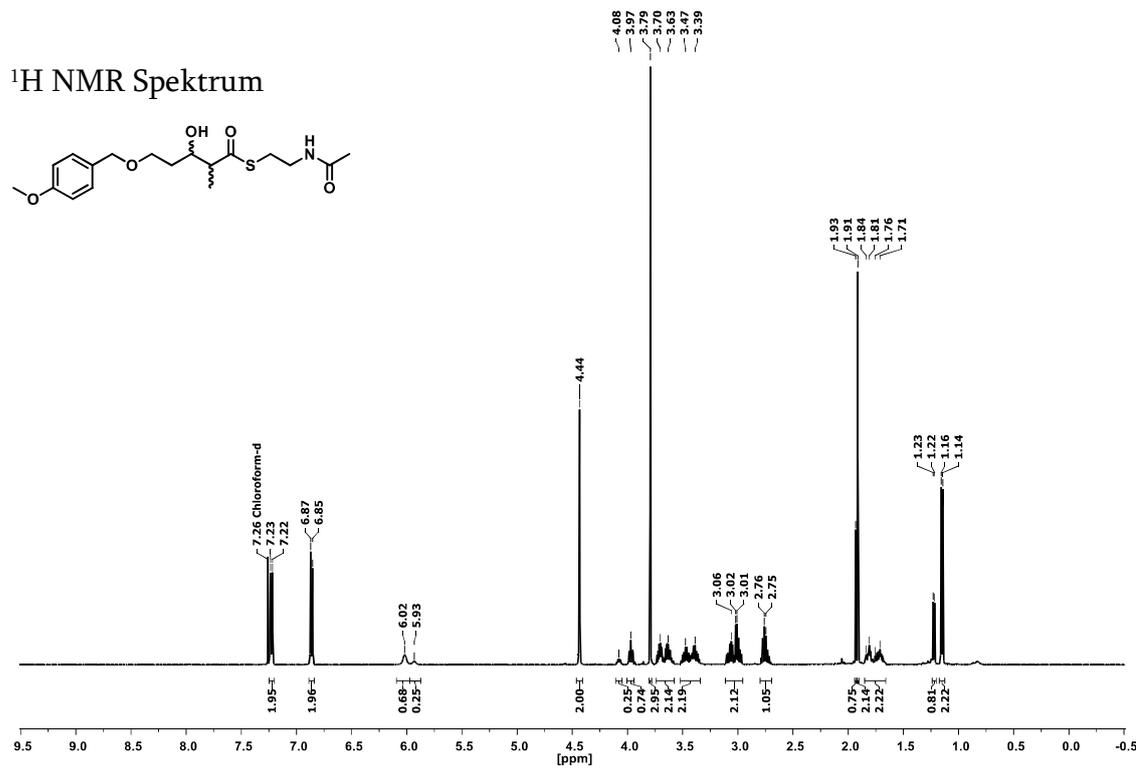
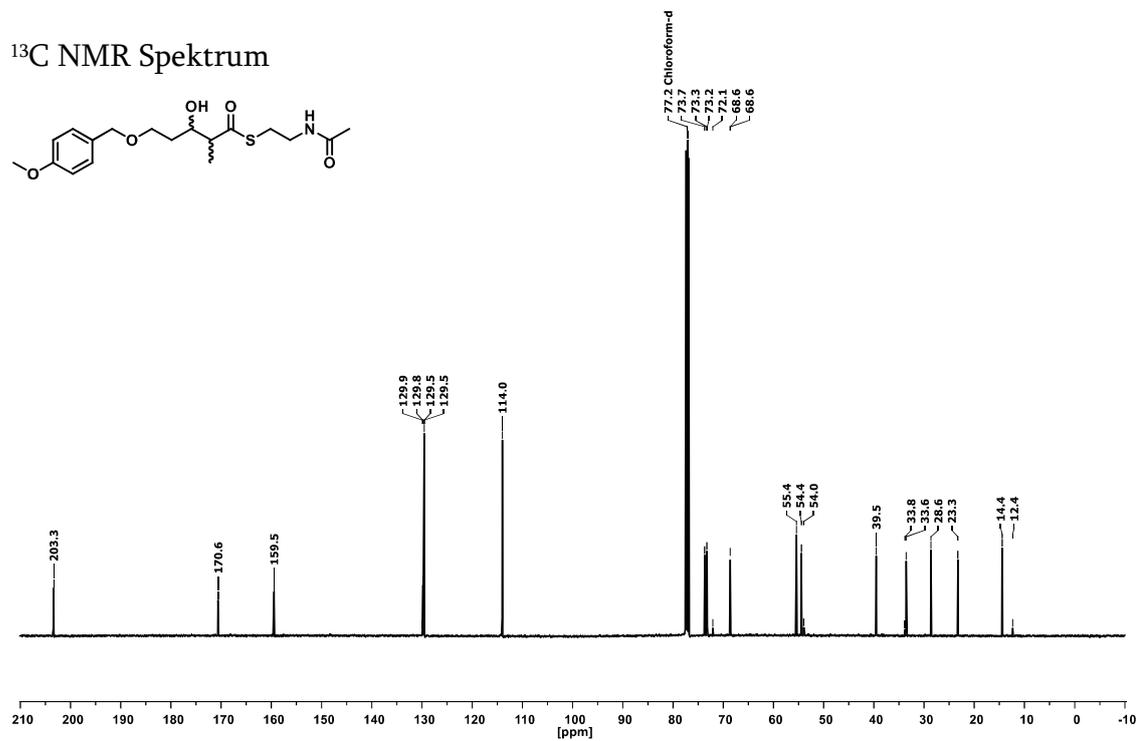
<sup>1</sup>H NMR Spektrum



<sup>13</sup>C NMR Spektrum

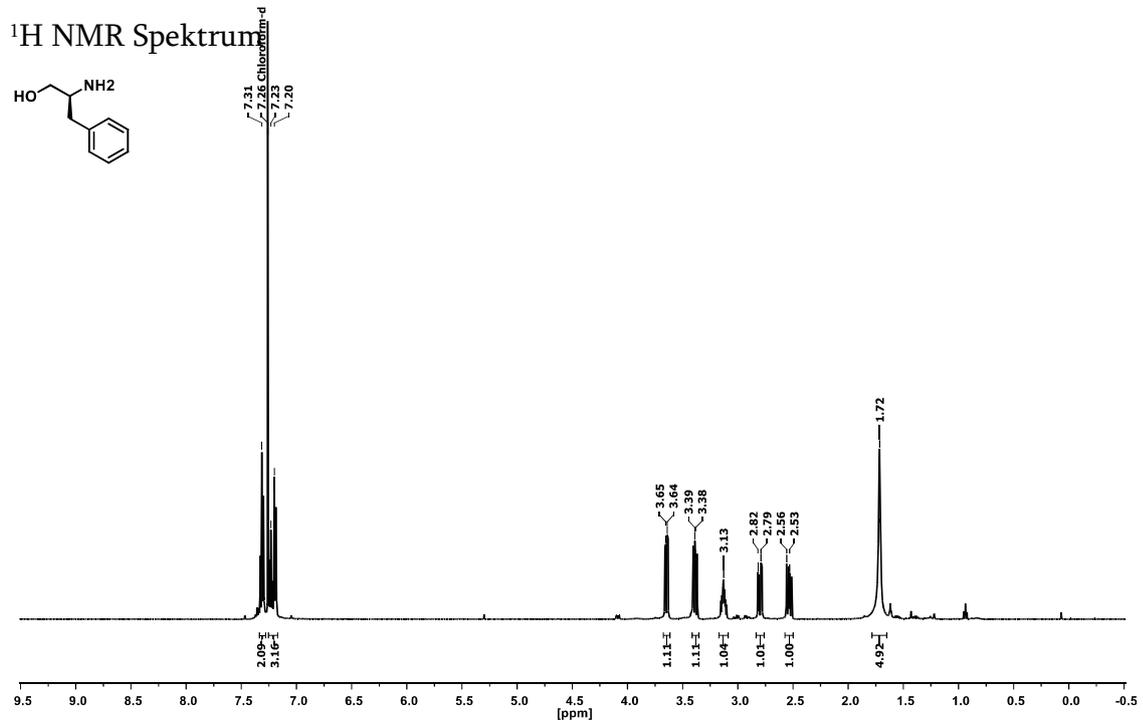


## 3-Hydroxy-5-((4-methoxybenzyl)oxy)-2-methyl-pentansäure(SNAC)thioester (113)

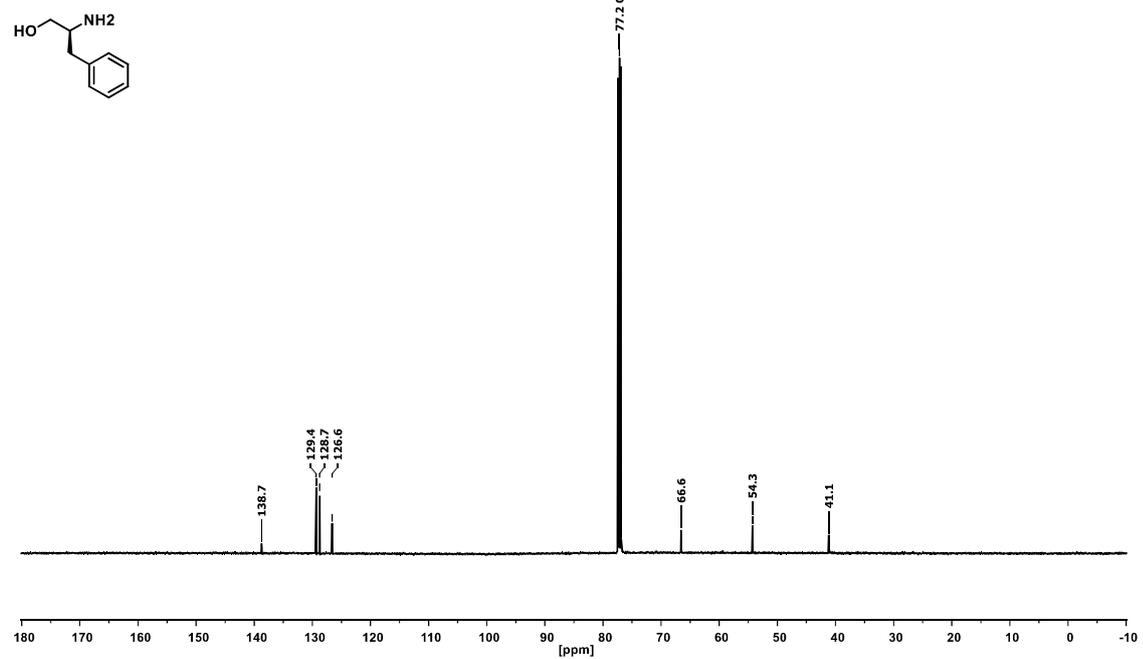
 $^1\text{H}$  NMR Spektrum $^{13}\text{C}$  NMR Spektrum

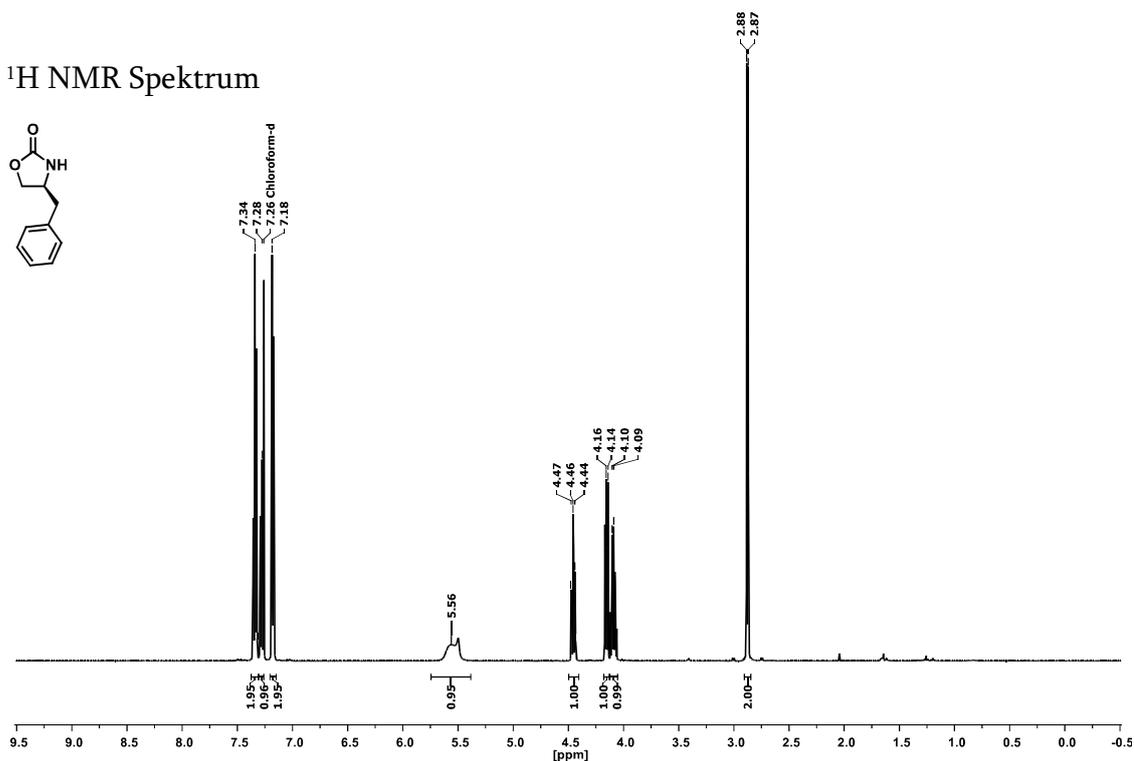
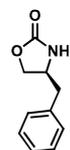
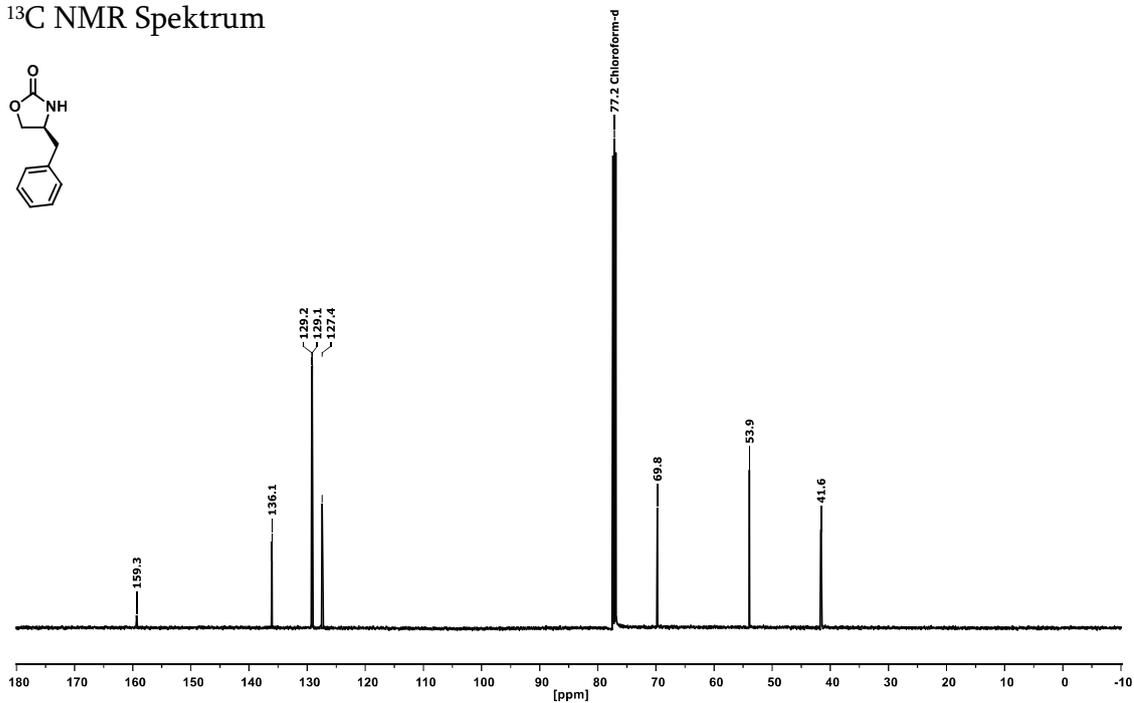
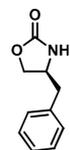
## 8.5.6 VCD-Referenzen und Vorläufer

### (S)-2-Amino-3-phenyl-1-propanol (171)



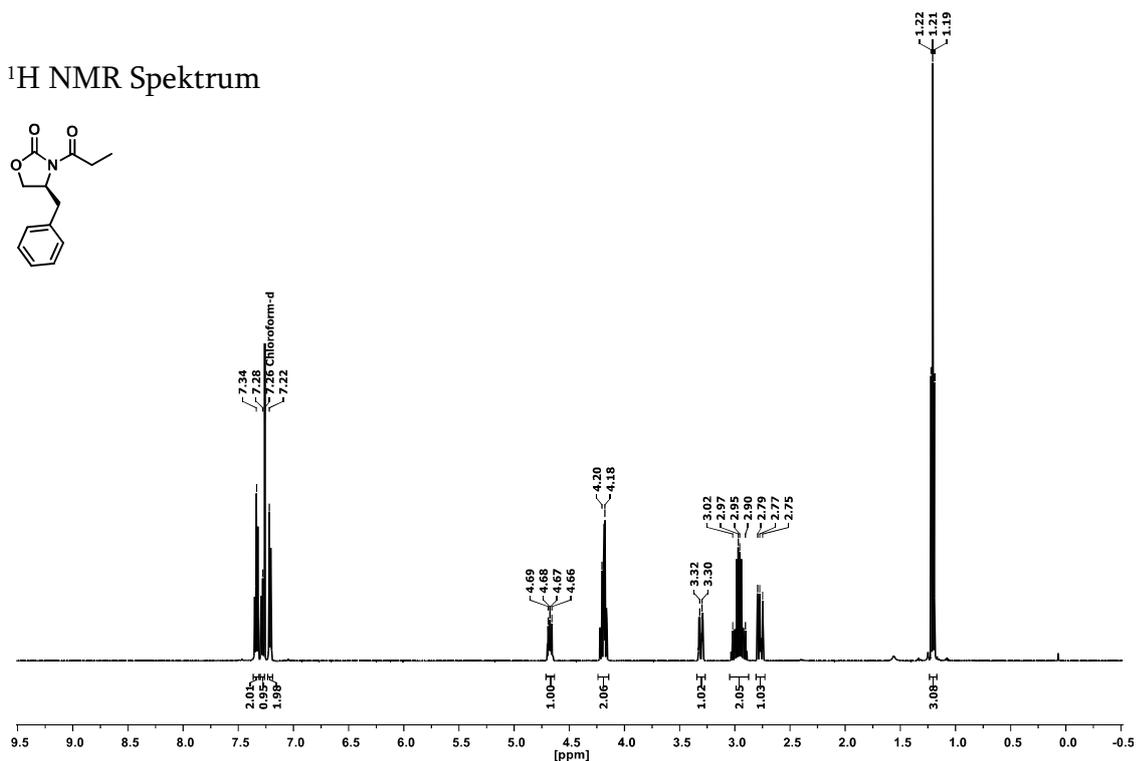
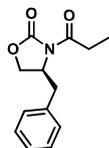
### <sup>13</sup>C NMR Spektrum



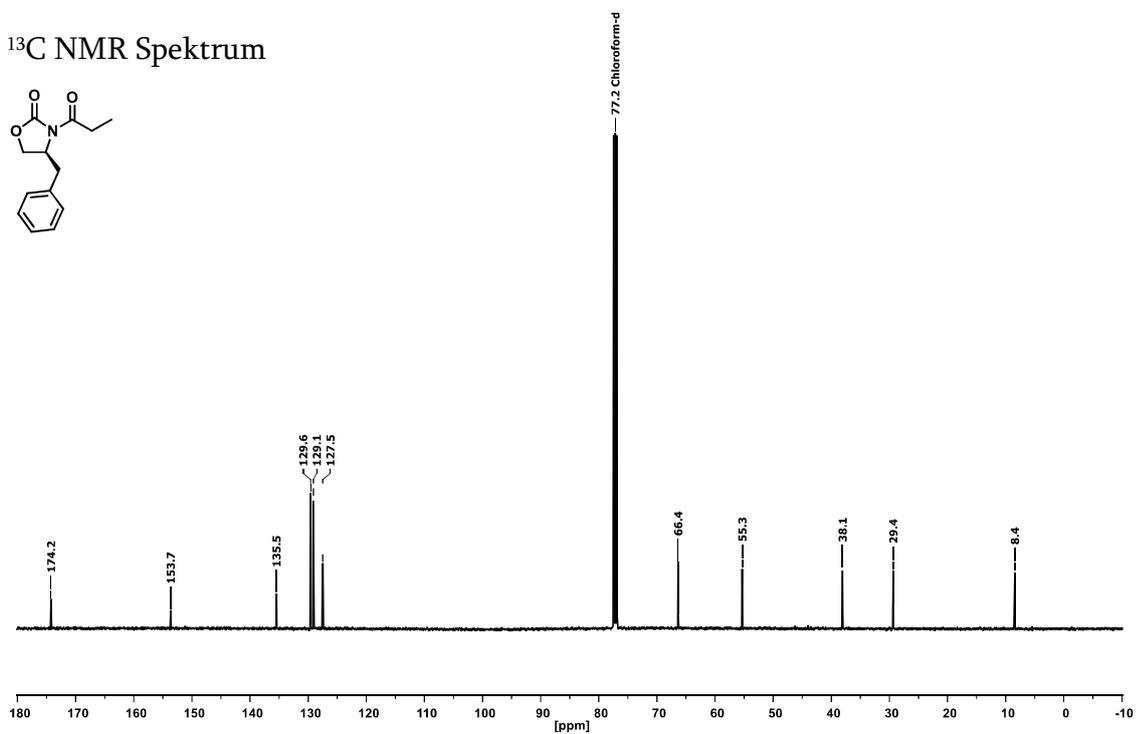
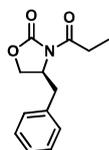
**(S)-4-Benzyl-2-oxazolidinon (173)**<sup>1</sup>H NMR Spektrum<sup>13</sup>C NMR Spektrum

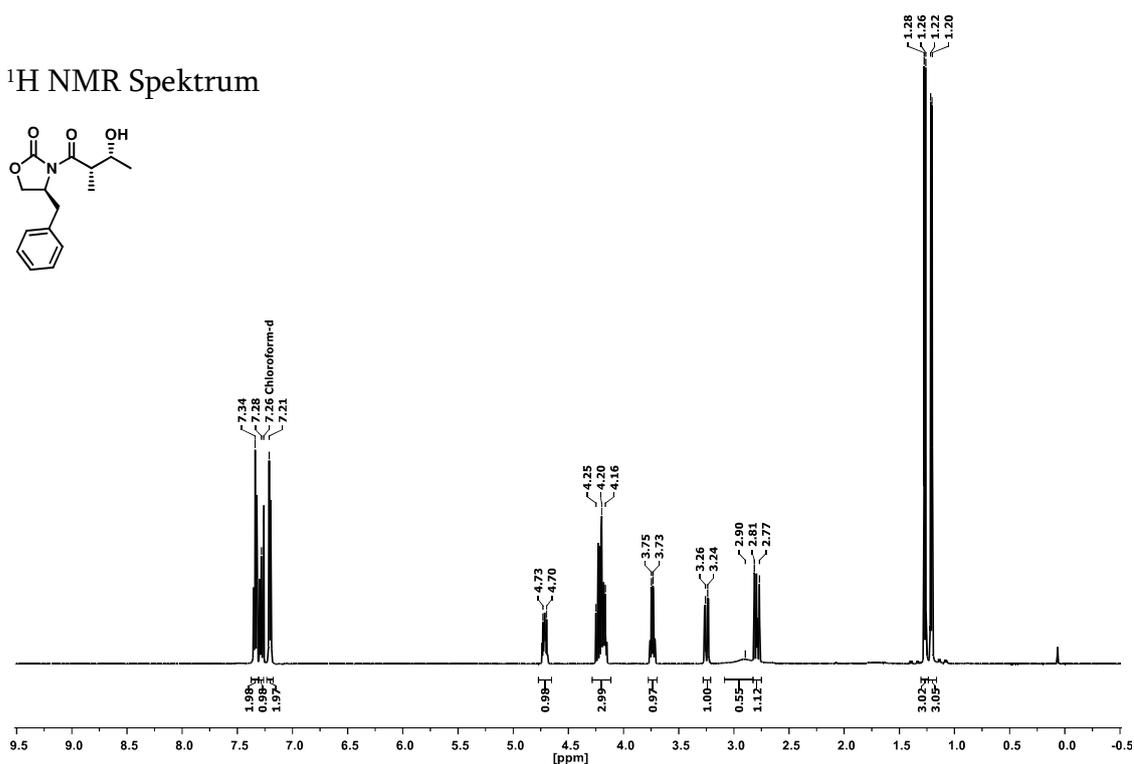
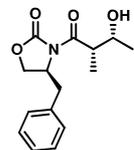
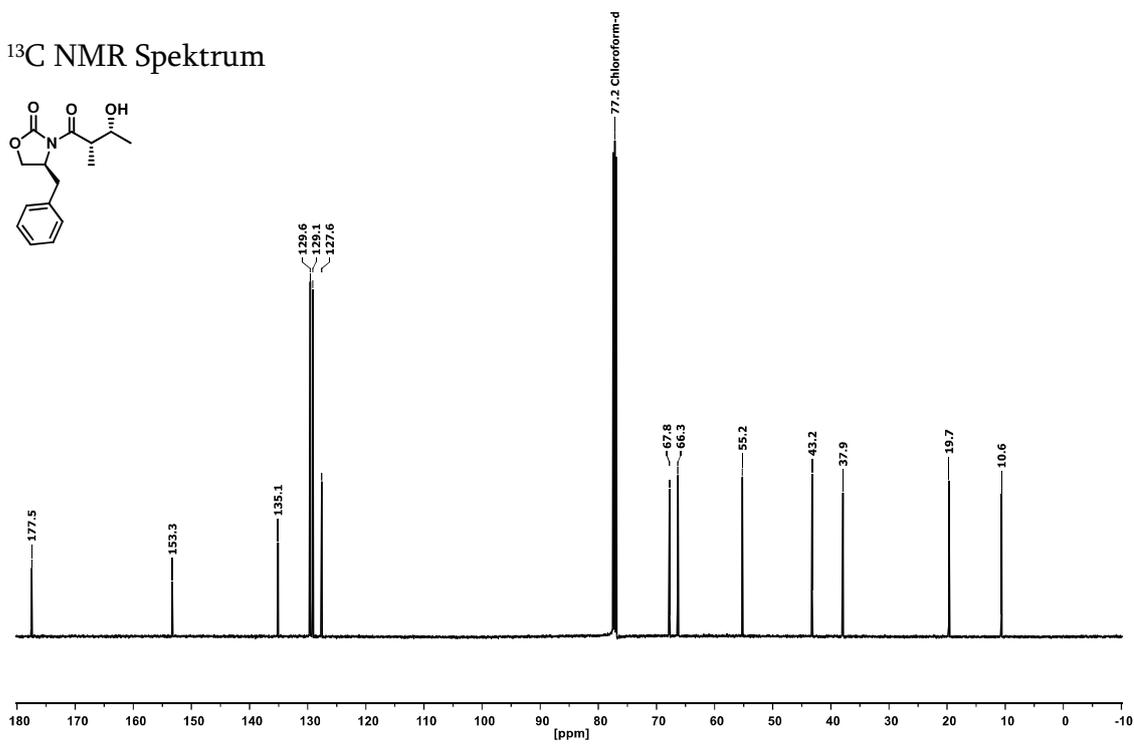
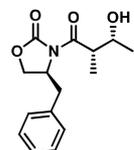
## (S)-4-Benzyl-3-propionyl-2-oxazolidinon (114)

<sup>1</sup>H NMR Spektrum



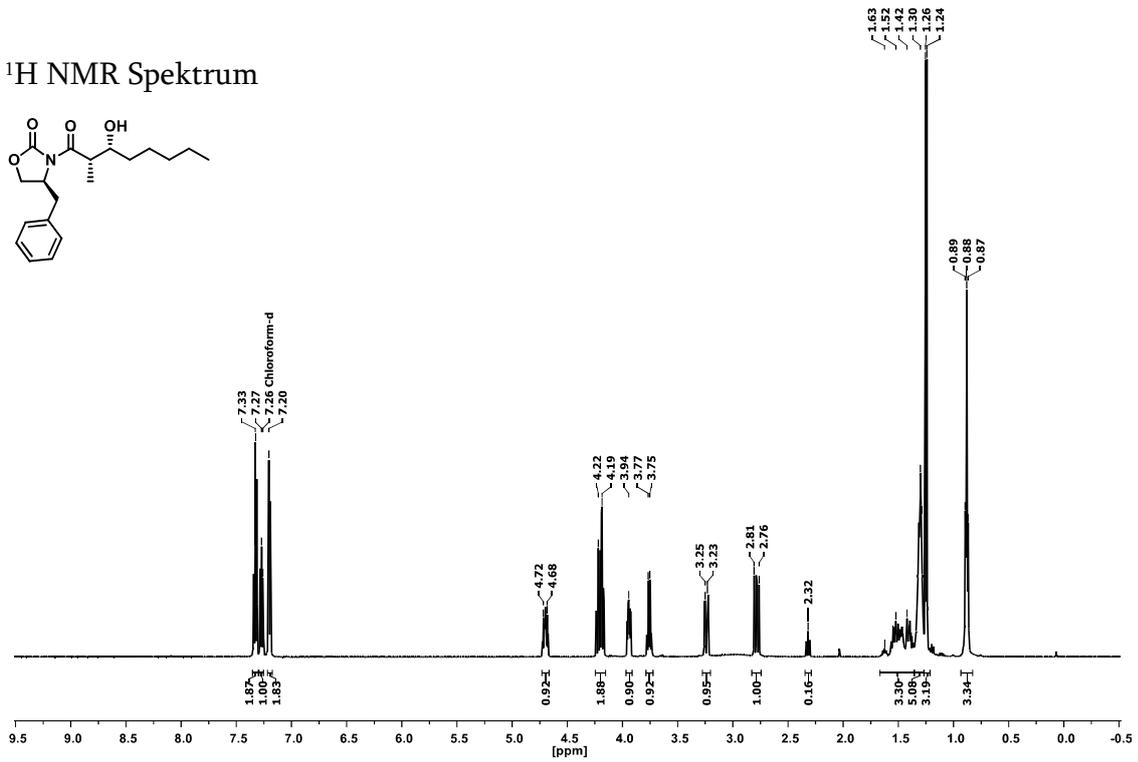
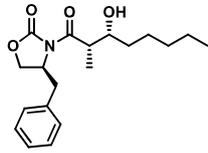
<sup>13</sup>C NMR Spektrum



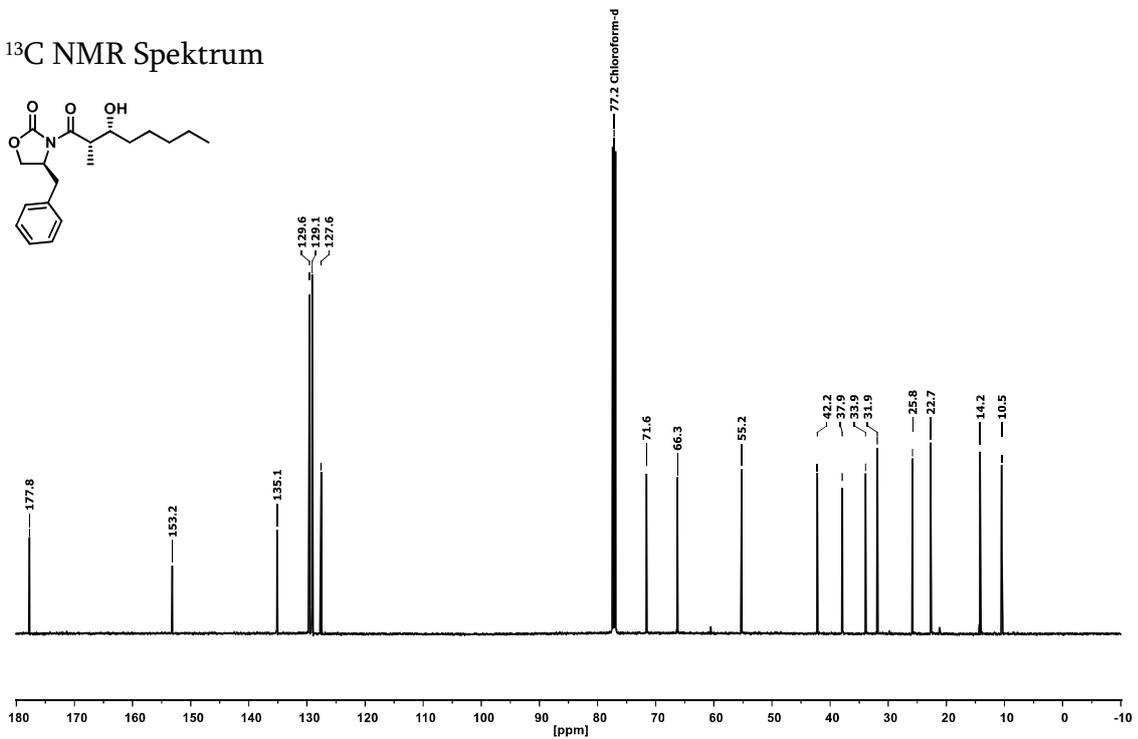
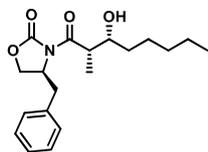
**(S)-4-Benzyl-3-((2S,3R)-3-hydroxy-2-methylbutanoyl)-2-oxazolidinon (115a)**<sup>1</sup>H NMR Spektrum<sup>13</sup>C NMR Spektrum

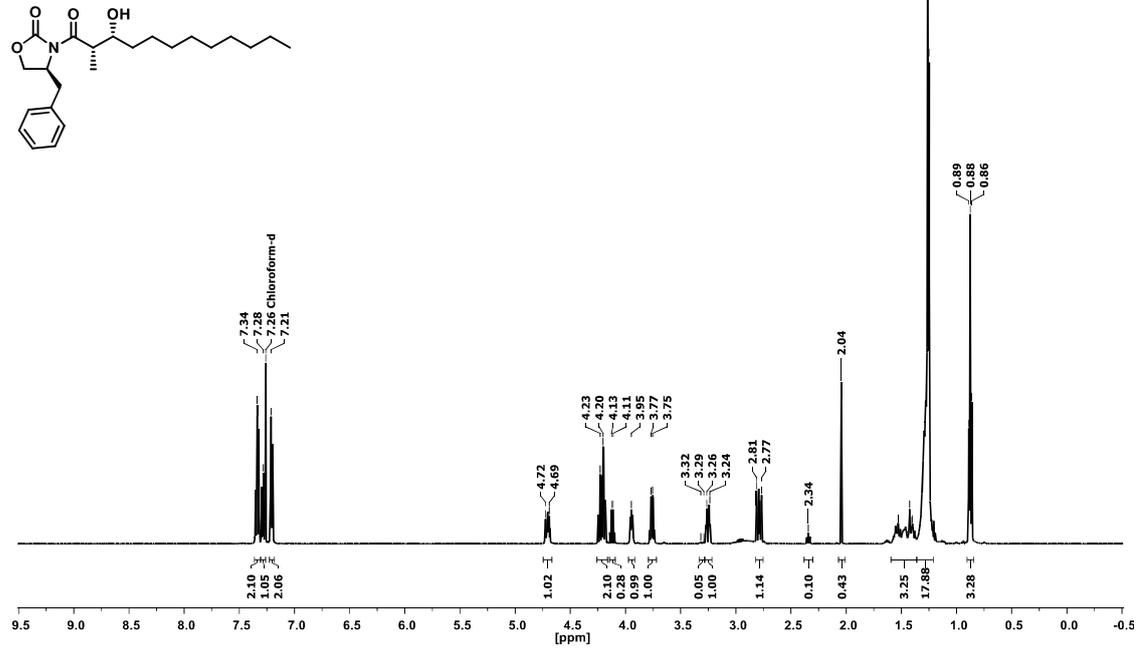
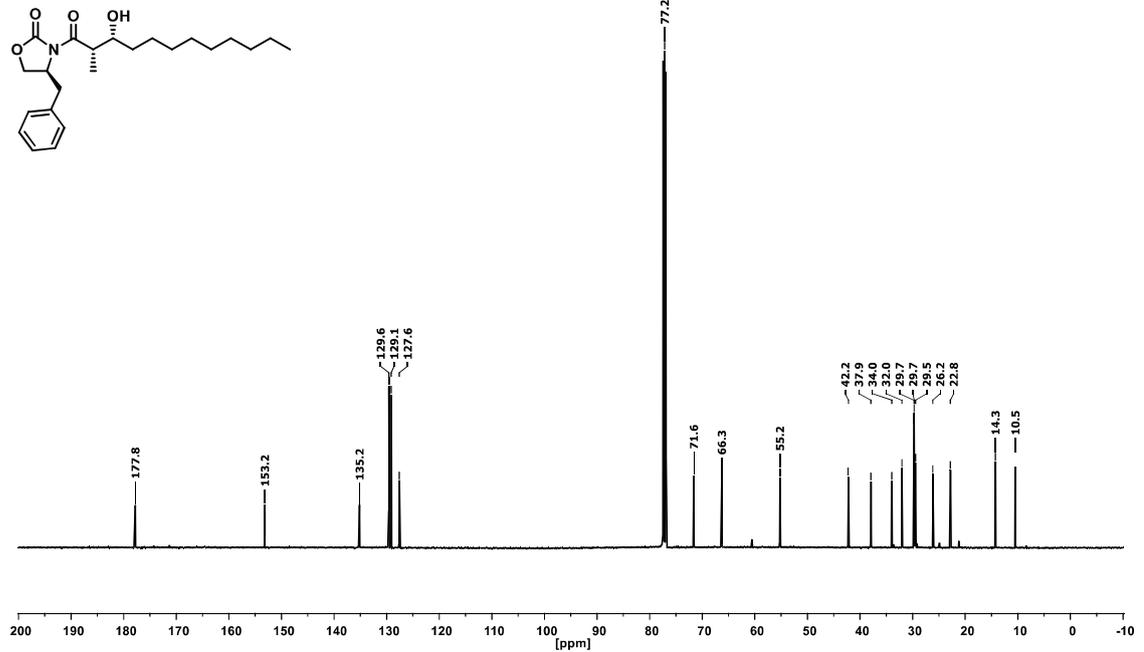
**(S)-4-Benzyl-3-((2S,3R)-3-hydroxy-2-methyloctanoyl)-2-oxazolidinon (115b)**

<sup>1</sup>H NMR Spektrum



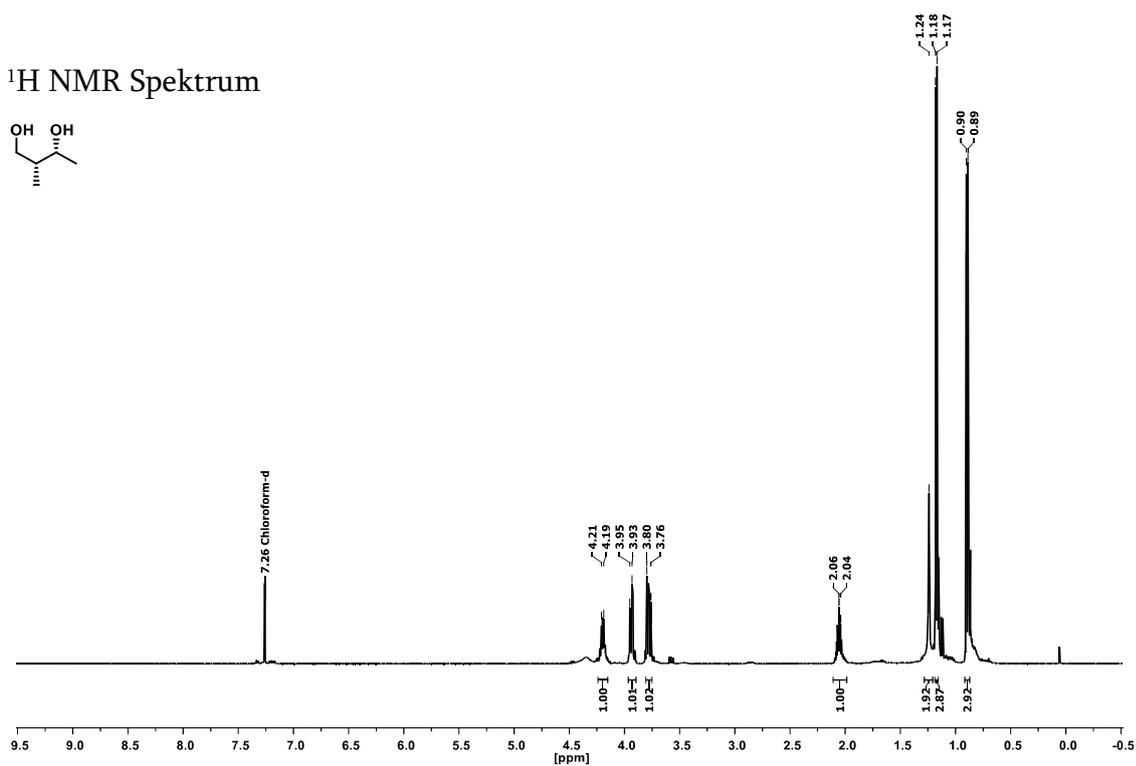
<sup>13</sup>C NMR Spektrum



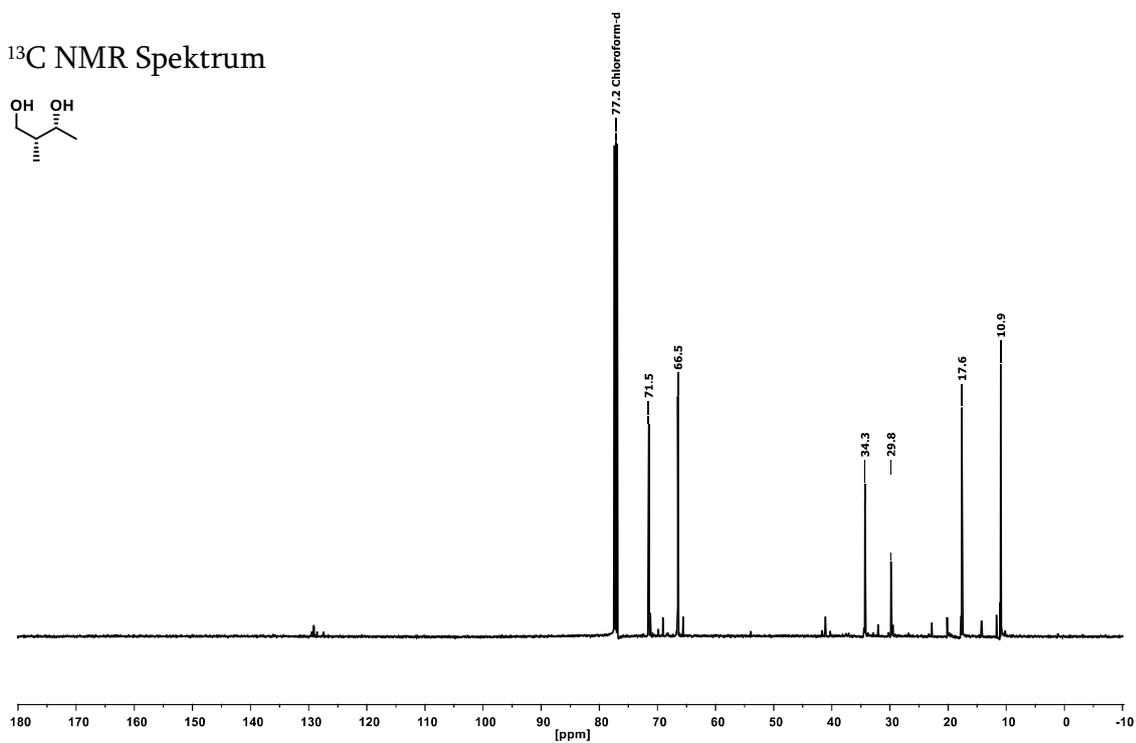
**(S)-4-Benzyl-3-((2S,3R)-3-hydroxy-2-methyldodecanoyl)-2-oxazolidinon (115c)**<sup>1</sup>H NMR Spektrum<sup>13</sup>C NMR Spektrum

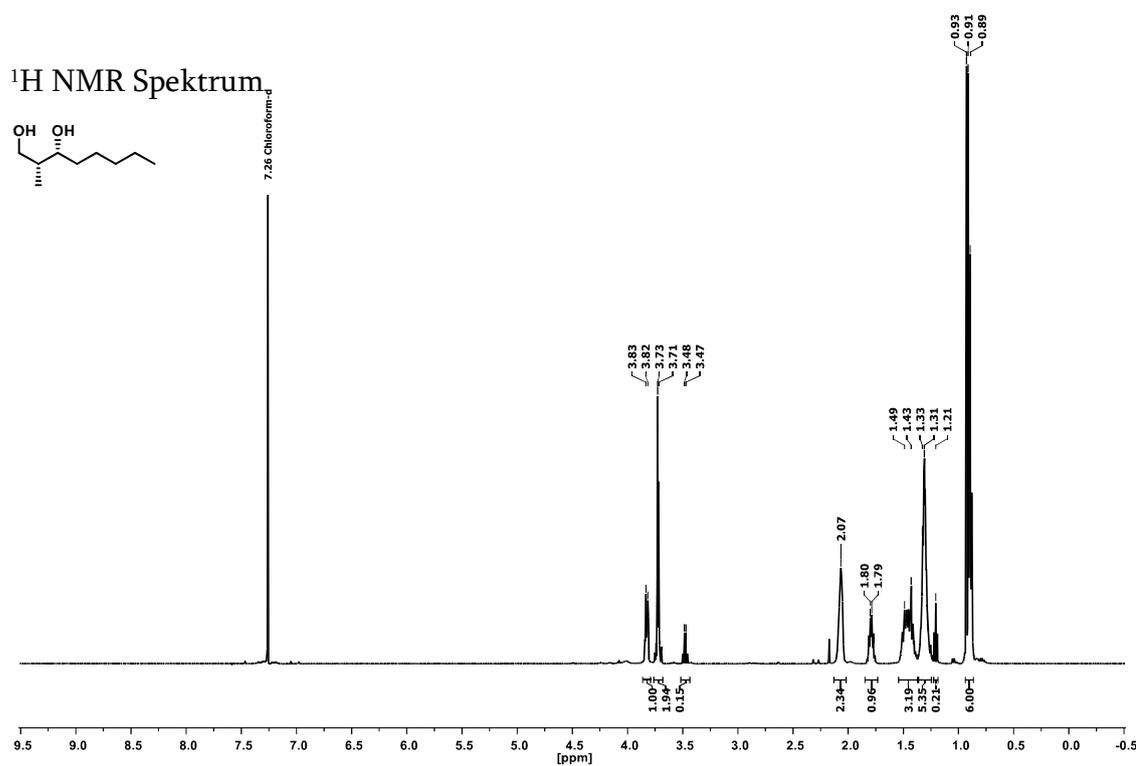
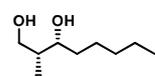
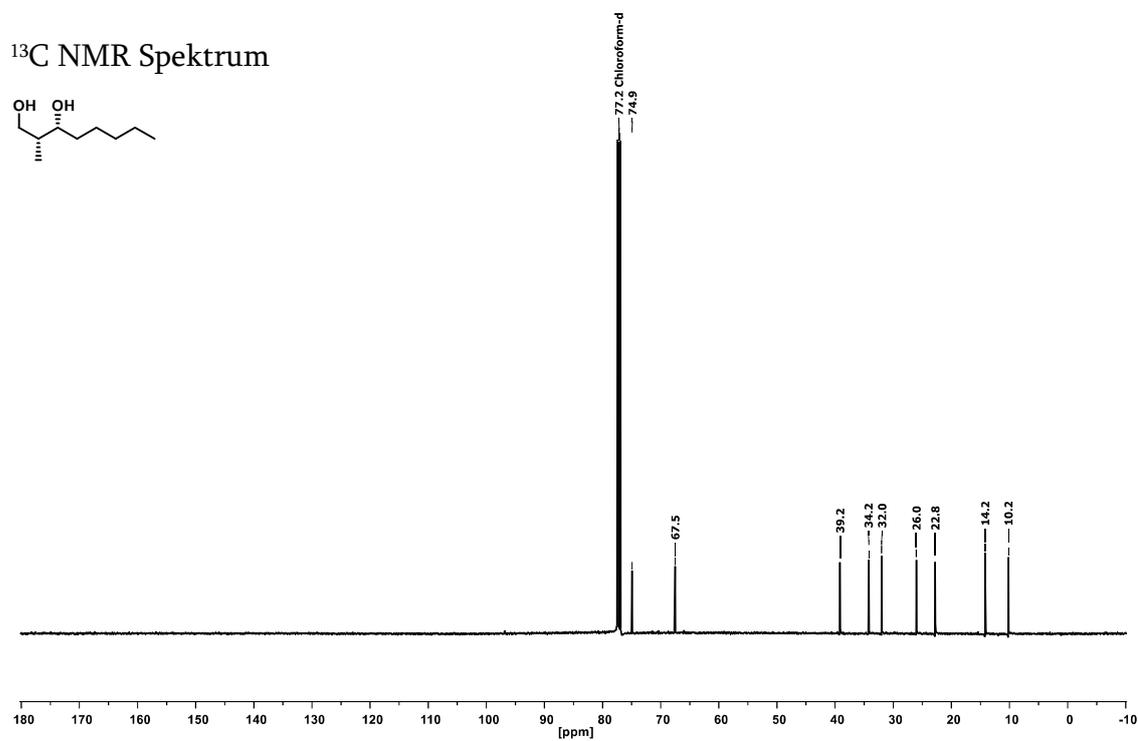
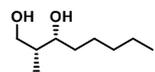
## (2*R*,3*R*)-2-Methylbutan-1,3-diol (116a)

<sup>1</sup>H NMR Spektrum



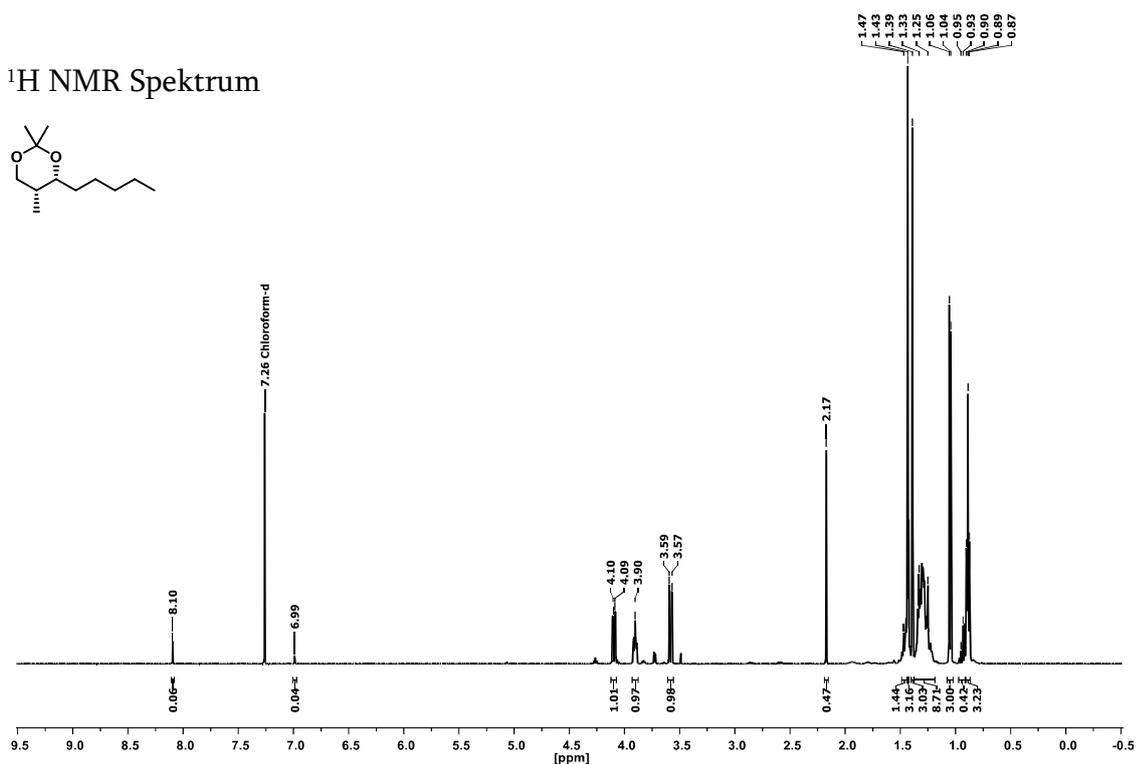
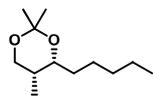
<sup>13</sup>C NMR Spektrum



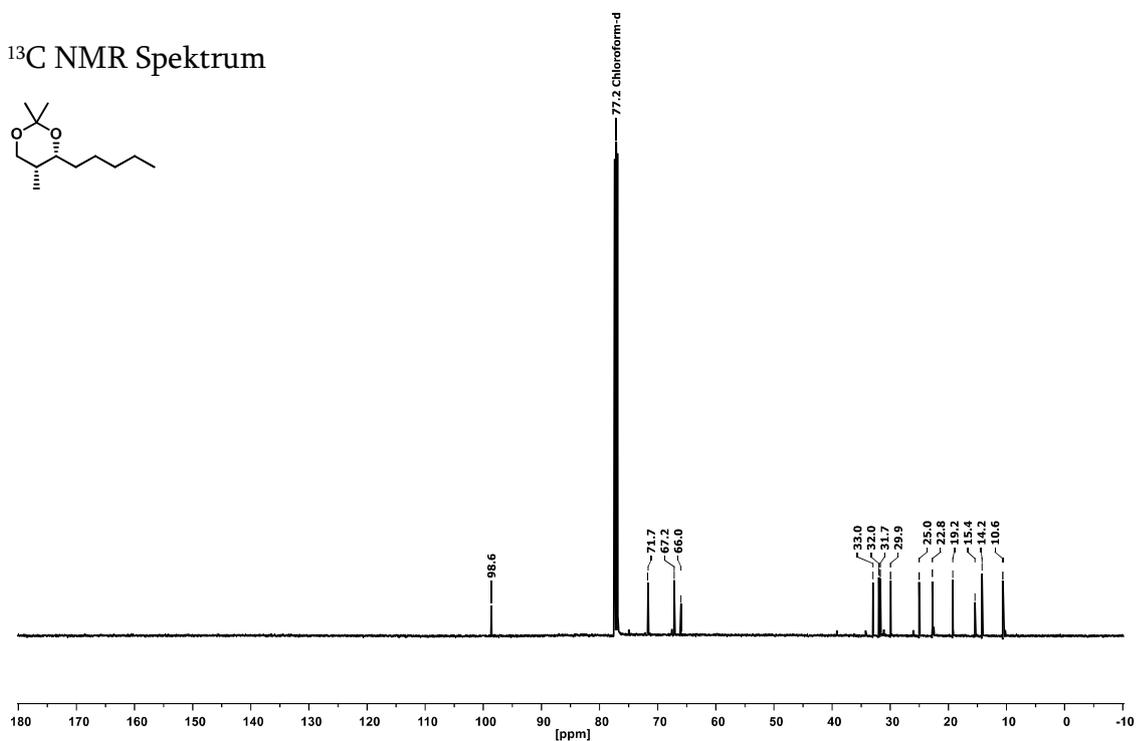
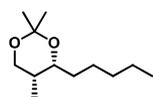
**(2R,3R)-2-Methyloctan-1,3-diol (116b)**<sup>1</sup>H NMR Spektrum<sup>13</sup>C NMR Spektrum

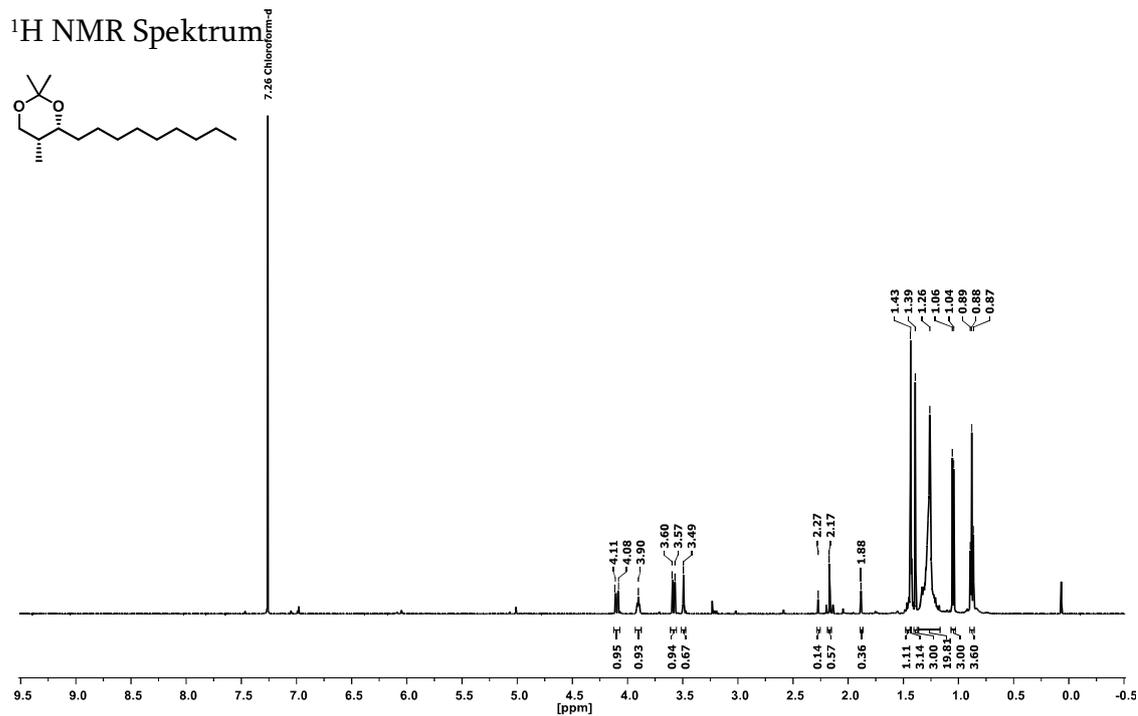
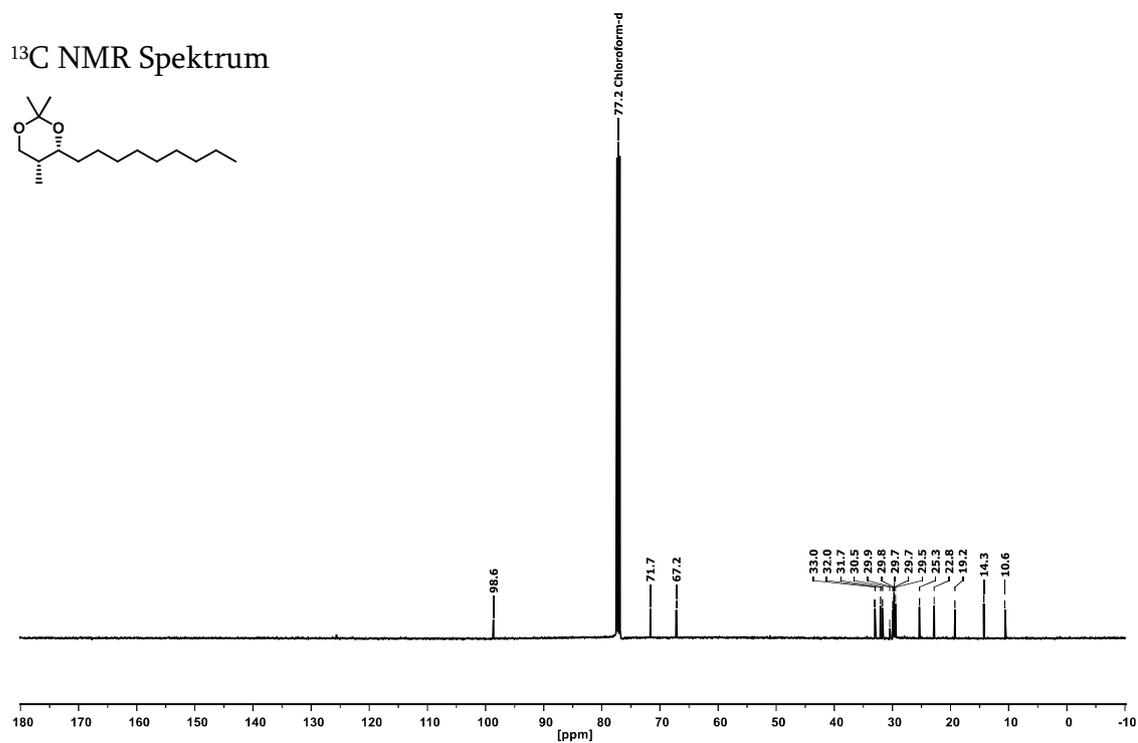
# (4*R*,5*R*)-2,2,5-Trimethyl-4-pentyl-1,3-dioxan (117b)

## <sup>1</sup>H NMR Spektrum



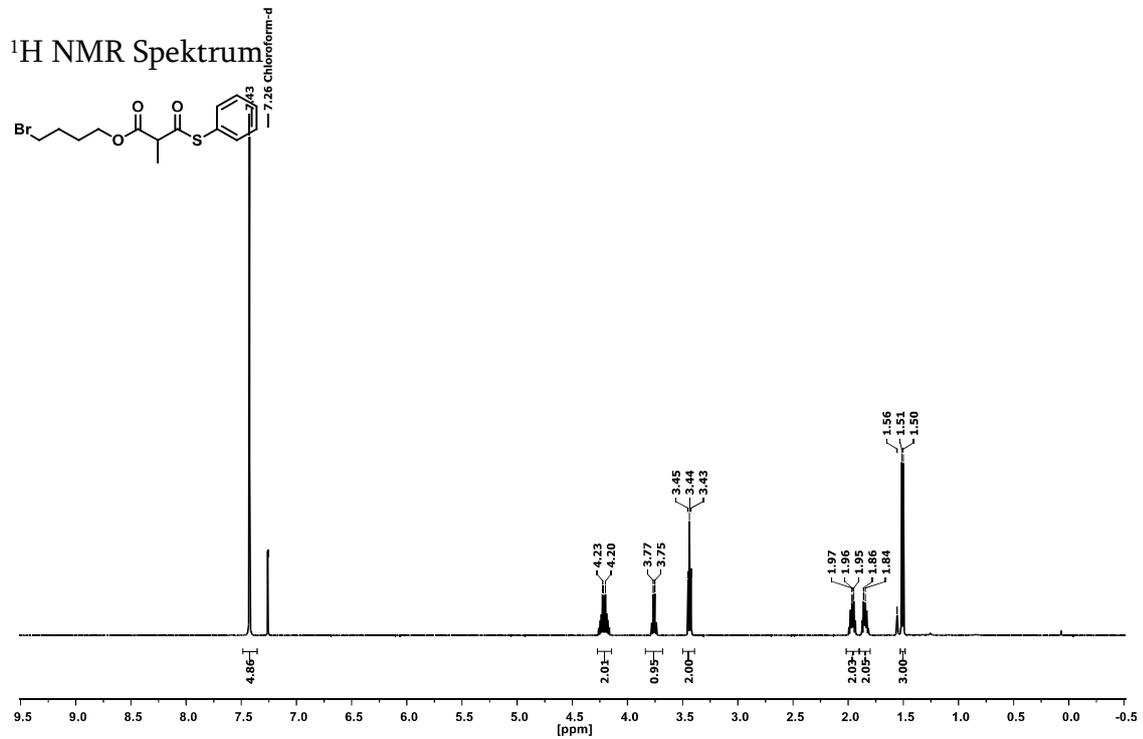
## <sup>13</sup>C NMR Spektrum



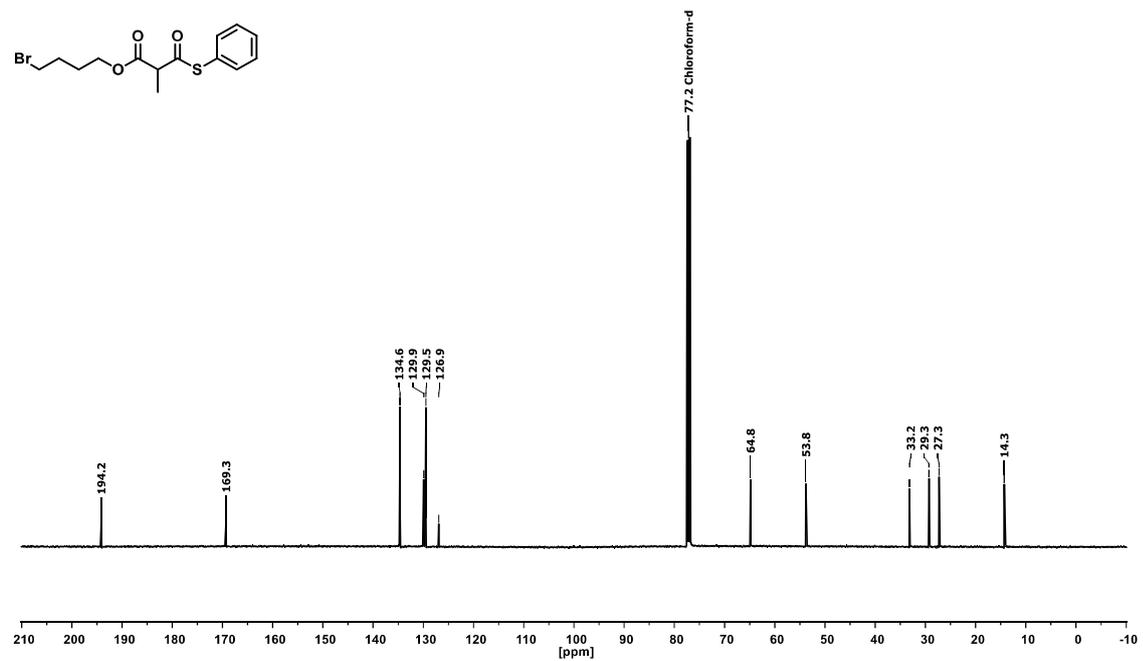
**(4*R*,5*R*)-2,2,5-Trimethyl-4-nonyl-1,3-dioxan (117c)**<sup>13</sup>C NMR Spektrum

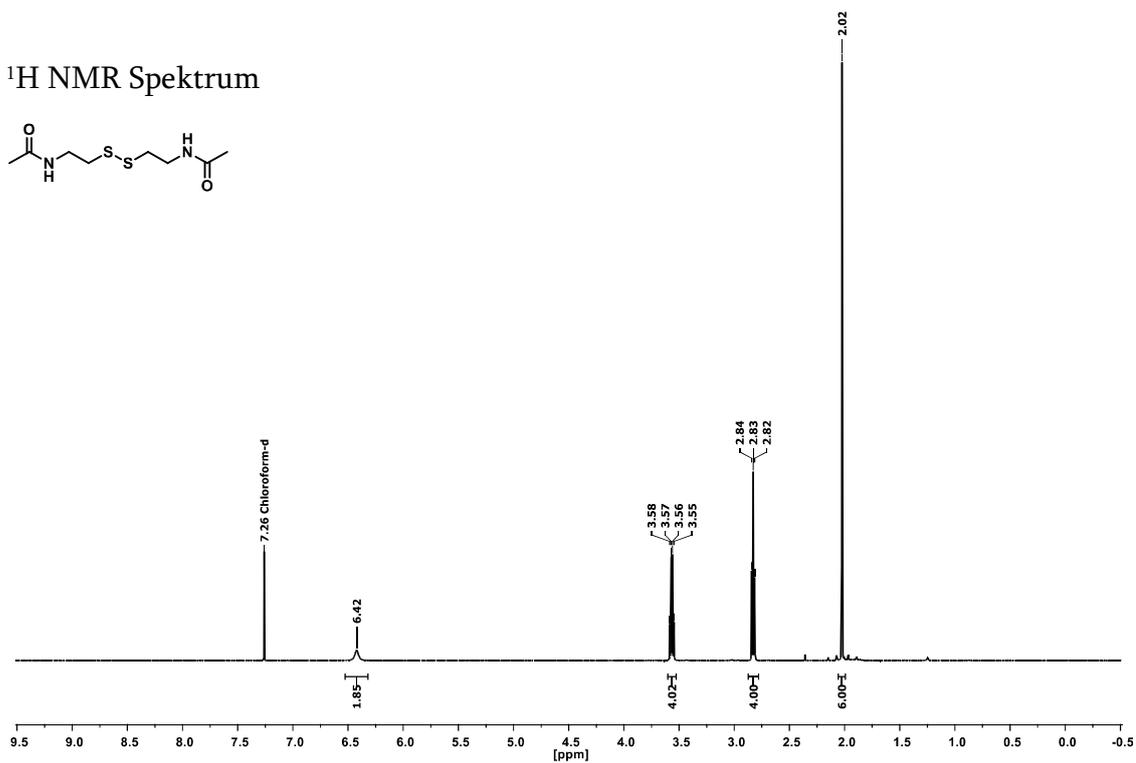
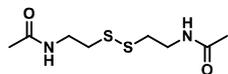
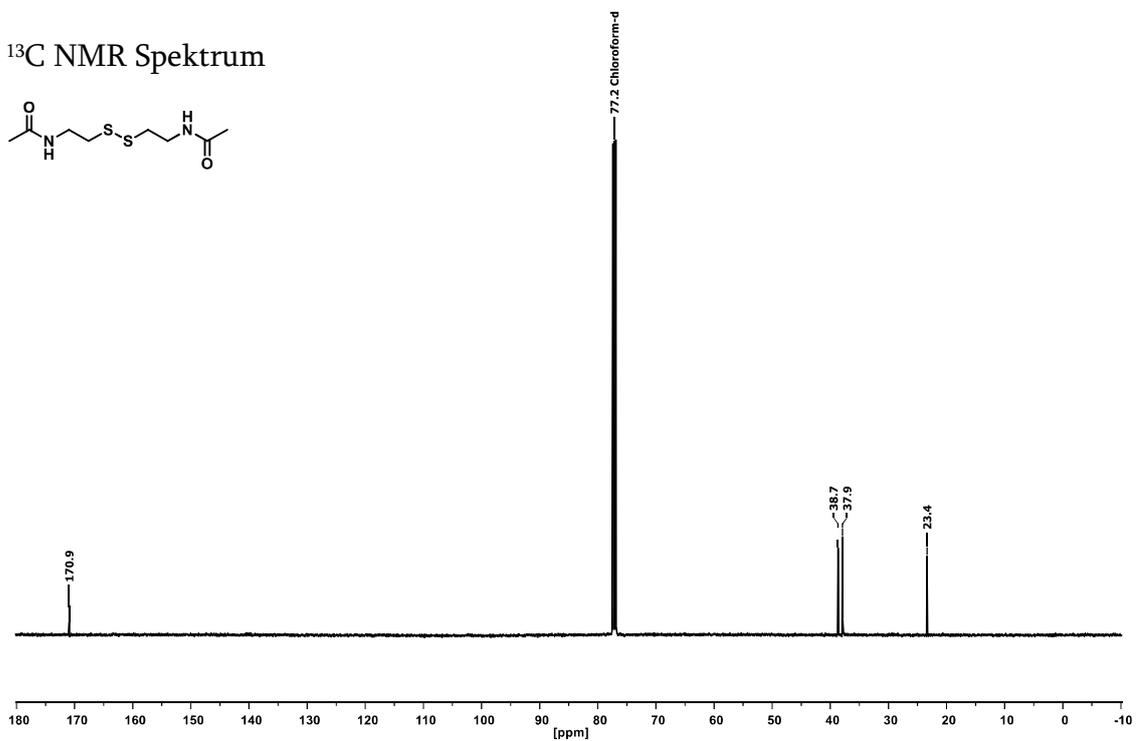
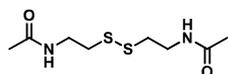
## 8.5.7 Identifizierte Nebenprodukte

### (4-Bromobutyl)-2-methyl-3-oxo-3-(thiophenyl)propionat (99)



### <sup>13</sup>C NMR Spektrum



***N,N'*-(Disulfid-diylbis(ethan-2,1-diyl))diacetamid (100)**<sup>1</sup>H NMR Spektrum<sup>13</sup>C NMR Spektrum

## 8.6 Bestimmung der Produktkonfigurationen

Tabelle 8-5: Ausbeute, Diastereomerenverhältnisse (*dr*), Stereoisomerenverteilung und Enantiomerenverhältnisse (*er*) der durch chemische Reduktion erhaltenen  $\beta$ -Hydroxy-Referenzen (H-XMN).

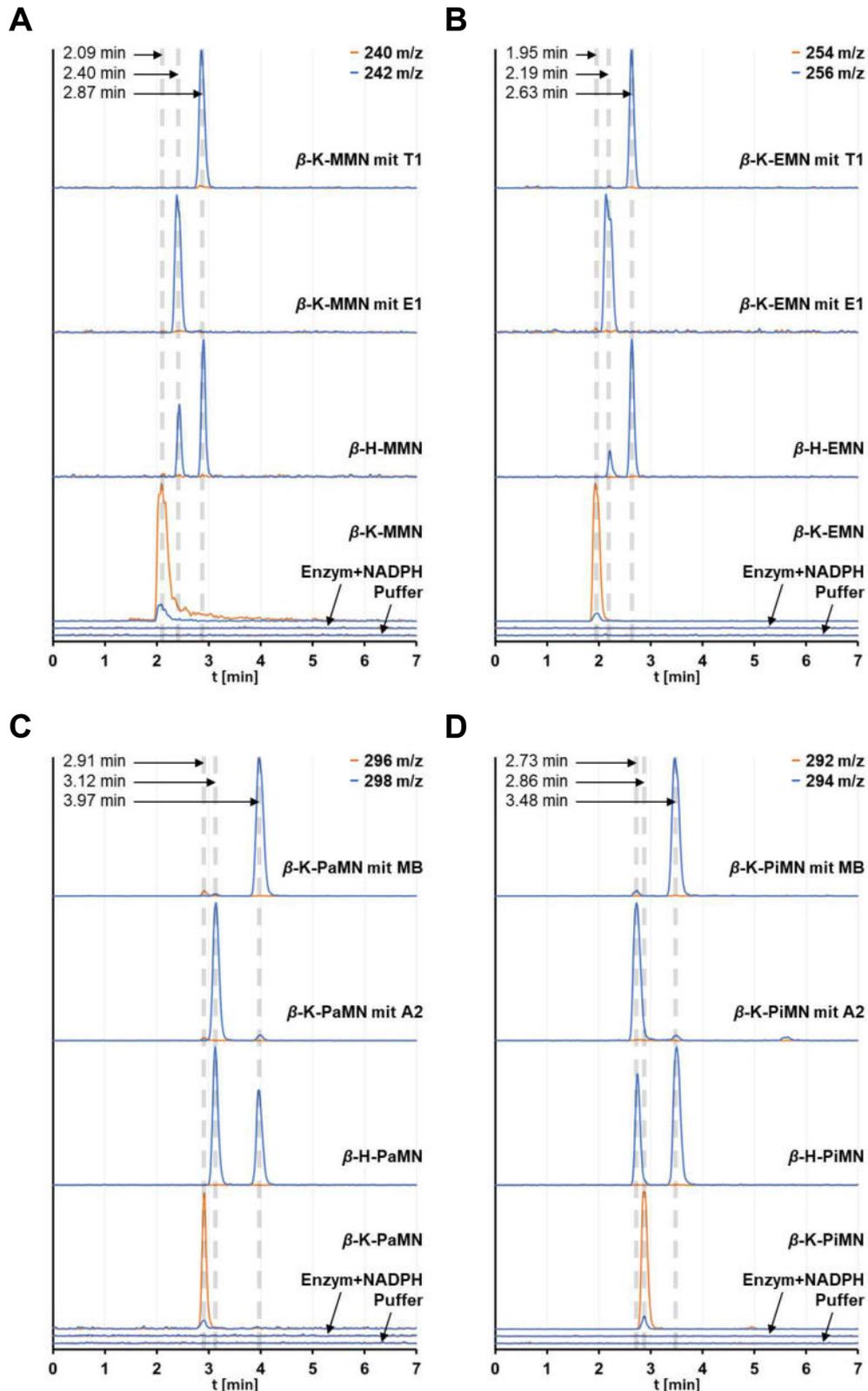
Produkt	Ausbeute	<i>dr</i> <sub>syn:anti</sub> <sup>a</sup>	Stereoisomere <sup>b</sup> [%]				<i>er</i> <sup>b</sup>	
			A1 2D3L	B2 2L3D	B1 2D3D	A2 2L3L	<i>syn</i>	<i>anti</i>
H-MMN	47%	33:67	19	14	35	32	58:42	52:48
H-EMN	37%	14:86	12	12	38	38	50:50	50:50
H-PaMN	24%	56:44	29	31	21	19	48:52	53:48
H-PiMN	28%	37:63	14	15	35	36	48:52	49:51
H-CPMN	52%	3:97	3	3	47	47	50:50	50:50
H-CHMN	51%	4:96	1	1	49	49	50:50	50:50
H-PMBMN	69%	24:76	12	12	39	37	50:50	51:49

<sup>a</sup> UPLC/MS; <sup>b</sup> chirale HPLC.

Tabelle 8-6: Reihenfolge der  $\beta$ -Hydroxy-Verbindungen (H-XMN) entsprechend der detektierten Retentionszeit (*t<sub>R</sub>*) während der Messungen mittels chiraler HPLC; beginnend mit der kleinsten Retentionszeit.

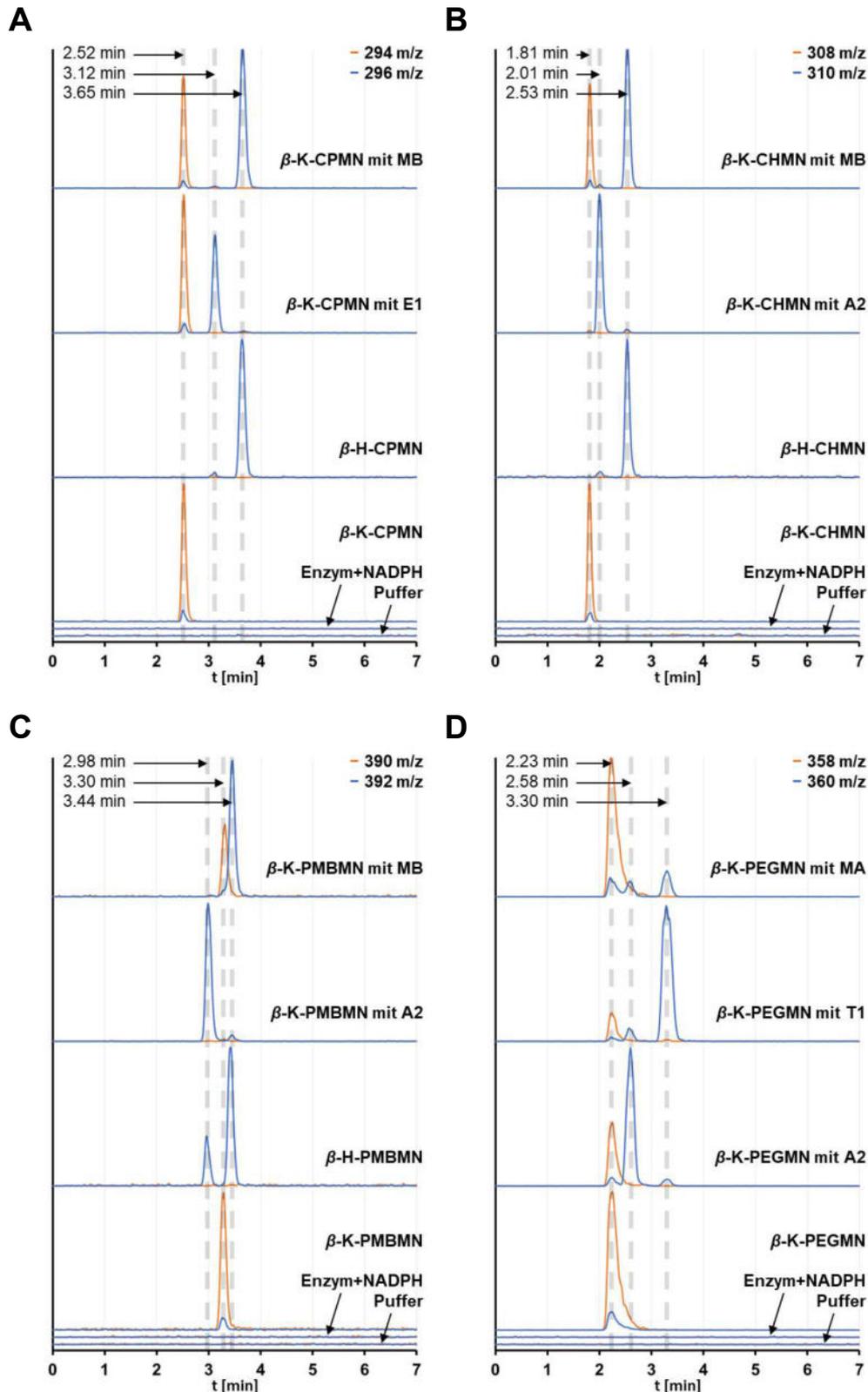
Substanz	Isomere nach <i>t<sub>R</sub></i>			
H-MMN 107	B1 ( <i>anti</i> )	A2 ( <i>anti</i> )	A1 ( <i>syn</i> )	B2 ( <i>syn</i> )
H-EMN 108	B1 ( <i>anti</i> )	A2 ( <i>anti</i> )	A1 ( <i>syn</i> )	B2 ( <i>syn</i> )
H-PaMN 109	B1 ( <i>anti</i> )	A1 ( <i>syn</i> )	A2 ( <i>anti</i> )	B2 ( <i>syn</i> )
H-PiMN 110	B1 ( <i>anti</i> )	A1 ( <i>syn</i> )	B2 ( <i>syn</i> )	A2 ( <i>anti</i> )
H-CPMN 111	B1 ( <i>anti</i> )	A1 ( <i>syn</i> )	A2 ( <i>anti</i> )	B2 ( <i>syn</i> )
H-CHMN 112	B1 ( <i>anti</i> )	A1 ( <i>syn</i> )	B2 ( <i>syn</i> )	A2 ( <i>anti</i> )
H-PMBMN 113	A1 ( <i>syn</i> )	B1 ( <i>anti</i> )	B2 ( <i>syn</i> )	A2 ( <i>anti</i> )

A1 = 2D3L bzw. (2*R*,3*S*); A2 = 2L3L bzw. (2*S*,3*S*); B1 = 2D3D bzw. (2*R*,3*R*); B2 = 2L3D bzw. (2*S*,3*R*).



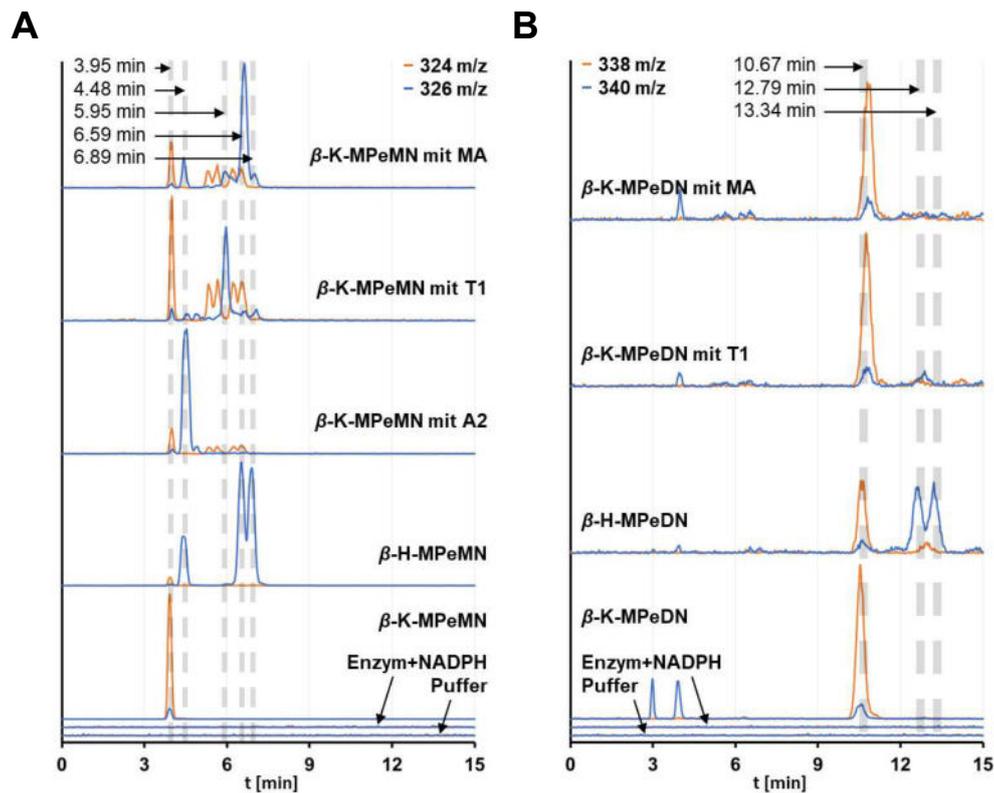
**Abbildung 8-30: UPLC/MS-Chromatogramme der in den Enzymaktivitätstests untersuchten  $\beta$ -Keto- $\alpha$ -methyl-SNAC-Substrate ( $\kappa$ -XMN).**

Gezeigt im Vergleich (jeweils von unten nach oben) des reinen Puffers, des Puffers inklusive KR-Domäne und NADPH, der Startmaterialien ( $\kappa$ -XMN,  $n$   $m/z$ ), der durch chemische Reduktion erhaltenen  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -methyl-SNAC-Referenzen ( $\text{H-XMN}$ ,  $n+2$   $m/z$ ) und einem Enzymaktivitätstests für jedes Diastereomerenpaare. A:  $\kappa$ -MMN **34**,  $\text{H-MMN}$  **107** (*dr* 33:67),  $\kappa$ -MMN mit EryKR1 (E1),  $\kappa$ -MMN mit TyIKR1 (T1); B:  $\kappa$ -EMN **35**,  $\text{H-EMN}$  **108** (*dr* 14:86),  $\kappa$ -EMN mit EryKR1 (E1),  $\kappa$ -EMN mit TyIKR1 (T1); C:  $\kappa$ -PaMN **101**,  $\text{H-PaMN}$  **109** (*dr* 56:44),  $\kappa$ -PaMN mit AmpKR2 (A2),  $\kappa$ -PaMN mit MycKRB (MB); D:  $\kappa$ -PiMN **102**,  $\text{H-PiMN}$  **110** (*dr* 37:63),  $\kappa$ -PiMN mit AmpKR2 (A2),  $\kappa$ -PiMN mit MycKRB (MB).



**Abbildung 8-31: UPLC/MS-Chromatogramme der in den Enzymaktivitätstests untersuchten  $\beta$ -Keto- $\alpha$ -methyl-SNAC-Substrate ( $\kappa$ -XMN).**

Gezeigt im Vergleich (jeweils von unten nach oben) des reinen Puffers, des Puffers inklusive KR-Domäne und NADPH, der Startmaterialien ( $\kappa$ -XMN,  $n$   $m/z$ ), der durch chemische Reduktion erhaltenen  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -methyl-SNAC-Referenzen ( $H$ -XMN,  $n+2$   $m/z$ ) und einem Enzymaktivitätstests für jedes Diastereomerenpaare. A:  $\kappa$ -CPMN **103**,  $H$ -CPMN **111** ( $dr$  3:97),  $\kappa$ -CPMN mit EryKR1 (E1),  $\kappa$ -CPMN mit MycKRB (MB); B:  $\kappa$ -CHMN **104**,  $H$ -CHMN **112** ( $dr$  4:96),  $\kappa$ -CHMN mit AmpKR2 (A2),  $\kappa$ -CHMN mit MycKRB (MB); C:  $\kappa$ -PMBMN **105**,  $H$ -PMBMN **113** ( $dr$  24:76),  $\kappa$ -PMBMN mit AmpKR2 (A2),  $\kappa$ -PMBMN mit MycKRB (MB); D:  $\kappa$ -PEGMN **128**,  $\kappa$ -PEGMN mit AmpKR2 (A2),  $\kappa$ -PEGMN mit TyIKR1 (T1),  $\kappa$ -PEGMN mit MycKRA (MA).



**Abbildung 8-32: UPLC/MS-Chromatogramme der in den Enzymaktivitätstests untersuchten  $\beta$ -Keto- $\alpha$ -methyl-SNAC-Substrate ( $\kappa$ -XMN)**

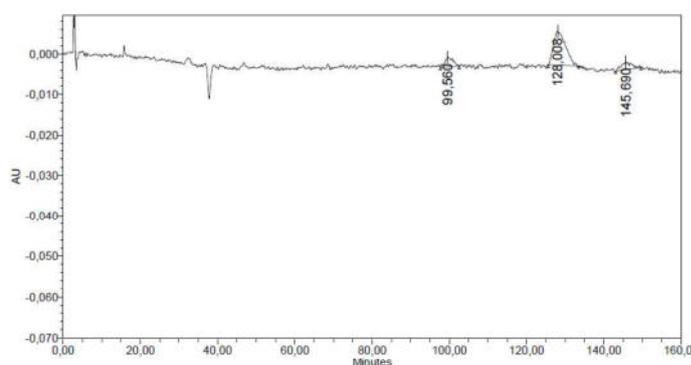
Gezeigt im Vergleich (jeweils von unten nach oben) des reinen Puffers, des Puffers inklusive KR-Domäne und NADPH, der Startmaterialien ( $n$   $m/z$ , orange Datenpunkte), der durch chemische Reduktion erhaltenen  $\beta$ -Hydroxy- $\alpha$ -methyl-SNAC-Referenzen ( $h$ -XMN,  $n+2$   $m/z$ , blaue Datenpunkte) und einem Enzymaktivitätstests für die gefundenen Diastereomerenpaare. A:  $\kappa$ -MPeMN **130**,  $h$ -MPeMN **131** (Verhältnis 16:0:42:42),  $\kappa$ -MPeMN mit AmpKR2 (A2),  $\kappa$ -MPeMN mit TylKR1 (T1),  $\kappa$ -MPeMN mit MycKRA (MA). B:  $\kappa$ -MPeDN **132**,  $h$ -MPeDN **133** (Verhältnis 51:49),  $\kappa$ -MPeDN mit TylKR1 (T1),  $\kappa$ -MPeDN mit MycKRA (MA).

## 8.7 Chromatogramme der chiralen HPLC

Tabelle 8-7: Substratangepasste Parameter für die chirale Chromatographie.

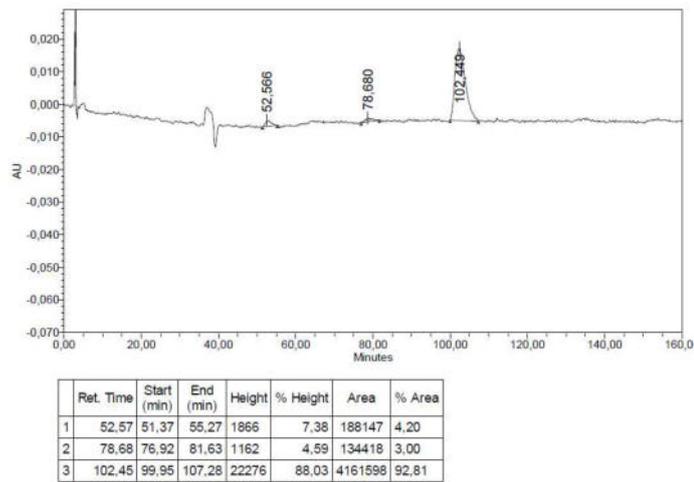
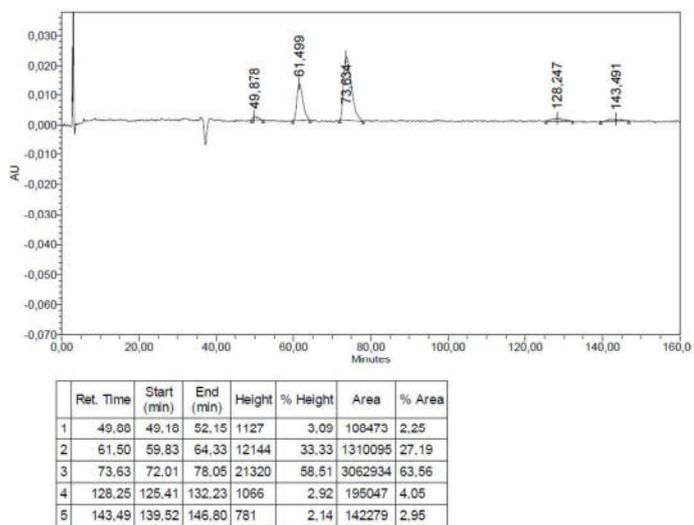
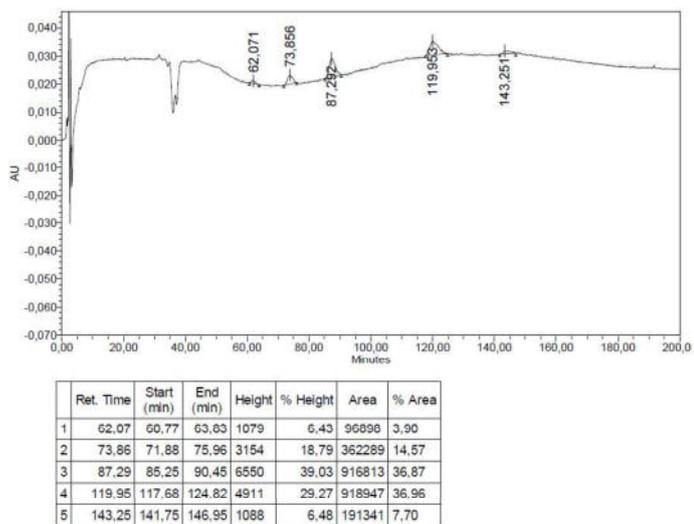
Substanzen	Laufmittelgemisch Hexan / Isopropanol	Flussrate [mL·min <sup>-1</sup> ]
K-/H-MMN	97 / 3	1.2
K-/H-EMN	95 / 5	1.2
K-/H-PaMN	97 / 3	1.2
K-/H-PiMN	90 / 10	0.8
K-/H-CPMN	95 / 5	1.2
K-/H-CHMN	95 / 5	1.2
K-/H-PMBMN	88 / 12	1.2

### 8.7.1 Enzymatische Umsetzung von κ-MMN und Referenzen



	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	99.56	97.68	102.55	2439	19.16	353881	13.91
2	128.01	125.57	133.43	8334	65.46	1834585	72.13
3	145.69	142.94	149.59	1959	15.38	355122	13.96

Abbildung 8-33: Reduktion von κ-MMN durch AmpKR1.

Abbildung 8-34: Reduktion von  $\kappa$ -MMN durch EryKR1.Abbildung 8-35: Reduktion von  $\kappa$ -MMN durch TyIKR1.Abbildung 8-36: Reduktion von  $\kappa$ -MMN durch AmpKR2.

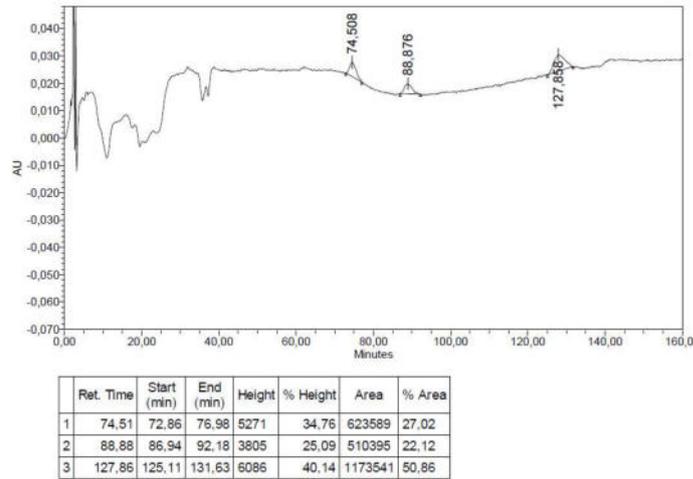


Abbildung 8-37: Reduktion von  $\kappa$ -MMN durch EryKR6.

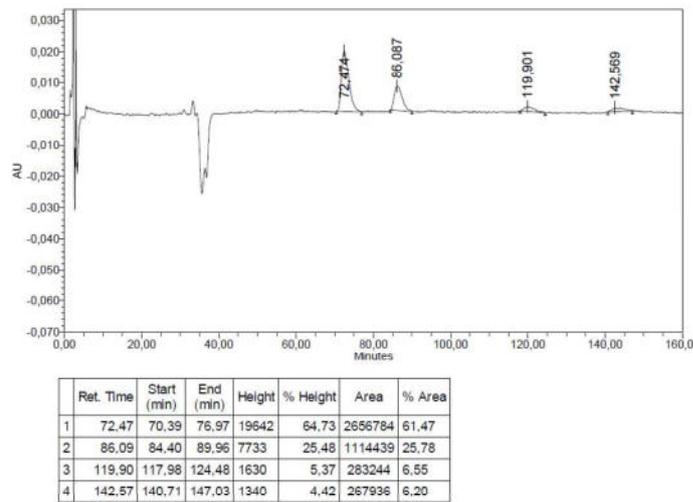


Abbildung 8-38: Reduktion von  $\kappa$ -MMN durch MycKRA.

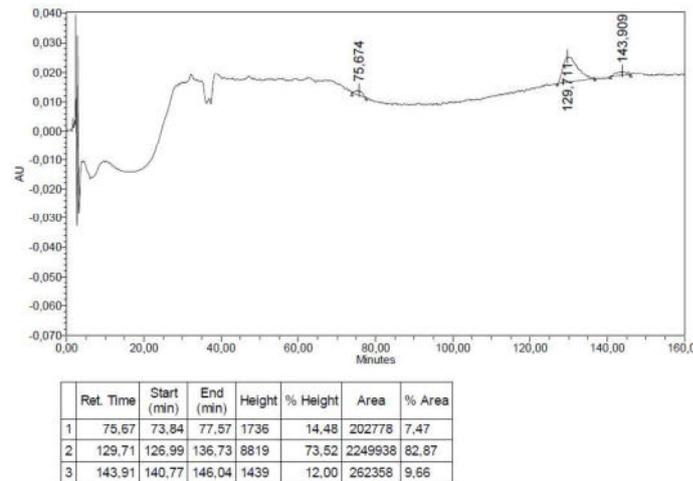
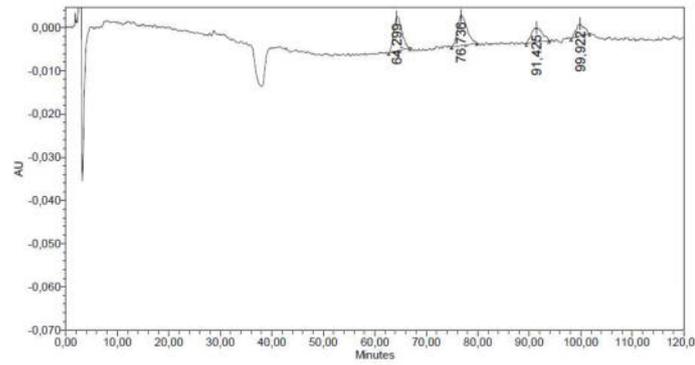
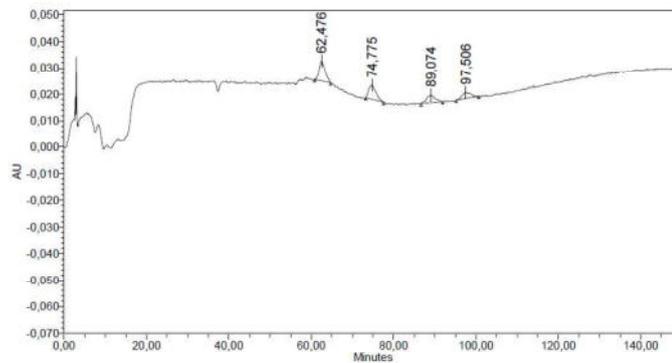


Abbildung 8-39: Reduktion von  $\kappa$ -MMN durch MycKRB.



	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	64.30	62.73	66.81	7897	37.57	871229	33.98
2	76.74	74.92	79.82	7007	33.34	888462	34.65
3	91.42	89.41	93.83	3356	15.97	492961	19.23
4	99.92	98.12	101.70	2761	13.13	311461	12.15

Abbildung 8-40: Reduktion von  $\kappa$ -MMN durch  $\text{NaBH}_4$  (erste Messung).



	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	62.48	60.83	64.69	7691	42.43	776324	36.05
2	74.77	73.21	77.53	5352	29.52	645151	29.96
3	89.07	86.70	91.93	2815	15.53	408666	18.98
4	97.51	95.22	100.64	2271	12.53	323383	15.02

Abbildung 8-41: Reduktion von  $\kappa$ -MMN durch  $\text{NaBH}_4$  (Zweite Messung).

## 8.7.2 Enzymatische Umsetzung von $\kappa$ -EMN und Referenzen

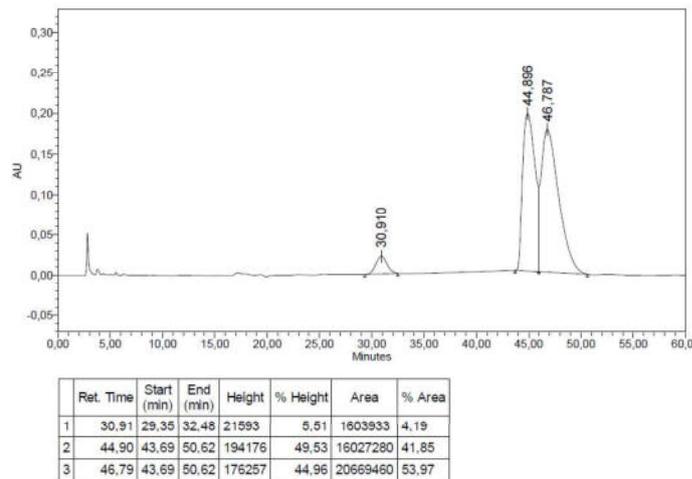


Abbildung 8-42: Reduktion von  $\kappa$ -EMN durch AmpKR1.

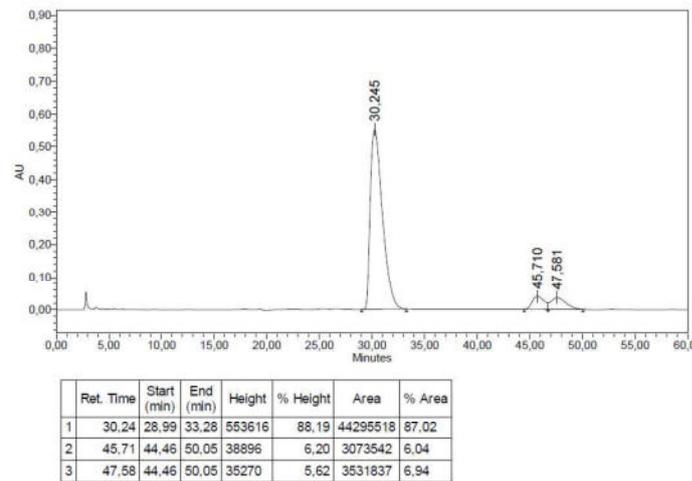


Abbildung 8-43: Reduktion von  $\kappa$ -EMN durch EryKR1.

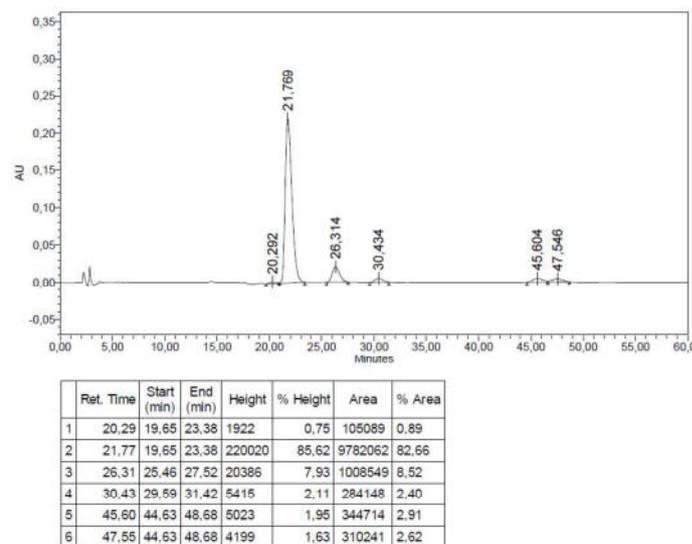
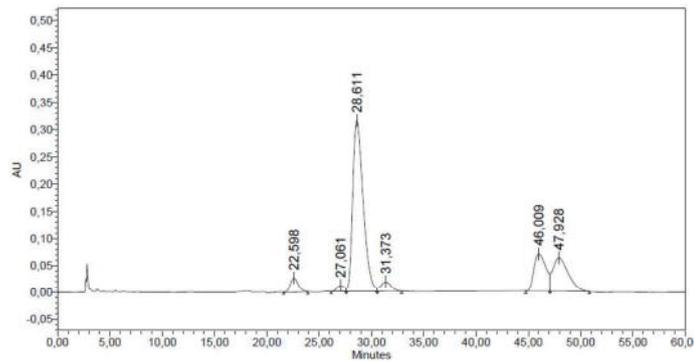
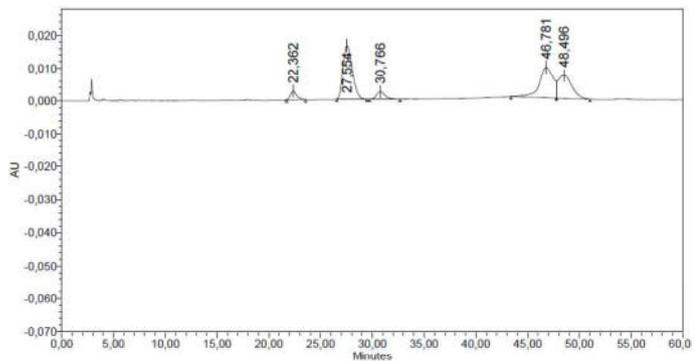


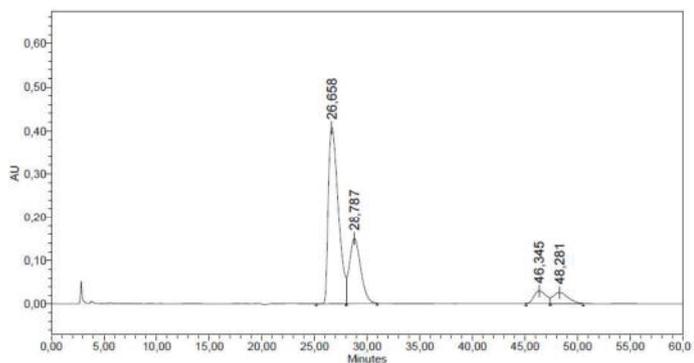
Abbildung 8-44: Reduktion von  $\kappa$ -EMN durch TyIKR1.



	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	22.60	20.19	23.92	27352	5.41	1470554	3.94
2	27.06	26.16	32.88	11812	2.34	576671	1.55
3	28.61	26.16	32.88	315315	62.42	21823370	58.49
4	31.37	26.16	32.88	18231	3.61	1296594	3.47
5	46.01	44.76	50.82	69629	13.78	5561188	14.90
6	47.93	44.76	50.82	62845	12.44	6583752	17.65

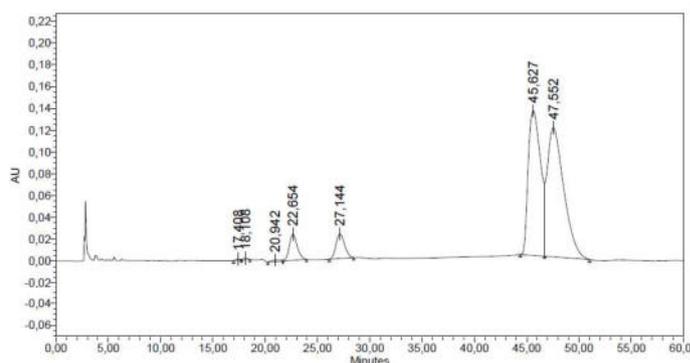
Abbildung 8-45: Reduktion von  $\kappa$ -EMN durch AmpKR2.

	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	22.36	21.71	23.55	2507	6.05	107571	3.04
2	27.55	26.56	29.45	16425	43.47	1036923	37.00
3	30.77	29.69	32.68	2311	5.11	134103	4.78
4	46.78	43.37	51.03	9408	24.90	870623	31.06
5	48.50	43.37	51.03	7058	18.68	653594	23.32

Abbildung 8-46: Reduktion von  $\kappa$ -EMN durch EryKR6.

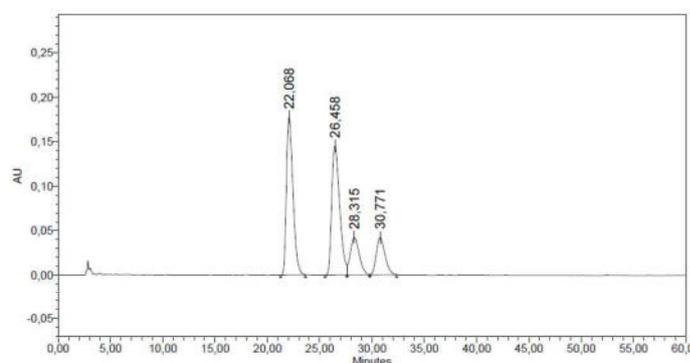
	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	26.66	20.26	30.95	407189	66.67	26833406	62.72
2	28.79	20.26	30.95	149139	24.42	11202779	26.18
3	46.35	45.09	50.52	28731	4.70	2275271	5.32
4	48.28	45.09	50.52	25695	4.21	2472669	5.78

Abbildung 8-47: Reduktion von  $\kappa$ -EMN durch MycKRA.



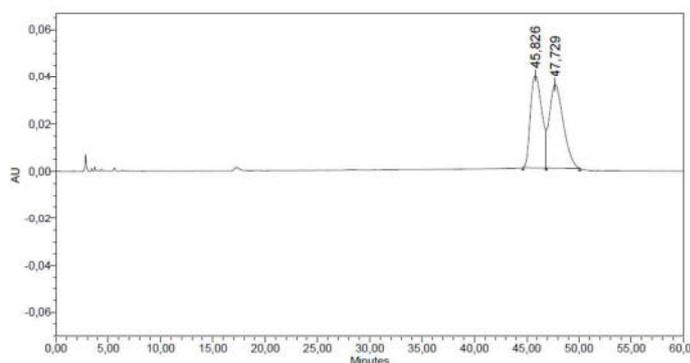
	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	17.41	16.99	18.55	1147	0.38	33578	0.13
2	18.11	16.99	18.55	1503	0.50	46697	0.17
3	20.94	20.24	23.95	1352	0.45	92208	0.34
4	22.65	20.24	23.95	23992	7.95	1270205	4.75
5	27.14	26.13	28.45	22555	7.48	1291383	4.83
6	45.63	44.39	51.02	132726	44.00	10861860	40.61
7	47.55	44.39	51.02	118365	39.24	13153381	49.17

Abbildung 8-48: Reduktion von  $\kappa$ -EMN durch MycKRB.



	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	22.07	21.26	23.62	177664	43.60	7715252	37.90
2	26.46	25.53	32.35	145444	35.69	7665785	37.66
3	28.31	25.53	32.35	42375	10.40	2538326	12.47
4	30.77	25.53	32.35	42007	10.31	2437392	11.97

Abbildung 8-49: Reduktion von  $\kappa$ -EMN durch  $\text{NaBH}_4$ .



	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	45.83	44.63	50.08	39100	52.60	2956736	47.52
2	47.73	44.63	50.08	35239	47.40	3265415	52.48

Abbildung 8-50:  $\kappa$ -EMN.

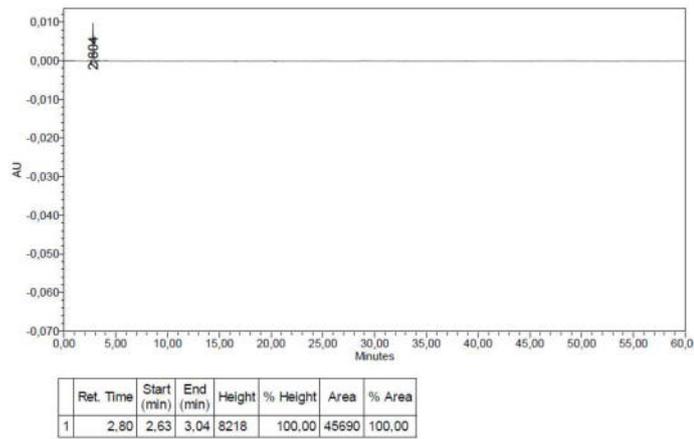


Abbildung 8-51: Leerlauf mit Laufmittelgemisch Hexan / Isopropanol 95/5 am Tag der  $\kappa$ -EMN-Proben.

### 8.7.3 Enzymatische Umsetzung von $\kappa$ -PaMN und Referenzen

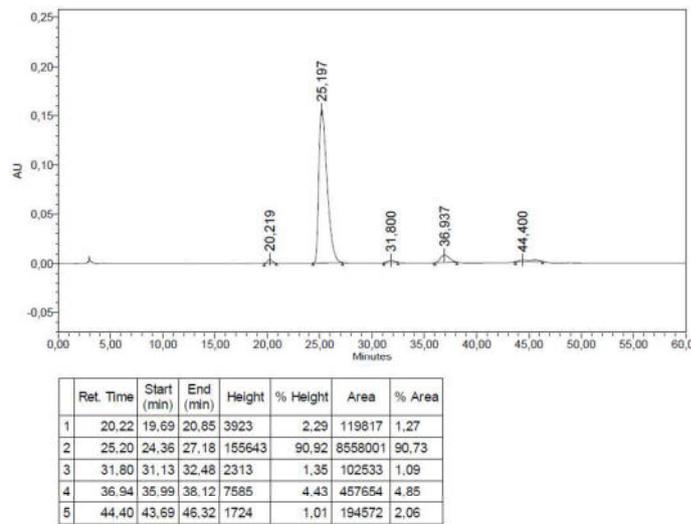


Abbildung 8-52: Reduktion von  $\kappa$ -PaMN durch TylKR1.

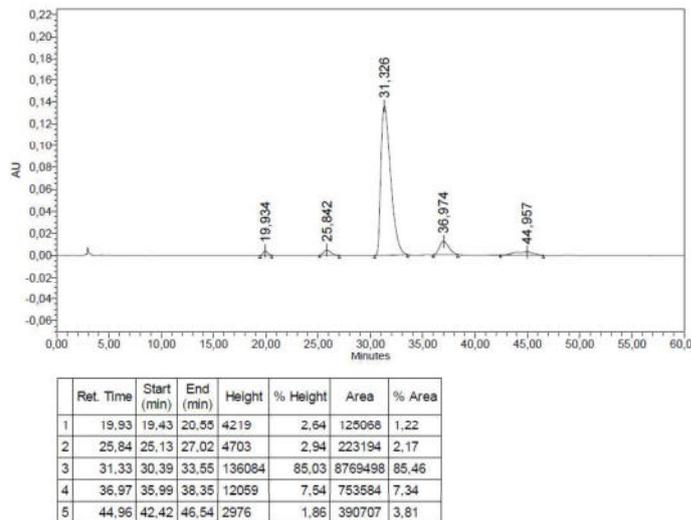


Abbildung 8-53: Reduktion von  $\kappa$ -PaMN durch AmpKR2.

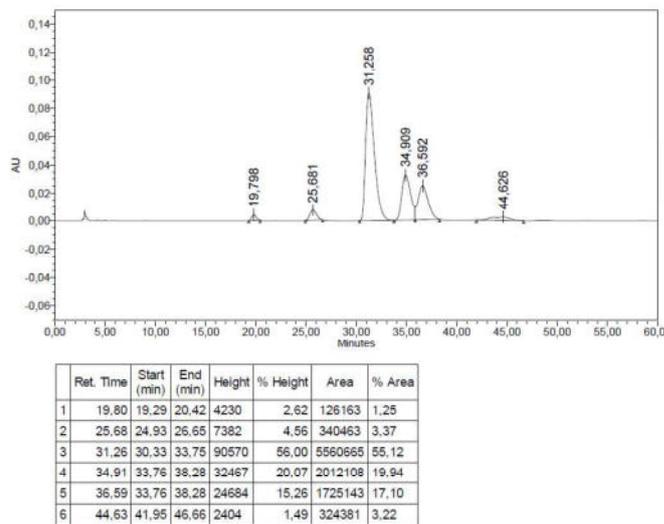
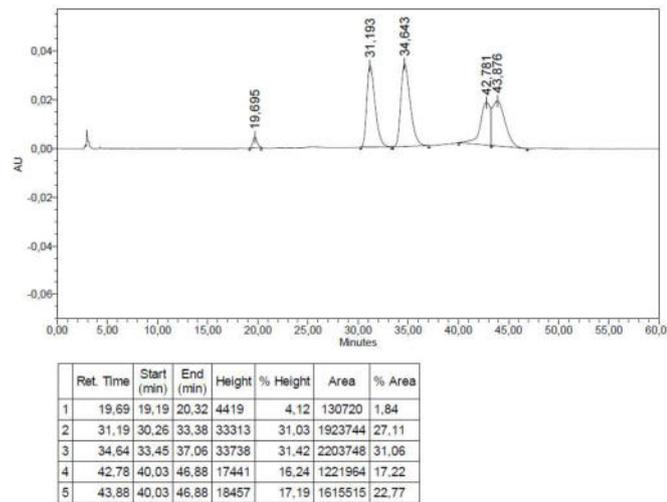
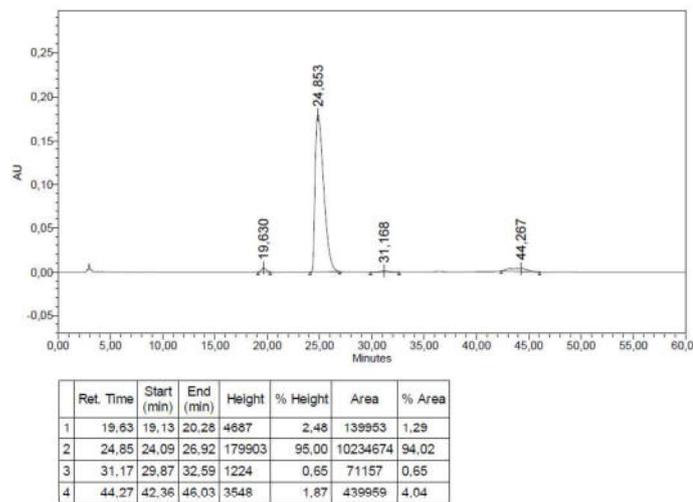
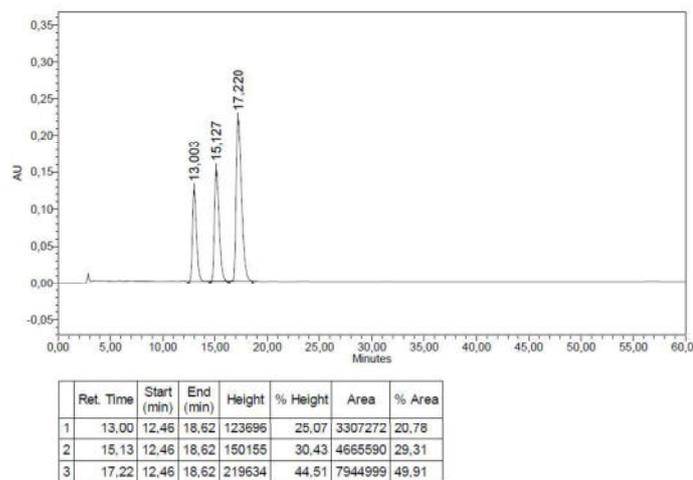
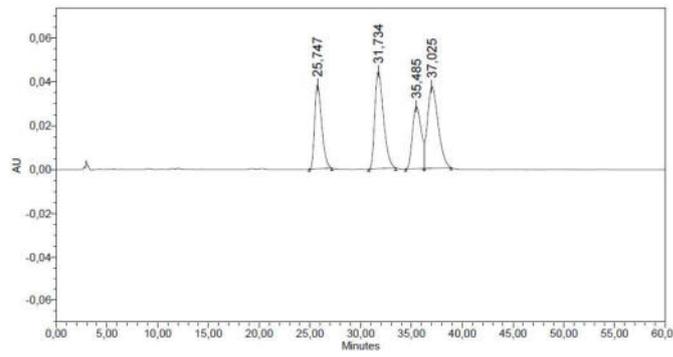


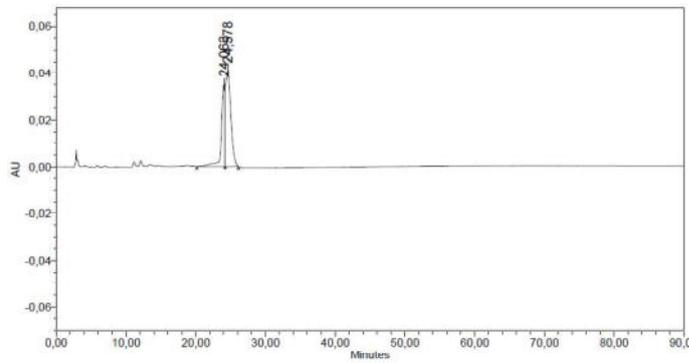
Abbildung 8-54: Reduktion von  $\kappa$ -PaMN durch EryKR6.

Abbildung 8-55: Reduktion von  $\kappa$ -PaMN durch MycKRA.Abbildung 8-56: Reduktion von  $\kappa$ -PaMN durch MycKRB.Abbildung 8-57: Reduktion von  $\kappa$ -PaMN durch  $\text{NaBH}_4$  (erste Messung, Hexan / Isopropanol 95/5).



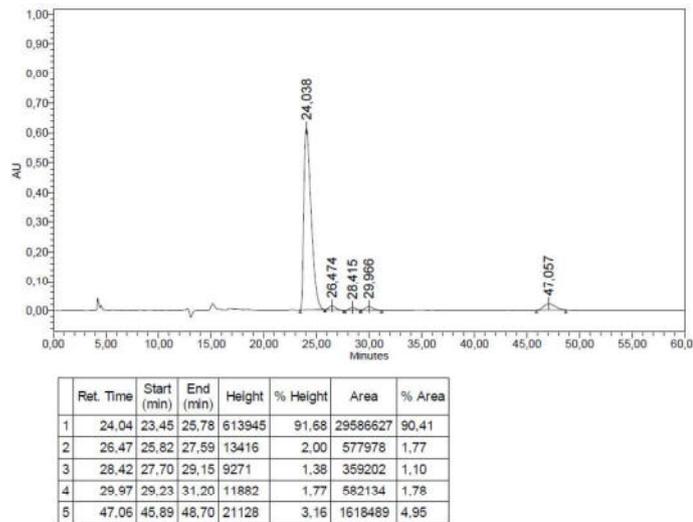
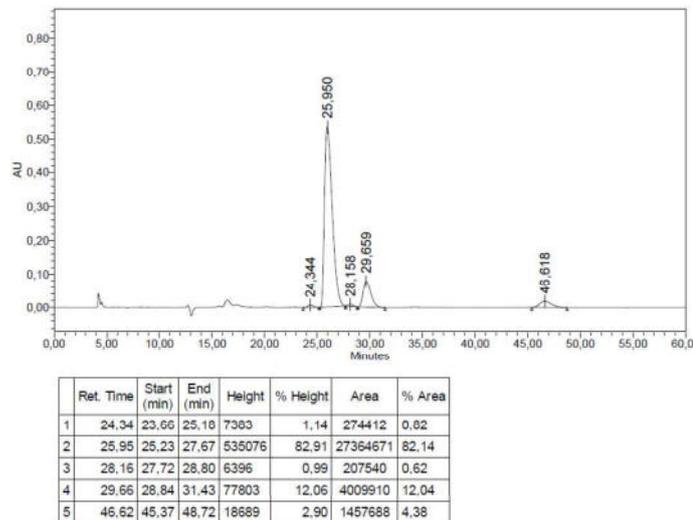
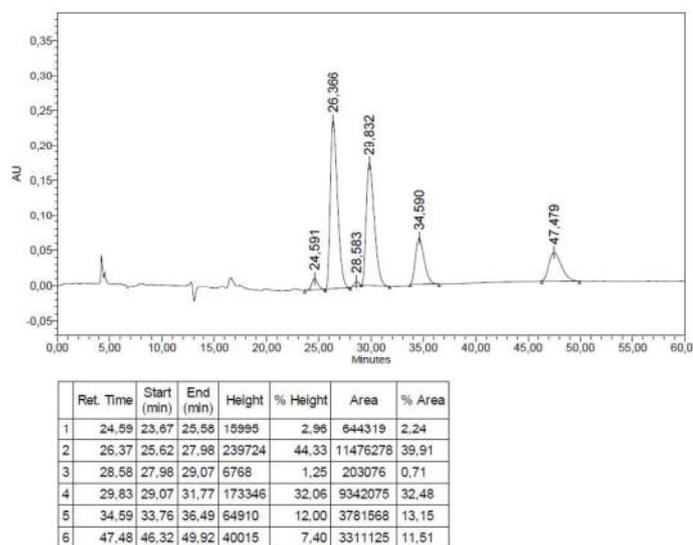
	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	25,75	24,93	27,15	38281	25,81	1850829	20,78
2	31,73	30,79	33,45	44286	29,86	2623705	29,45
3	35,49	34,43	38,92	28391	19,14	1688657	18,96
4	37,02	34,43	38,92	37349	25,18	2744821	30,81

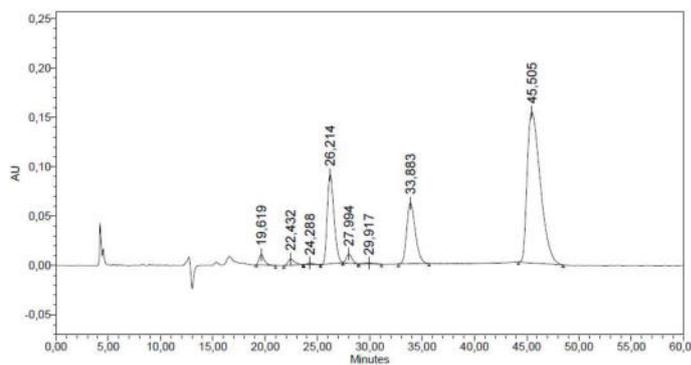
Abbildung 8-58: Reduktion von  $\kappa$ -PaMN durch  $\text{NaBH}_4$  (zweite Messung, Hexan / Isoprpanol 97/3).



	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	24,06	20,15	26,12	34968	46,02	1234066	36,24
2	24,58	20,15	26,12	41013	53,98	2171593	63,76

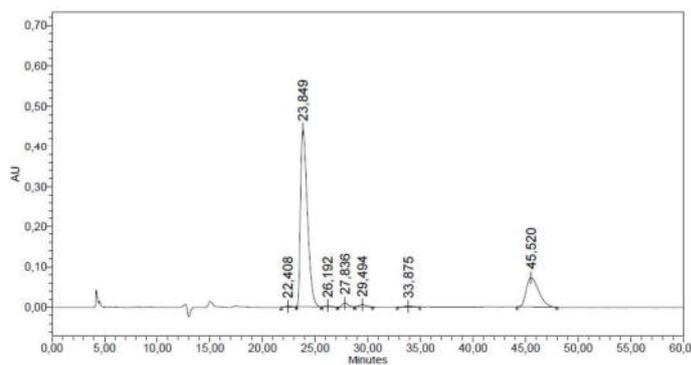
Abbildung 8-59:  $\kappa$ -PaMN (Hexan / Isoprpanol 95/5).

8.7.4 Enzymatische Umsetzung von  $\kappa$ -PiMN und ReferenzenAbbildung 8-60: Reduktion von  $\kappa$ -PiMN durch TyIKR1.Abbildung 8-61: Reduktion von  $\kappa$ -PiMN durch AmpKR2.Abbildung 8-62: Reduktion von  $\kappa$ -PiMN durch EryKR6.



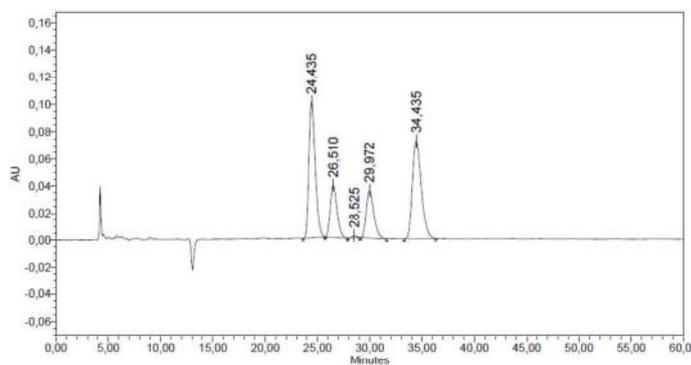
	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	19,62	19,15	20,99	10410	3,12	364457	1,65
2	22,43	21,79	23,63	6310	1,89	271043	1,23
3	24,29	23,68	25,28	1763	0,53	74465	0,34
4	26,21	25,30	27,43	90228	27,07	4027596	18,28
5	27,99	27,44	28,90	8986	2,70	338640	1,54
6	29,92	28,93	31,12	1206	0,36	94246	0,43
7	33,88	32,74	35,68	61494	18,45	3511569	15,94
8	45,51	44,21	46,49	152951	45,88	13351516	60,60

Abbildung 8-63: Reduktion von  $\kappa$ -PiMN durch MycKRA.



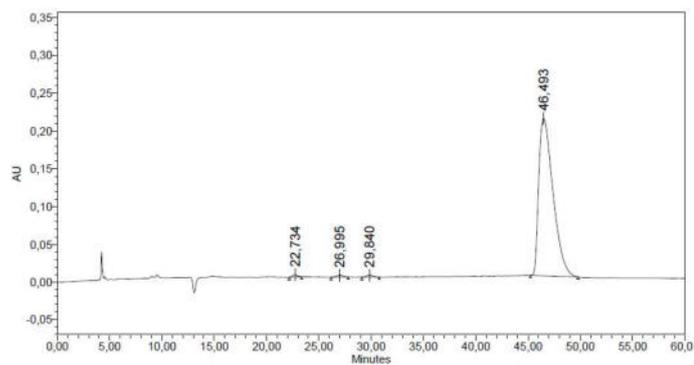
	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	22,41	21,77	23,21	2558	0,48	96521	0,36
2	23,85	23,24	25,59	442339	82,37	19954063	74,55
3	26,19	25,64	27,12	2634	0,49	102751	0,38
4	27,84	27,16	28,73	9577	1,78	358262	1,34
5	29,49	28,77	30,46	5079	0,95	234853	0,88
6	33,88	32,81	34,94	2050	0,38	114427	0,43
7	45,52	44,19	47,98	72767	13,55	5903419	22,06

Abbildung 8-64: Reduktion von  $\kappa$ -PiMN durch MycKRB.



	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	24,43	23,63	25,72	100185	40,32	4243913	34,89
2	26,51	25,74	27,87	38680	15,57	1754770	14,43
3	28,52	27,89	29,08	1604	0,65	52245	0,43
4	29,97	29,08	31,62	35317	14,21	1795850	14,76
5	34,44	33,28	36,32	72683	29,25	4317843	35,50

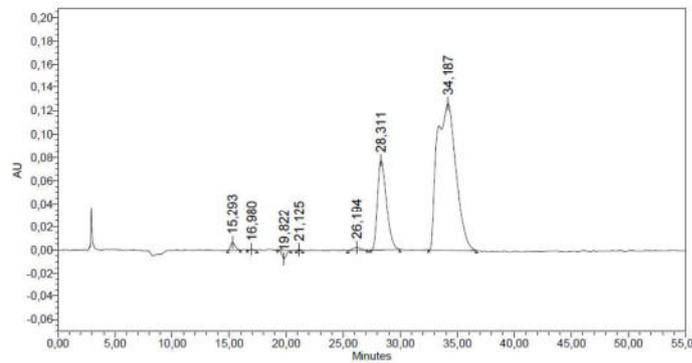
Abbildung 8-65: Reduktion von  $\kappa$ -PiMN durch NaBH<sub>4</sub>.



	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	22.73	22.17	23.34	2987	1,38	99412	0,50
2	26.99	26,18	27,80	2412	1,12	113381	0,57
3	29.84	29,11	30,77	2389	1,11	113266	0,56
4	46.49	45,22	49,79	208154	96,39	19722626	98,37

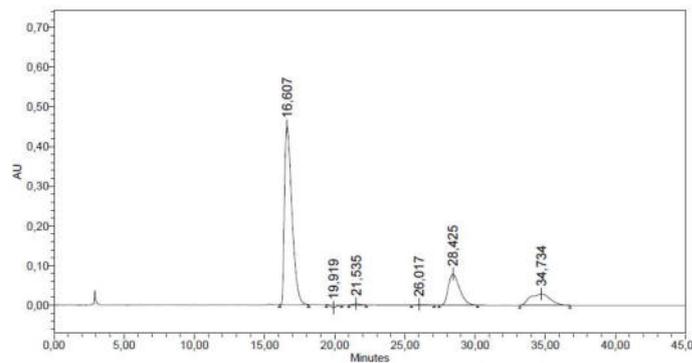
Abbildung 8-66:  $\kappa$ -PiMN.

## 8.7.5 Enzymatische Umsetzung von $\kappa$ -CPMN und Referenzen



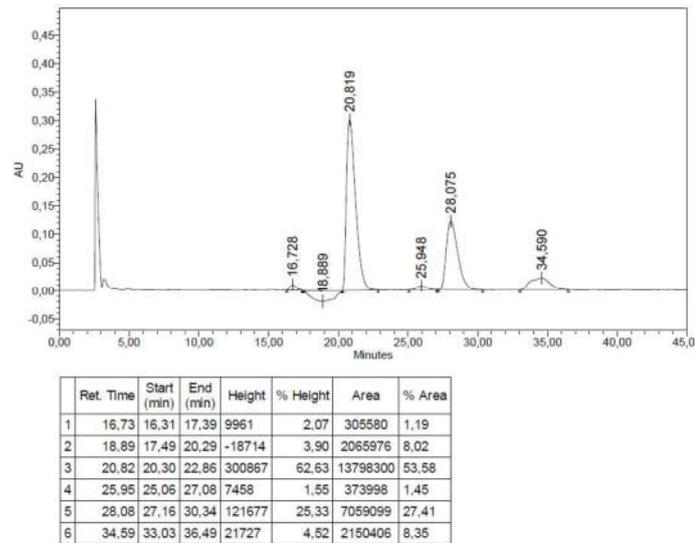
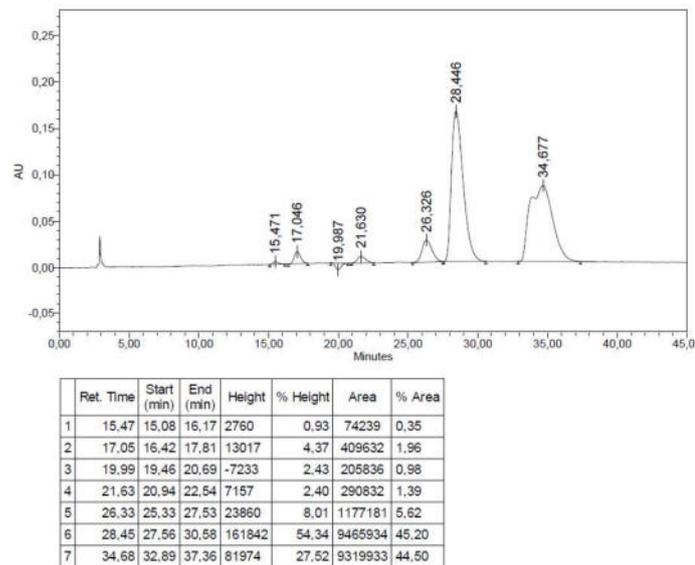
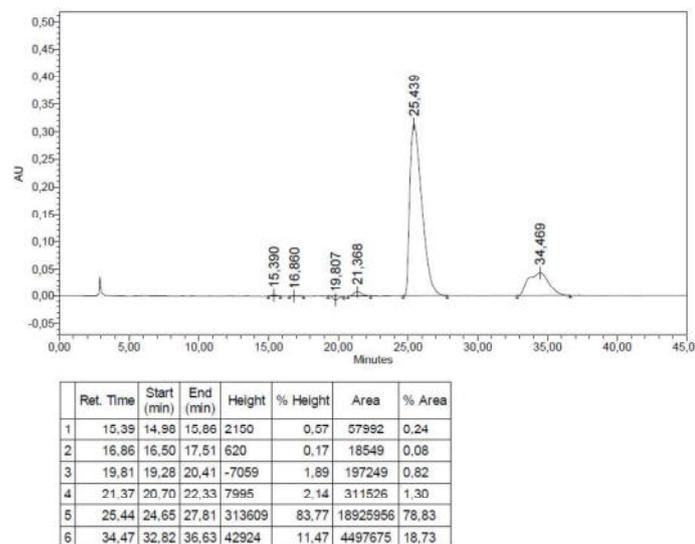
	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	15.29	14,88	15,98	6725	3,04	186068	0,97
2	16,98	16,59	17,42	715	0,32	15999	0,08
3	19,82	19,23	20,40	-7350	3,32	197144	1,03
4	21,13	20,88	21,43	983	0,44	15393	0,08
5	26,19	25,40	27,12	2535	1,15	118722	0,62
6	28,31	27,41	29,98	77000	34,79	4216464	21,94
7	34,19	32,48	36,68	126041	56,94	14469943	75,29

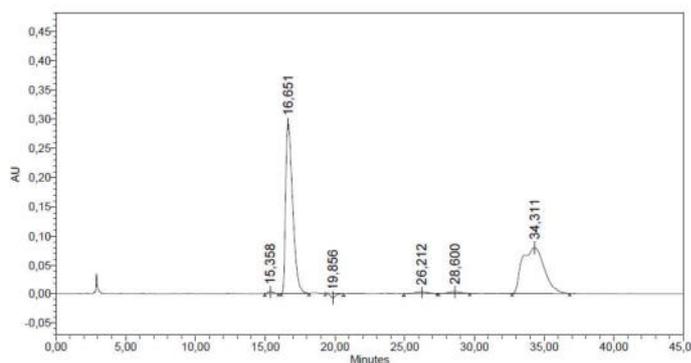
Abbildung 8-67: Reduktion von  $\kappa$ -CPMN durch EryKR1.



	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	16,61	16,08	18,14	449918	79,12	16551339	68,30
2	19,92	19,41	20,50	-7265	1,28	198126	0,82
3	21,54	21,01	22,25	2635	0,46	93253	0,38
4	26,02	25,47	27,09	1345	0,24	72531	0,30
5	28,42	27,45	30,19	79011	13,89	4429349	18,28
6	34,73	33,20	36,76	28497	5,01	2889300	11,92

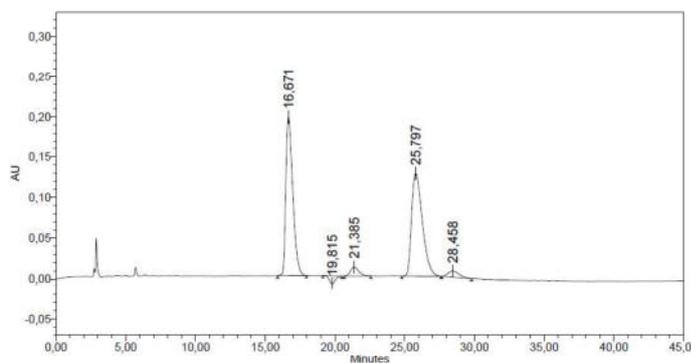
Abbildung 8-68: Reduktion von  $\kappa$ -CPMN durch TyIKR1.

Abbildung 8-69: Reduktion von  $\kappa$ -CPMN durch AmpKR2.Abbildung 8-70: Reduktion von  $\kappa$ -CPMN durch EryKR6.Abbildung 8-71: Reduktion von  $\kappa$ -CPMN durch MycKRA.



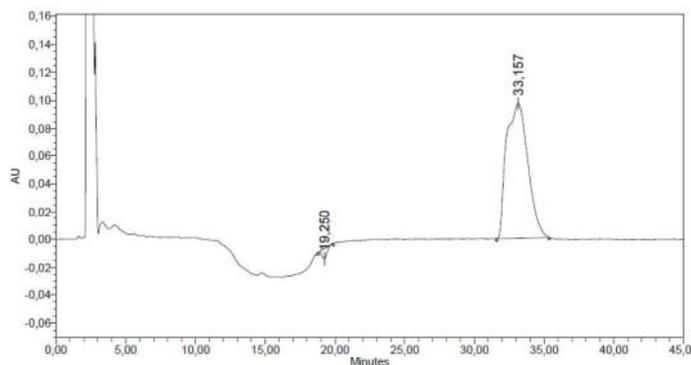
	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	15,36	14,97	15,98	3612	0,93	92586	0,47
2	16,65	16,14	18,13	291434	75,03	10277399	52,05
3	19,86	19,31	20,63	-7375	1,90	209943	1,06
4	26,21	24,93	27,33	3011	0,78	156355	0,79
5	28,60	27,43	29,67	2995	0,77	148806	0,75
6	34,31	32,71	36,85	80018	20,60	8861444	44,88

Abbildung 8-72: Reduktion von  $\kappa$ -CPMN durch MycKRB.



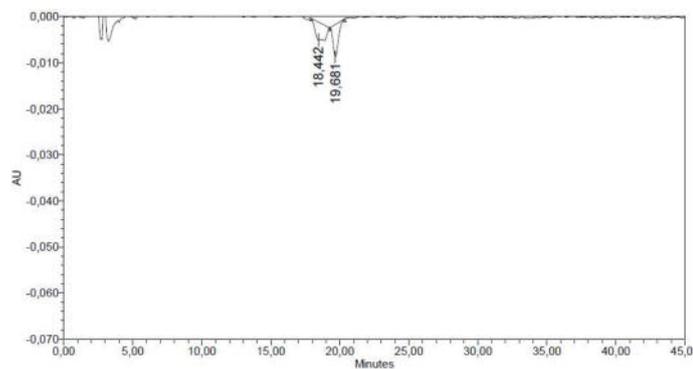
	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	16,67	15,88	17,96	195728	55,88	6729734	46,00
2	19,82	19,13	20,49	-10074	2,88	286403	1,96
3	21,39	20,67	22,57	10915	3,12	449757	3,07
4	25,80	24,79	27,62	125947	35,96	6747446	46,12
5	28,46	27,67	29,79	7611	2,17	417886	2,86

Abbildung 8-73: Reduktion von  $\kappa$ -CPMN durch  $\text{NaBH}_4$ .



	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	19,25	18,78	19,89	-7380	7,06	185815	1,76
2	33,16	31,58	35,37	97100	92,94	10393531	98,24

Abbildung 8-74:  $\kappa$ -CPMN.



	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	18.44	17.91	19.27	-3874	35.83	194704	52.23
2	19.68	19.27	20.36	-6938	64.17	178112	47.77

Abbildung 8-75: Leerlauf mit Laufmittelgemisch Hexan / Isopropanol 95/5 am Tag der  $\kappa$ -CPMN-Proben.

## 8.7.6 Enzymatische Umsetzung von $\kappa$ -CHMN und Referenzen

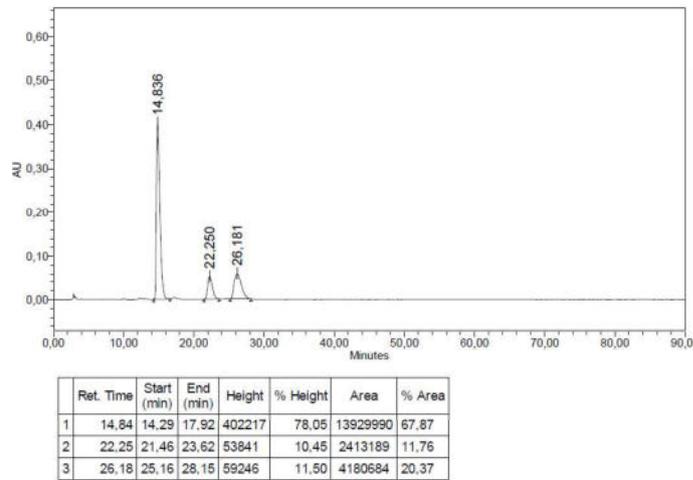


Abbildung 8-76: Reduktion von  $\kappa$ -CHMN durch TyIKR1.

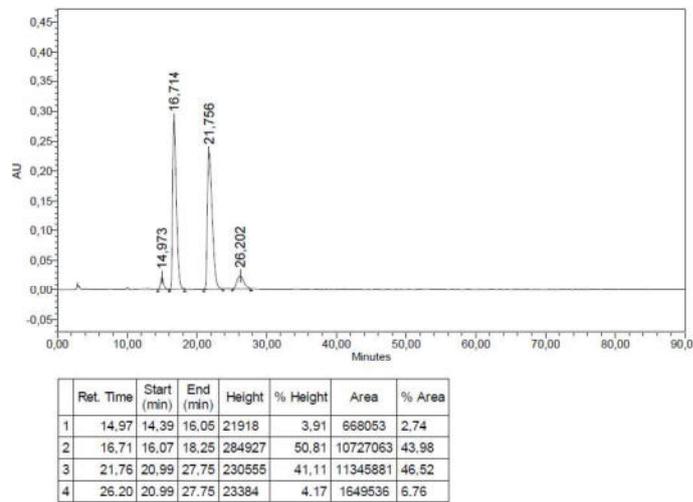


Abbildung 8-77: Reduktion von  $\kappa$ -CHMN durch AmpKR2.

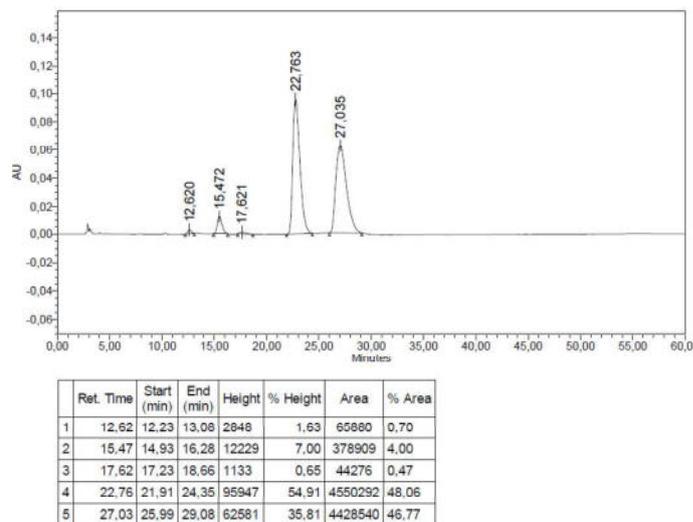
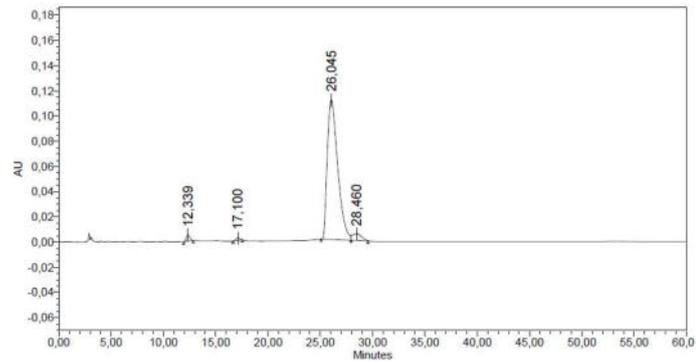
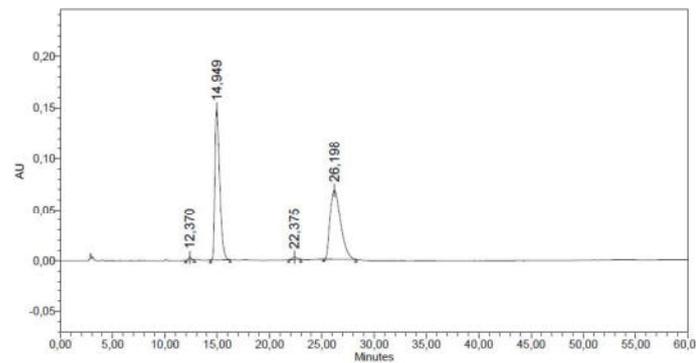


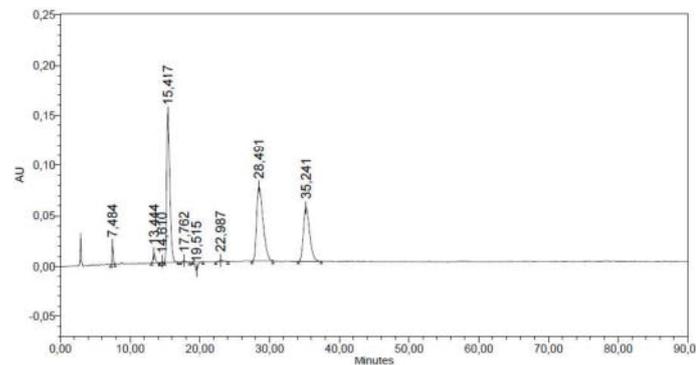
Abbildung 8-78: Reduktion von  $\kappa$ -CHMN durch EryKR6.



	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	12.34	11.94	12.85	4936	4.01	112341	1.38
2	17.10	16.66	17.55	1894	1.54	51271	0.63
3	26.04	25.06	29.55	110910	90.17	7675206	94.14
4	28.46	25.06	29.55	5254	4.27	314179	3.85

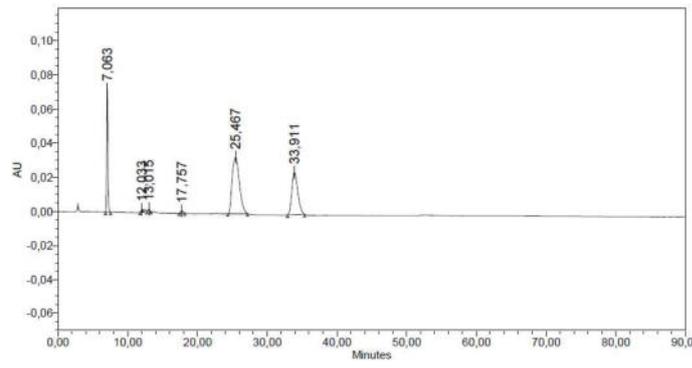
Abbildung 8-79: Reduktion von  $\kappa$ -CHMN durch MycKRA.

	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	12.37	11.98	12.82	2761	1.25	60947	0.64
2	14.95	14.36	16.22	148027	67.04	4726102	49.28
3	22.38	21.83	22.98	2339	1.06	83799	0.87
4	26.20	25.19	28.25	67682	30.65	4719464	49.21

Abbildung 8-80: Reduktion von  $\kappa$ -CHMN durch MycKRB.

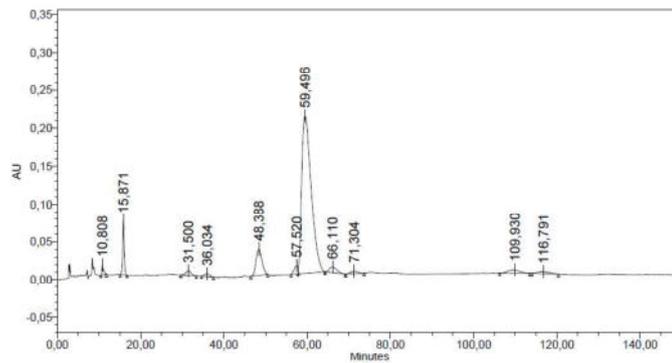
	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	7.48	7.23	7.86	18432	5.87	219615	1.64
2	13.44	13.08	14.18	9289	2.96	210727	1.57
3	14.61	14.24	14.92	1139	0.36	21405	0.16
4	15.42	14.93	16.88	148056	47.11	4678302	34.89
5	17.75	17.26	18.57	1460	0.46	44691	0.33
6	19.52	18.95	20.47	8405	2.67	239110	1.78
7	22.99	22.28	24.06	1378	0.44	65651	0.49
8	28.49	27.48	30.48	73111	23.27	4647292	34.65
9	35.24	34.11	37.41	52975	16.86	3283553	24.49

Abbildung 8-81: Reduktion von  $\kappa$ -CHMN durch NaBH<sub>4</sub>.

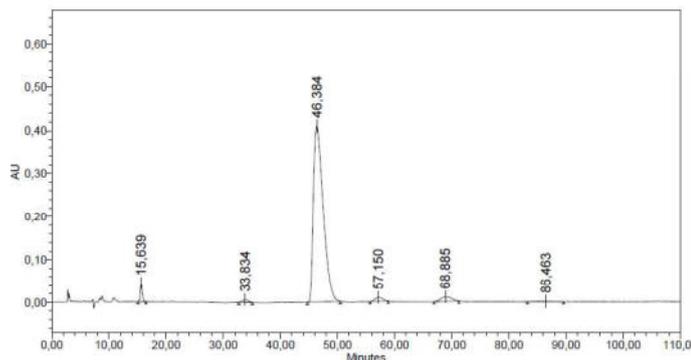


	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	7,06	6,82	7,55	72337	54,11	814998	17,31
2	12,03	11,78	12,25	1016	0,76	14604	0,31
3	13,01	12,75	13,37	1357	1,01	23940	0,51
4	17,76	17,39	18,15	1319	0,99	30757	0,65
5	25,47	24,36	27,18	32936	24,64	2363293	50,20
6	33,91	32,93	35,38	24712	18,49	1460230	31,02

Abbildung 8-82:  $\kappa$ -CHMN.

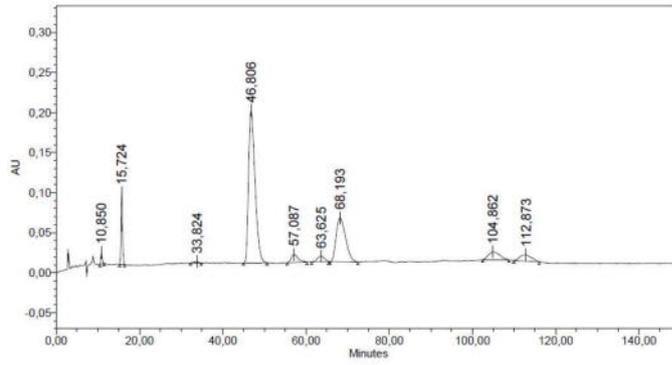
8.7.7 Enzymatische Umsetzung von  $\kappa$ -PMBMN und Referenzen

	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	10,81	10,47	11,80	12869	3,53	371481	0,87
2	15,87	15,05	16,73	70895	19,46	1821375	4,26
3	31,50	29,65	33,38	6286	1,73	560726	1,31
4	36,03	34,62	37,48	3548	0,97	315359	0,74
5	48,39	46,47	50,50	34283	9,41	3372800	7,90
6	57,52	56,12	64,28	10699	2,94	652432	1,53
7	59,50	56,12	64,28	207391	56,94	32833438	76,87
8	66,11	64,35	69,18	7533	2,07	921194	2,16
9	71,30	69,28	73,70	3382	0,93	427154	1,00
10	109,93	106,25	113,45	4464	1,23	871800	2,04
11	116,79	114,03	120,38	2884	0,79	566312	1,33

Abbildung 8-83: Reduktion von  $\kappa$ -PMBMN durch TyIKR1.

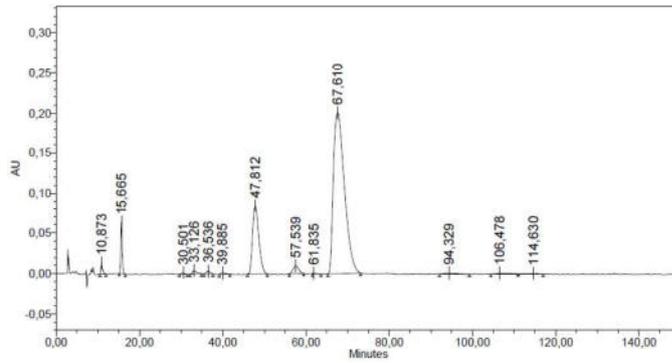
	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	15,64	15,08	16,47	42858	8,92	1065300	2,01
2	33,83	32,72	35,10	6304	1,31	452453	0,86
3	46,38	44,72	50,50	409719	85,28	48821811	92,29
4	57,15	55,70	58,88	9258	1,93	856228	1,62
5	68,88	66,88	71,28	11029	2,30	1467885	2,77
6	86,46	83,25	89,58	1290	0,27	238590	0,45

Abbildung 8-84: Reduktion von  $\kappa$ -PMBMN durch AmpKR2.



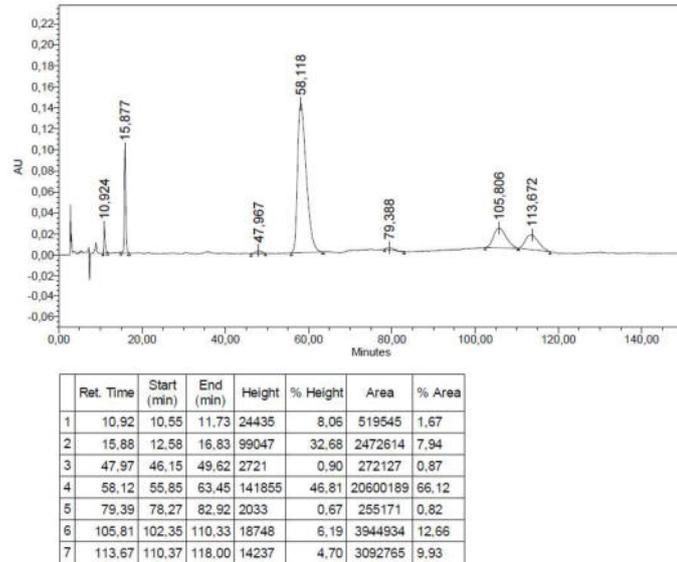
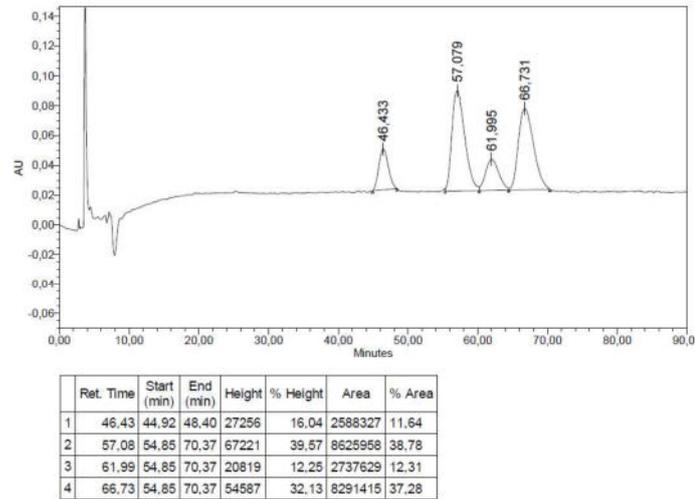
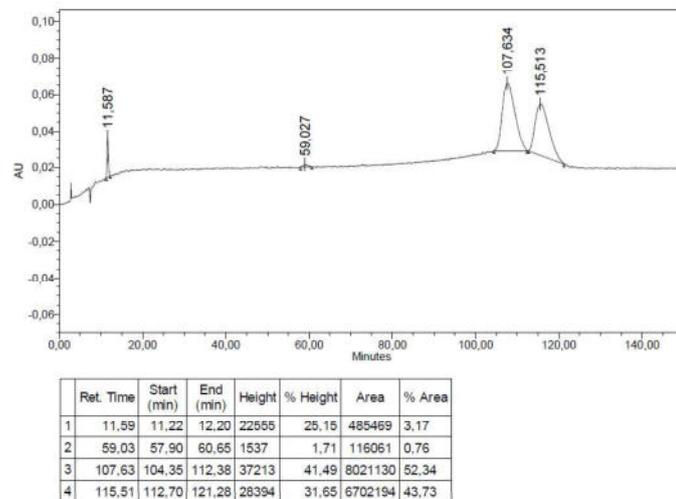
	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	10.85	10.52	11.50	14564	3,77	344089	0,92
2	15.72	15.23	16.45	89421	23,12	2159945	5,78
3	33.82	32,25	34,87	1897	0,49	154904	0,41
4	46.81	44,98	50,63	190196	49,19	20554920	54,97
5	57.09	55,47	60,20	10058	2,60	1172088	3,13
6	63.63	61,33	65,48	7118	1,84	833621	2,23
7	68.19	65,75	72,48	55023	14,23	8664074	23,17
8	104.86	102,45	108,73	10454	2,70	1962720	5,25
9	112,87	109,92	116,03	7955	2,06	1543328	4,13

Abbildung 8-85: Reduktion von  $\kappa$ -PMBMN durch EryKR6.



	Ret. Time	Start (min)	End (min)	Height	% Height	Area	% Area
1	10.87	10.50	11.93	13996	3,59	381162	0,76
2	15.66	15,10	16,60	63732	16,36	1540723	3,07
3	30.50	29,58	31,48	1807	0,46	89069	0,18
4	33.13	32,15	34,90	4261	1,09	313021	0,62
5	36.54	35,47	37,65	3599	0,92	221972	0,44
6	39.89	39,17	41,70	1748	0,45	133777	0,27
7	47.81	45,93	50,67	85242	21,89	8866399	17,65
8	57.54	56,02	59,47	9393	2,41	900111	1,79
9	61.84	61,55	63,62	719	0,18	43875	0,09
10	67.61	65,25	73,10	201332	51,70	36907261	73,47
11	94.33	92,03	99,28	1326	0,34	314443	0,63
12	106.48	104,42	117,00	1360	0,35	331283	0,66
13	114,63	104,42	117,00	926	0,24	188458	0,38

Abbildung 8-86: Reduktion von  $\kappa$ -PMBMN durch MycKRA.

Abbildung 8-87: Reduktion von  $\kappa$ -PMBMN durch MycKRB.Abbildung 8-88: Reduktion von  $\kappa$ -PMBMN durch  $\text{NaBH}_4$ .Abbildung 8-89:  $\kappa$ -PMBMN.



~ ~ ~

*„We are all born naked  
and the rest is drag.“*

~

*„Wir werden alle nackt geboren  
und der Rest ist Verkleidung.“*

~ ~ ~

RuPaul Andre Charles (\*1960)



# Danksagung

Die Jahre meiner Promotion waren an schönen und facettenreichen Situationen reich gefüllt. Die damit verbundenen Erinnerungen habe ich vielen Menschen zu verdanken.

Ich möchte mich als erstes bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Frank Hahn für die abwechslungsreiche und spannende Thematik, seine Unterstützung und Geduld bedanken. Prof. Dr. Rainer Schobert danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich darüber hinaus beim wissenschaftlichen Personal, stellvertretend bei Dr. Jörg Fohler und Dr. Ulrike Lacher, welche in Hannover und Bayreuth die reibungslose Analytik der NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie ermöglicht haben. Selbes gilt für die Sekretariate von Monika Griese und Irmtraud Herold, die eine reibungslose Zusammenarbeit mit der Verwaltung möglich machten. Für die besonderen Kooperationen möchte ich mich bei Prof. Dr. Christian Merten, Dr. Andrea Di Fonzo, dem gesamten AK Breuning und Theresa Roß bedanken. Das überall angenehme Forschungsumfeld wurde vor allem durch die Mitglieder der benachbarten Arbeitskreise ermöglicht: AK Kirschning, AK Kalesse, AK Gaich, AK Cox, AK Unverzagt und AK Schobert.

Ganz außerordentlich möchte ich mich bei allen Mitgliedern des AK Hahn bedanken, die sich mit mir die Labore geteilt und für eine wunderbar angenehme und musikalische Atmosphäre gesorgt haben: Nadine Kandziora, Franziska Hemmerling, Johannes Wunderlich und Lisa Wagner. Allen weiteren Mitgliedern des AKs danke ich auch für die Hilfe bei Problemen und herrlich ideenreichen Mittagessen: Steffen Friedrich, Gesche Berkhan, Frederick Lindner, Tim Hollmann, Theresa Roß und Florian Guth. Vielen Dank auch an alle Masterstudierende, insbesondere an Hendrik Geise und Timm Ensfelder.

Nick Dibbert, Benjamin Schröder, Dobromira Lekova und Clara Oberhauser danke ich für die tolle Zeit außerhalb des Labors in Hannover. Meine Zeit in Bayreuth wurde durch Carmen Schützmann, Julia Bredow, Amin Shabani, Timo Heitmann, Judith Neumeier, Daniel Deuringer und Dayvid Schmidt abwechslungsreich, sportlich und unvergesslich.

Ich möchte auch meiner Schwester und meinen Eltern danken, dass sie immer an mich geglaubt haben und jederzeit bereit waren mich zu unterstützen. Stefan Struzina und Tim Hiebsch möchte ich für ihre besondere Geduld und Zuversicht danken.



~ ~ ~

Diese Seite gehört jenen Menschen,  
die nie gehört werden.

Mögen sie in Zukunft Gehör finden.

~

This page belongs to those people,  
who are never be heard.

May they be heard in the future.

~ ~ ~



## **(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. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).*

(§ 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 (Marius Schröder)