

UNIVERSITÄT
BAYREUTH

*Studien zur Biosynthese des Ambruticin-
Mittelfragments*

DISSERTATION

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

vorgelegt von

Johannes Wunderlich

aus Münchberg

Bayreuth, 2022

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2016 bis November 2022 in Bayreuth am Lehrstuhl Organische Chemie/Lebensmittelchemie unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Frank Hahn angefertigt.

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

Dissertation eingereicht am: 21.11.2022

Zulassung durch die Promotionskommission: 14.12.2022

Wissenschaftliches Kolloquium: 23.05.2023

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Benedikt Westermann

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Frank Hahn	(Gutachter)
Prof. Dr. Matthias Breuning	(Gutachter)
Prof. Dr. Mukundan Thelakkat	(Vorsitz)
Prof. Dr. Andreas Möglich	

*„Wer nichts als Chemie versteht,
versteht auch die nicht recht.“*

GEORG CHRISTOPH LICHTENBERG (1742 – 1799)

INHALTSVERZEICHNIS

I.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
1	EINLEITUNG.....	5
1.1	Antimykotische Polyketide	7
1.2	Biosynthese der Polyketide	10
1.3	Ambruticine	18
1.4	PLP-/PMP-abhängige Enzyme.....	29
1.5	Hydrolasen	34
1.6	Cyclopropanierungen in Polyketidbiosynthesen	35
1.7	Substratchemie	38
2	ZIELSETZUNG	46
3	EIGENE ERGEBNISSE	50
3.1	Synthese mehrfach ungesättigter Substrate	50
3.2	Synthese der AmbG-Carbonsäuresubstrate	69
3.3	Untersuchungen der AmbF-Domänen H und Px.....	73
3.4	Studien zur Stereoselektivität von MycKR _B	105
4	ZUSAMMENFASSUNG.....	113
5	SUMMARY	119
6	EXPERIMENTELLER TEIL	125
6.1	Biologische und biochemische Arbeiten.....	125
6.2	Enzymaktivitätstests.....	145
6.3	Chemische Arbeiten	149
II.	LITERATURVERZEICHNIS	214
III.	ANHANG	222
	PUBLIKATIONSLISTE.....	283
	DANKSAGUNG	285
	(EIDESSTATTLICHE) VERSICHERUNGEN UND ERKLÄRUNGEN.....	287

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SI- und abgeleitete Einheiten, Elementsymbole sowie universell gebräuchliche Abkürzungen sind nicht gelistet.

2TY-Medium	<i>double strength tryptone/yeast extract medium</i> ; zweifaches Trypton/Hefeextrakt-Medium
9-AMA	<i>α-(9-Anthryl)-α-methoxyacetic acid</i> ; <i>α-(9-Anthryl)-α-methoxyessigsäure</i>
Å	Ångström (0.1 nm)
aa	<i>amino acids</i> , (Anzahl) Aminosäuren
abs.	absolut
Ac	Acetyl
ACP	<i>acyl-carrier protein</i> ; Acylträgerprotein
Ado	Adenosyl
AEX	Anionentauscher
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i> ; erworbenes Immundefizienzsyndrom
AIM	Autoinduktionsmedium
Akz	Akzeptor
<i>Amb</i>	Gene aus dem Ambruticin-Biosynthesecluster
Amb	Proteine aus dem Ambruticin-Biosynthesecluster
AMP	Adenosinmonophosphat
AMT	Aminotransferase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
äq	äquatorial
aq.	wässrig
Äquiv.	Äquivalente
Ar	unbestimmter aromatischer Substituent
Ara	Arabinose
AS	Aminosäure
AT	Acetyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
Au	<i>absorption unit</i> ; Absorptionseinheit
A _x	Absorption bei $\lambda = x$ nm
ax	axial
ber.	berechnet
Bn	Benzyl
bp	<i>base pairs</i> , (Anzahl) Basenpaare
brsm	<i>based on recovered starting material</i> ; bezogen auf reisoliertem Startmaterial
Bu	Butyl
CA	Celluloseacetat

Abkürzungsverzeichnis

CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
CEX	Kationentauscher
Cm	Chloramphenicol
coe	Cycloocten
COVID-19	<i>coronavirus disease 2019</i> ; Coronaviruserkrankung 2019
cp	Cyclopentadienyl
CV	<i>column volume</i> ; Säulenvolumen
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DH	Dehydratase
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DMP	Dess-Martin-Periodinan; 1,1,1-Triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-on
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
Don	Donor
DVC	<i>Divinylcyclopropylfragment des Ambruticins</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ee</i>	<i>enantiomeric excess</i> ; Enantiomerenüberschuss
ER	Enoylreduktase
ESI	Elektronensprayionisation
Et	Ethyl
FAAL	<i>fatty acyl:adenylate ligase</i> ; Fettsäure:Adenylat-Ligase
FID	Flammenionisationsdetektor
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i> ; schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie
fwd	<i>forward</i> ; vorwärts
GC	Gaschromatographie
gef.	gefunden
Gew.-%	Gewichtsprozent
GPC	Gelpermeationschromatographie
H	Hydrolasedomäne
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMGS	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> ; Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HWE	Horner-Wadworth-Emmons(-Reaktion)
<i>i</i>	<i>iso</i>
IAA	Iodacetamid
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

Abkürzungsverzeichnis

IR	Infrarotspektroskopie
Kan	Kanamycin
KHMDS	Kaliumhexamethyldisilazid
KOTMS	Kaliumtrimethylsilanolat
KP _i	Kaliumphosphat
KR	Ketoreduktase
KS	Ketosynthase
l	<i>liquid</i> ; flüssig
LDBBA	Lithiumdiisobutyl- <i>tert</i> -butoxyaluminiumhydrid
Lsg.	Lösung
LTDEA	Lithium- <i>tris</i> -(diethylamino)aluminiumhydrid
Me	Methyl
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> ; Molekulargewichtsgrenze
<i>n</i>	<i>normal</i> , primär
n. a.	nicht angegeben
NTA	Nitilotriacetat
P	Pellet nach Zentrifugation
PA	Pyridoxamin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PDBBA	Kaliumdiisobutyl- <i>tert</i> -butoxyaluminiumhydrid
Ph	Phenyl
P _i	Anorganisches Phosphat
pI	Isoelektrischer Punkt
PLP	Pyridoxalphosphat
PMP	Pyridoxaminphosphat
Pr	Propyl
<i>p</i> TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
Px	Pyridoxalphosphat-/Pyridoxaminphosphat-abhängige Domäne
R	unbestimmter Substituent
rev	<i>revers</i> , rückwärts
R _f	Retentionsfaktor
rHWE	Reduktive Horner-Wadsworth-Emmons-Homologisierung
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	<i>solid</i> ; fest

Abkürzungsverzeichnis

SAH	<i>S</i> -Adenosyl-L-homocystein
SAM	<i>S</i> -Adenosyl-L-methionin
SARS-CoV-2	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i> ; Schweres akutes respiratorisches Syndrom Coronavirus Typ 2
SAX	<i>strong anion exchanger</i> ; Starker Anionentauscher
SDBBA	Natriumdiisobutyl- <i>tert</i> -butoxyaluminiumhydrid
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SNAC	<i>N</i> -Acetylcysteaminyll
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SPant	D-Pantetheinyll
SPant ^{Prot}	<i>O,O'</i> -Isopropyliden-D-pantetheinyll
SQD	<i>single quadrupol detector</i> ; einstufiger Quadrupoldetektor
<i>t, tert</i>	<i>tertiär</i>
TEA	Triethanolamin
TES	Triethylsilyll
Tet	Tetracyclin
TFE	Trifluorethanol
TfOH	Trifluormethansulfonsäure
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylen-1,2-diamin
t _R	Retentionszeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜNK	Übernachtkultur
UPLC	<i>ultra pressure liquid chromatography</i> ; Ultrahochdruckflüssigkeitschromatographie
ÜS	Überstand nach Zentrifugation
v/v	<i>volume per volume</i> ; Volumen- je Volumenanteil
Vol.-%	Volumenprozent
w/v	<i>weight per volume</i> ; Gewichts- je Volumenanteil
wfr.	wasserfrei

Gene sind durch Kursivschrift in Kleinbuchstaben gekennzeichnet (z. B. *ambF_HP_x*), Proteine in normaler Schriftart mit großem Anfangsbuchstaben (z. B. AmbF_HP_x). Alle Proteine wurden als His₆-Fusionsproteine verwendet und werden nicht gesondert als solche gekennzeichnet.

1 EINLEITUNG

Tagtäglich ist man einer Vielzahl unterschiedlicher Pathogene ausgesetzt. Bei jeder Berührung, jedem Schluck und jedem Atemzug werden Viren, Bakterien und Pilzsporen aufgenommen.^{[1-}

^{7]} Einige Lebewesen wie Schnecken, Echsen aber auch Vögel haben eine coevolutionäre Entwicklung durchschritten, die sie gegen bestimmte parasitäre Organismen schützen kann.^[8]

Dem Menschen bietet ein solcher Mechanismus allerdings wenig Schutz, da seine Reproduktionszeit deutlich über der der jeweiligen Pathogene liegt und die hohe Diversität der Krankheitserreger diesem Prinzip entgegensteht.^[9] Um sich dennoch in der Umwelt behaupten zu können, verfügt der Mensch über ein sehr flexibles und effektives Immunsystem.^[10] Fehlt jedoch die angeborene bzw. erworbene Immunität gegenüber Krankheitserregern oder medizinische Behandlungsmethoden, so kann der Kontakt mit ihnen dramatische Folgen haben.

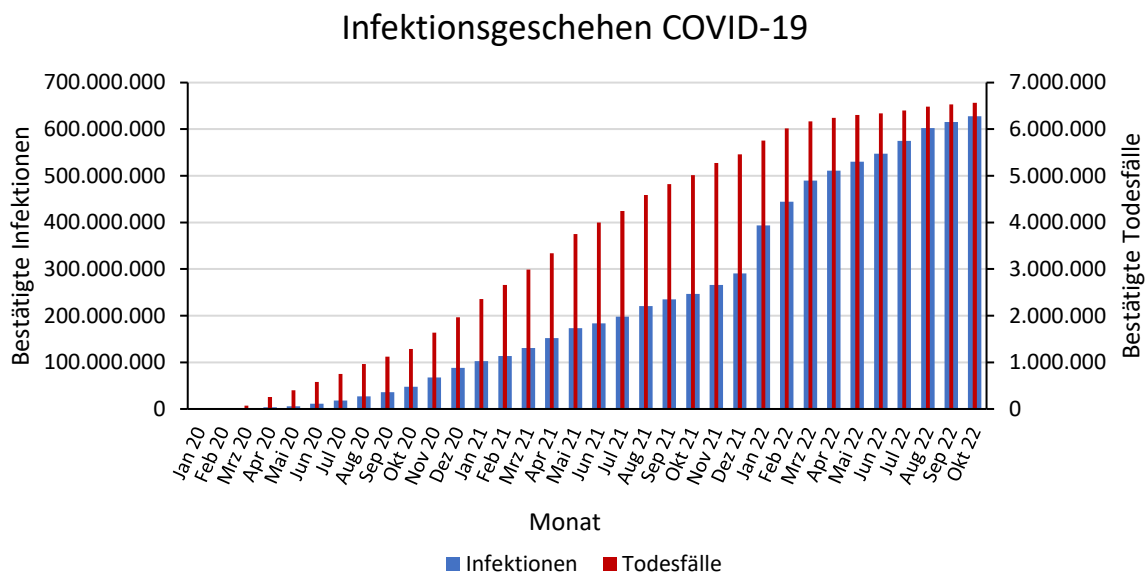


Abbildung 1. Weltweite Fallzahlen der COVID-19-Erkrankungen und damit verbundener Todesfälle (Stand 01.11.2022).^[11]

Dies wird beispielsweise in der Pandemie mit dem SARS-CoV-2-Virus im Jahr 2020 deutlich. Durch das Fehlen eines Impfstoffs oder wirksamen Medikaments gegen die dadurch ausgelöste Krankheit COVID-19 konnte sich das Virus exponentiell ausbreiten (Abbildung 1). Die Folge waren zahlreiche Todesfälle und schwerwiegende sozioökonomische Folgen.^[11,12]

So schwer eine solche Pandemie emotional, sozial und ökonomisch für die gesamte Menschheit zu verkraften ist, sollten wir uns gerade im Hinblick darauf vor Augen halten, dass es abseits

einer solchen Situation Personen gibt, die generell nicht auf den Schutz durch ihr eigenes Immunsystem vertrauen können. Krebs- oder AIDS-Kranke, Personen mit angeborener Immunschwäche oder therapeutisch Immunsupprimierte müssen jederzeit damit rechnen, dass sie sich mit unter anderen Umständen harmlosen Keimen infizieren. Für diese und weitere Risikogruppen können diese opportunistischen Keime zu schweren Infektionen bis hin zum Tod führen, so dass die Betroffenen einen besonderen Schutz bedürfen.^[13–16]

Eine Gruppe von Krankheitserregern, die dabei oft aus dem Fokus herausrückt, sind Dermatophyten, eine – nicht taxonomische – Gruppe von Pilzen, die diverse Hautkrankheiten hervorrufen können.^[17] So werden Onychomykosen (Nagelpilzinfektionen) im üblichen Kontext eher als unangenehmes kosmetisches Problem betrachtet. Dahingegen konnte nachgewiesen werden, dass solche Mykosen für sieben Prozent der Zehenamputationen in Folge einer Diabeteserkrankung ursächlich sind.^[18]

Insbesondere im klinischen Umfeld sind die Hefen der Gattung *Candida* und die Schimmelpilze *Aspergillus* spp. von Bedeutung, da Infektionen damit invasiv und somit lebensbedrohlich werden können.^[19] Bei immunsupprimierten Patienten waren sie für 14% aller Todesfälle der untersuchten nosokomialen Infektionen ursächlich.^[20] Wie bei vielen bakteriellen Krankheitserregern treten bereits seit längerem auch immer öfter pathogene Pilzstämme in den Vordergrund, die resistent gegen die üblicherweise eingesetzten Medikamente sind.^[21–24] Ein weiteres großes Problem in der medikamentösen Behandlung von Mykosen sind die oft gravierenden Nebenwirkungen der eingesetzten Antimykotika.^[25–28]

Durch dieses folgenschwere Zusammentreffen von nebenwirkungsbehafteten Medikamenten und Resistenzen gegenüber diesen, sind hier neben effektiveren Präventionsmaßnahmen ganz klar Grundlagenforschung im Bereich der Natur- und Wirkstoffchemie nötig. Dadurch können sowohl Naturstoffe für die direkte Nutzung ausfindig gemacht als auch neue Leitstrukturen entwickelt und Produktionsmethoden verbessert werden, um Personen, die unter Infektionen leiden, immunschwache wie -kompetente, wirksam behandeln zu können.

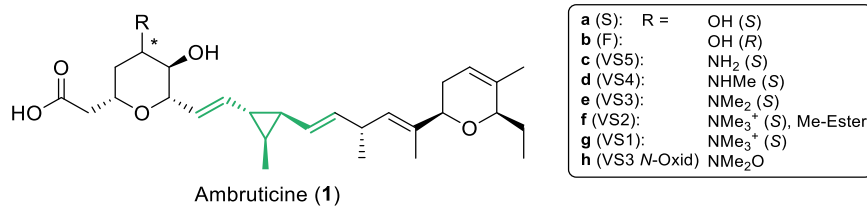


Abbildung 2. Gegenstand dieser Promotion, die antimykotischen Polyketide Ambruticine (1) und die außergewöhnlichen Mechanismen, mit denen unter anderem das Divinylcyclopropyl-Fragment (grün) gebildet wird.^[29,30]

Aus diesem Grund beschäftigte ich mich während meiner Promotion mit der Erforschung eines Teils der Biosynthese der Ambruticine (1, Abbildung 2). Diese sind nicht nur vielversprechende Antimykotika, mit außergewöhnlicher Struktur und Wirkmechanismus, sondern weichen auch biosynthetisch von den üblichen Mechanismen ab, mit denen solche Polyketide produziert werden.

Der Fokus dieser Arbeit liegt dabei auf der Bildung des Divinylcyclopropyl-Mittelfragments (Abbildung 2, grün), bei der sich die Hypothese bislang lediglich auf Isotopenmarkierungsexperimente und Genclusteranalysen stützt.^[31] Die Aufklärung davon liefert nicht nur ein tieferes Verständnis für die Bildung der Ambruticine, wodurch sich auch die synthetische Nachahmung oder die biosynthetische Produktion verbessern lassen, sondern könnte darüber hinaus auch als Startpunkt für die artifizielle Verwendung der Domänen in chemoenzymatischen Synthesen dienen.

1.1 ANTIMYKOTISCHE POLYKETIDE

Auch wenn heute eine Vielzahl antimykotischer Wirkstoffe zur Verfügung stehen, treten oft starke Nebenwirkungen und andererseits zunehmende Resistenzen gegen die üblicherweise eingesetzten Medikamente auf.^[32,33] Die erste Maßnahme muss darum stets die Vermeidung von Infektionen sein. Auch künftig werden jedoch zuverlässige und sichere Antimykotika gebraucht. Um (Kreuz-)Resistenzen möglichst gut ausschließen zu können, ist es wichtig Kandidaten zu wählen, die sich sowohl chemisch als auch in ihrem Wirkmechanismus abheben. Vor diesem Hintergrund ist die sehr diverse Naturstoffklasse der Polyketide bestens geeignet.

1.1.1 POLYENMAKROLIDE

Die im klinischen Alltag bedeutendste Gruppe antimykotischer Polyketide sind die sogenannten Polyenmakrolide, bzw. Polyenmakrolactone.

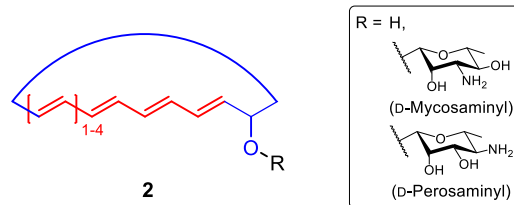


Abbildung 3. Grundstruktur der antimykotischen Polyenmakrolide **2**, bestehend aus einem hydrophoben Poly- (rot) und einem hydrophilen Polyolanteil (blau). In vielen Fällen ist das Makrolacton glykosidisch mit D-Mycosamin oder D-Perosamin verknüpft.

Im Allgemeinen bestehen die Polyenmakrolide **2** aus einem hydrophilen Polyol- (blau) und einem hydrophoben Polyenteil (rot, Abbildung 3).^[34]

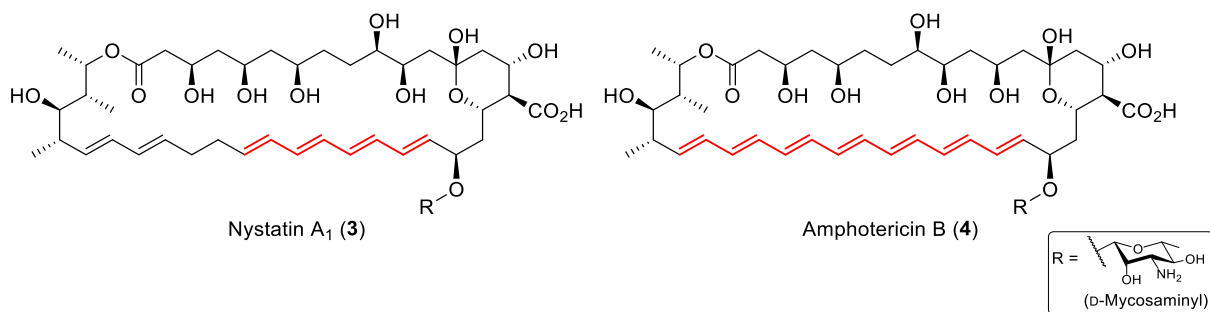


Abbildung 4. Strukturen der Polyenantimykotika Nystatin A₁ (**3**) und Amphotericin B (**4**). Das konjugierte Doppelbindungssystem ist rot markiert.

Die bekanntesten Vertreter sind das Nystatin (**3**) und Amphotericin B (**4**, Abbildung 4). Nystatin wird insbesondere für die topische Anwendung verwendet, wohingegen Amphotericin B (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.) auch in etlichen Präparaten für die systemische Verabreichung erhältlich ist.^[35,36]

Der strukturelle Aufbau der Polyenmakrolide **2** führt zu einer starken Interaktion mit Bestandteilen der pilzlichen Zellmembranen. Insbesondere Ergosterol bildet Komplexe mit dem hydrophoben Teil, während der hydrophile Teil auf der Seite des Zellplasmas exponiert vorliegt. Die antifungale Wirkung wird so durch gemeinsame Assemblierung mit Ergosterol als ionendurchlässige Poren in der Zellmembran,^[37] dem Auflösen der Lipiddoppelschicht^[38] oder

Inhibierung Ergosterol-abhängiger Membranproteine vermittelt.^[39] Durch die ähnliche Interaktion mit Cholesterol aus Zellmembranen der Säugetiere wird allerdings auch das hohe Nebenwirkungspotential bedingt.^[40]

1.1.2 SONSTIGE ANTIFUNGALE POLYKETIDE

Auch wenn heute die Polyenmakrolide mit Abstand am häufigsten therapeutisch eingesetzt werden, finden sich abseits davon etliche weitere Fungizide oder Fungistatika aus der Naturstoffklasse der Polyketide.

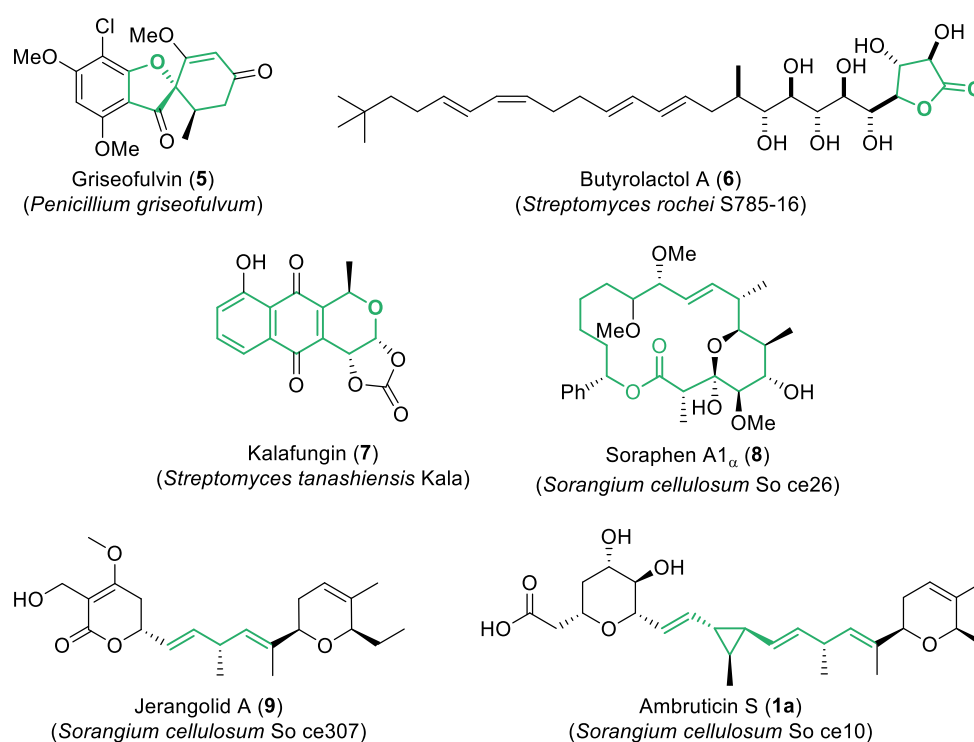


Abbildung 5. Auswahl einiger antifungaler Polyketide und derer Produzenten.^[30,41–45] Charakteristische Strukturmodule sind grün hervorgehoben.

Bereits an einer begrenzten Auswahl antifungaler Polyketide wird deutlich, wie groß die strukturelle Vielfalt innerhalb dieser Gruppe ist (Abbildung 5). Unter den ausgewählten Verbindungen finden sich die Spiroverbindung Griseofulvin (**5**), Lactone mit kleinen Ringgrößen wie Butyrolactol A (**6**) oder Makrolide wie Soraphen A1_α (**8**), das Benzisochroman- chinon Kalafungin (**7**) sowie die 1,4-Diene Jerangolid A (**9**) und Ambruticin S (**1a**), das zusätzlich über das Vinylcyclopropylfragment verfügt. Aber nicht nur strukturell präsentieren

sich die Polyketidantimykotika mit einer faszinierenden Diversität, auch die unterschiedlichen Wirkmechanismen zeigen ihr großes Potential, um neue Wirkstoffe zu etablieren mit denen Resistenzen umgangen und vermieden werden können. Das 1939 entdeckte Griseofulvin (**5**) wirkt als Mitosehemmer, indem es die Ausbildung des Spindelapparats inhibiert.^[46] Bei dem aus *Streptomyces rochei* S785-16 isoliertem Butyrolactol A (**6**) ist der genau Mechanismus unbekannt mit dem es seine Wirkung, insbesondere gegenüber *Aspergillus fumigatus* und *Trichophyton mentagrophytes* entfaltet. Bei dem ebenfalls aus einer *Streptomyces*-Art isoliertem Kalafungin (**7**) ist gut erforscht, dass es das Pilzwachstum hemmt, indem es den Elektronentransport der Atmungskette stört.^[47] Soraphen A1 α (**8**) wiederum agiert über die Hemmung der Acetyl-CoA-Carboxylase einiger agrartechnisch-relevanter Pilze. Deswegen wurde es für den landwirtschaftlichen Bereich getestet, bis man herausfand, dass es teratogen wirkt.^[48] Die beiden sich auch strukturell ähnlichen Verbindungen Jerangolid A (**9**) und Ambruticin F (**1a**) scheinen auch einen gemeinsamen Wirkmechanismus zu haben, wobei er nicht vollständig erforscht ist.^[45,49] Allerdings zeigten Versuche mit ¹⁴C-markiertem Material, dass Jerangolid A (**9**), wie auch die Ambruticine (**1**), die Membranpermeabilität des getesteten Hefepilzes *Pichia anomala* steigert.^[45,50] Obwohl die strukturellen und pharmakologischen Unterschiede zu etablierten Antimykotika von großem Vorteil sind, wird von den erwähnten Substanzen lediglich Griseofulvin (**5**) pharmazeutisch genutzt.^[42]

Dies alles zeigt klar, wie sehr sich eine intensive Erforschung dieser beeindruckenden Naturstoffklasse lohnt, um sie besser zu verstehen, neue Wirkstoffkandidaten zu finden und ihr volles Potential ausschöpfen zu können.

1.2 BIOSYNTHESE DER POLYKETIDE

1.2.1 AUFBAU UND FUNKTION VON POLYKETIDSYNTHESEN

Die Biosynthesen der meisten Polyketide folgen einer stringenten Logik („Kollinearität“).^[51,52] Das heißt man kann aus der Abfolge der einzelnen Domänen die Struktur des Produkts folgern. Dies trifft insbesondere auf diejenigen zu, deren Bildung von bakteriellen Polyketidsynthasen (PKS) des Typ I katalysiert werden. Dies sind die Polyketidsynthasen, die im Gegensatz zu Typ II PKS, multimodular aufgebaut sind und die entsprechenden Reaktionen, im Gegensatz zu Typ III PKS, an ACP-gebundenen Substraten katalysieren. Diese Einteilung kann aber nicht immer strikt vorgenommen werden, teils kommen auch Mischformen der Polyketidklassen und PKS-

NRPS-Hybride (NRPS: Nicht-ribosomale Peptidsynthetase) vor.^[53] Im Folgenden wird die Beschreibung auf die modulare Typ I Polyketidsynthase beschränkt.^[54]

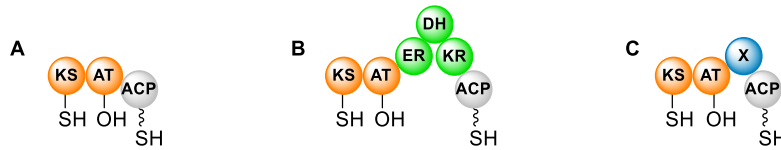


Abbildung 6. Auswahl möglicher Architekturen von Typ I PKS-Modulen. **A)** Minimales (Verlängerungs-)Modul, **B)** Verlängerungsmodul mit vollständiger reduktiver Schleife, **C)** Modul mit Domäne sonstiger katalytischer Aktivität. KS: Ketosynthase, AT: Acyltransferase, ACP: *acyl carrier protein*, KR: Ketoreduktase, DH: Dehydratase, ER: Enoylreduktase, X: sonstige katalytisch-aktive Domäne.

Polyketidsynthasen des Typ I bestehen aus einzelnen Einheiten (Modulen), die für gewöhnlich je einen Verlängerungsschritt und optional nachfolgende Reaktionen katalysieren. Die Module können in die katalytischen Domänen unterteilt werden, wobei ein Modul in der Regel mindestens aus einer Ketosynthase (KS) und einer Acyltransferase (AT) besteht. Zusätzlich enthält ein Modul mindestens ein nicht-katalytisch aktives Acylträgerprotein (ACP, Abbildung 6 A). Zwischen der AT und der flankierenden ACP können sich weitere Domänen, wie die der reduktiven Schleife (KR, DH und ER, Abbildung 6 B), aber auch sonstige Domänen befinden (Abbildung 6 C). Diese finden sich können sich auch am Ende oder außerhalb eines Verlängerungsmoduls befinden.^[54]

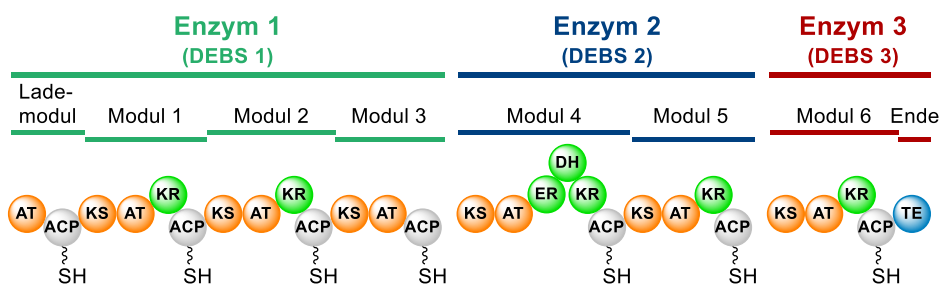
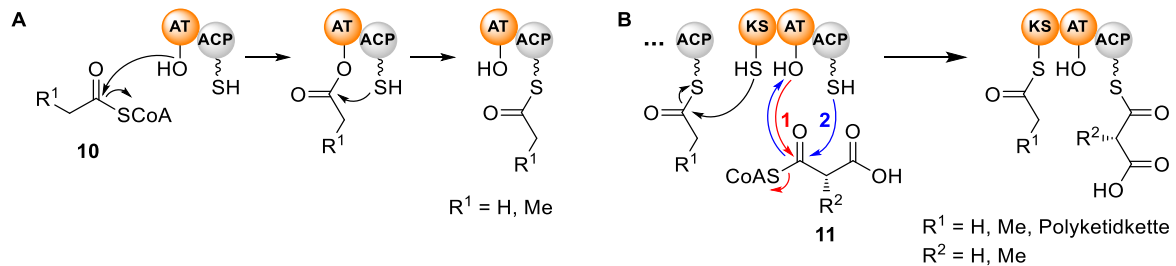


Abbildung 7. Organisation der PKS-Systeme am Beispiel der 6-Deoxyerythronolid B Synthase (DEBS). Die einzelnen Module sind in drei PKS-Enzyme zusammengefasst. Diese werden entsprechend als DEBS 1 – 3 bezeichnet. TE: Thioesterase.^[51]

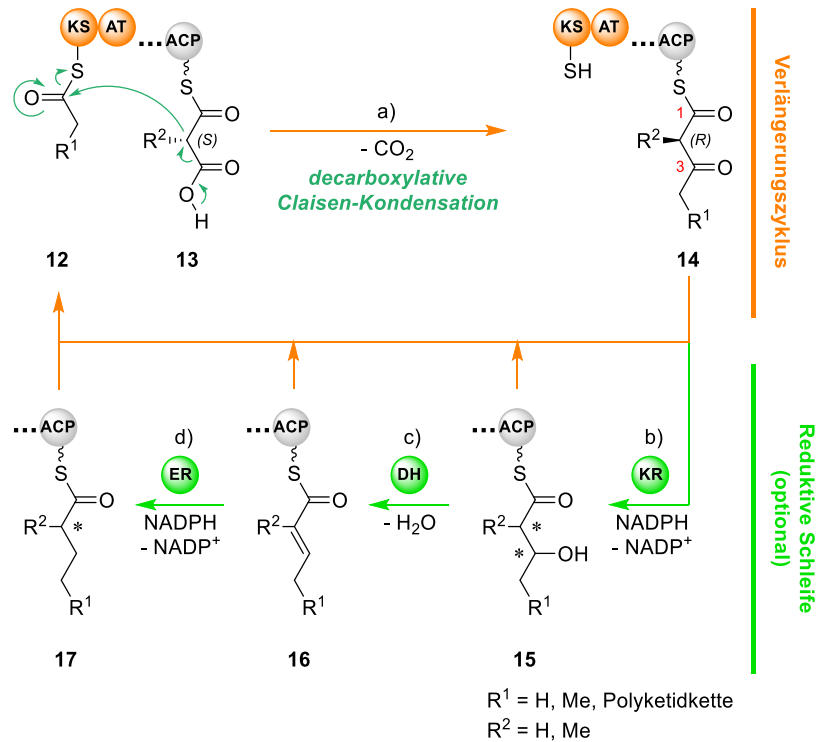
Übergeordnet sind die Module in die einzelnen PKS-Enzyme zusammengefasst. Wie im Beispiel der 6-Deoxyerythronolid B Synthase (DEBS) zu sehen, besteht das gesamte PKS-System meist aus mehreren solcher Enzyme (Abbildung 7). Aus diesem Grund spricht man bei den Polyketidsynthasen (Typ I) auch von Multienzymkomplexen.^[51] Am Ende befindet sich

üblicherweise eine Thioesterase-Domäne, die die Polyketidkette vom Enzymkomplex abspaltet. Optional finden sich danach weitere, außenstehende *tailoring*-Enzyme, die die sezernierte Kette weiter prozessieren.^[54]



Schema 1. Transferreaktionen während der Polyketidbiosynthese. **A)** Beladen des ersten ACPs mit der Starteinheit **10** durch die Acyltransferase; **B)** Übertragen der Polyketidkette auf die KS und nachfolgendem Beladen des ACP mit dem Verlängerungsbaustein **11** durch eine *cis*-AT.

Die Acylträgerproteine dienen sowohl als Akzeptor als auch als Donor für die Transferreaktion der einzelnen Substrate (Schema 1). Die AT katalysiert die Übertragung des Startsubstrats **10** sowie des Verlängerungsbausteins **11** auf das jeweilige ACP. Die Ketosynthase übernimmt vor dem Elongationsschritt die wachsende Polyketidkette. Ist die AT Teil des Moduls spricht man von einer *cis*-AT. Es gibt auch Module innerhalb denen keine eigene AT vorhanden ist. Stattdessen agiert eine AT aus einem anderen Modul oder eine frei außenstehende *in trans*. Die *trans*-AT-PKS zeichnen sich aber nicht nur durch die andere Art des Acyltransfers, sondern oft auch durch eine abweichende Domänenarchitektur, dem gehäuften Auftreten seltener Domänen oder ungewöhnlicher Aktivitäten aus. Das führt auf der einen Seite zu einem großen Feld neuer Reaktionen und Substanzen, erschwert aber auch deutlich die Vorhersagbarkeit der produzierten Naturstoffe.^[55]



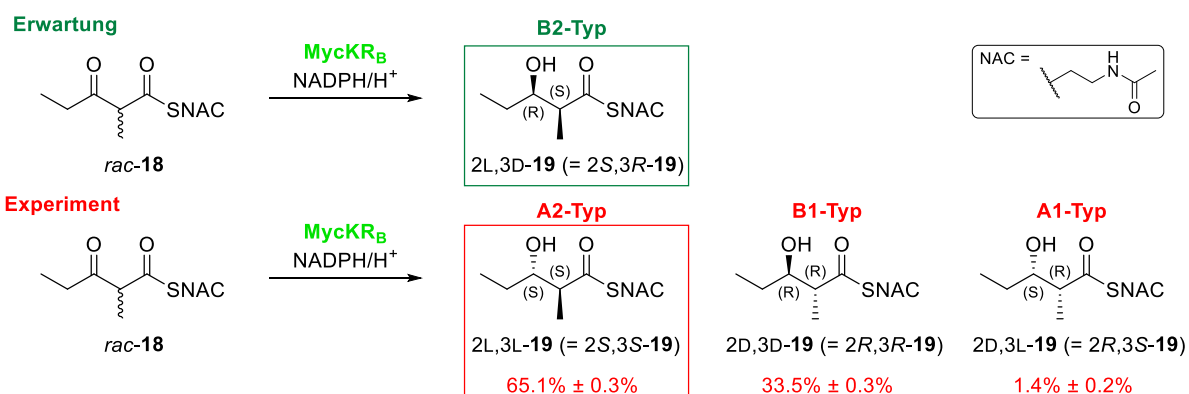
Schema 2. Vereinfachte Darstellung der (möglichen) Reaktionen einer reduzierenden Typ I PKS. a) Die Kettenverlängerung des Acylthioats **12** mit einem (Methyl)Malonatbaustein **13** zum β -Ketoacylthioat **14**, b) optionale Reduktion zum sekundären Alkohol **15**, c) optionale Dehydratisierung zum α,β -ungesättigten Acylthioat **16**, d) optionale Reduktion der aktivierten Doppelbindung zum gesättigten Acylthioat **17**. Obligat vorkommende Domänen/Proteine: orange; optional vorkommende Domänen: hellgrün.^[52]

Die grundlegendste Reaktion der Polyketidbiosynthese ist die wiederholte Kettenverlängerung in einer decarboxylativen Claisen-Kondensation zwischen dem Acylthioat-KS-Komplex **12** und dem (Methyl)Malonyl-ACP **13** (Schema 2, a).^[56] In der Nettogleichung erhält man so die formale Addition eines Acetyl-, bzw. Propionylrests an die wachsende Kette, ähnlich der Fettsäurebiosynthese. Dadurch wird auch der typische 1,3-Abstand erhalten, der für die Oxo- oder abgeleiteten Gruppen der Polyketide charakteristisch ist.

Die daraus entstehenden Ketone, können anschließend auf verschiedene Oxidationsstufen reduziert werden (Schema 2, hellgrün). Die KR reduziert das entstandene Keton **14** zum β -Hydroxythioat **15** (Schema 2, b).^[52] Die Struktur der KR bestimmt zu einem großen Teil die Selektivität der Reduktion, anhand derer die KR in verschiedene Typen (A0 – A2, B0 – B2, C1 – C2) eingeteilt werden, je nachdem welche Produktkonfiguration erwartet, respektive erhalten

wird.^[57–59] Im natürlichen Biosynthesekontext wird das Substrat **14** mit einer hohen Stereoselektivität reduziert und Produkte mit der falschen Konfiguration bspw. durch vorzeitige Hydrolyse von dem ACP abgespalten, so dass man in der Regel stereoisomerenreine Produkte isolieren kann.^[60] Falls in der reduktiven Schleife eine Dehydratase vorhanden ist, kann nun aus dem sekundären Alkohol **15** H₂O eliminiert werden, wodurch in aller Regel das (*E*)-konfigurierte α,β -ungesättigte Acylthioat **16** entsteht (Schema 2, c).^[61] Die Enoylreduktase katalysiert als letztes Glied in der reduktiven Schleife die Reduktion der aktivierten Doppelbindung in **16**, wodurch das gesättigte Acylthiolat **17** entsteht (Schema 2, d).^[56]

Am Ende des Moduls steht das ACP-gebundene Produkt (abhängig vom Grad der Reduktion **14** – **17**) wieder als Substrat für das nächste Modul zur Verfügung. Am Ende des gesamten PKS-Komplexes wird es von der Thioesterase abgespalten, wobei entweder die entsprechende Carbonsäure oder oft auch ein (Makro)Lacton gebildet wird. Teilweise folgen auf die PKS sog. *tailoring*-Enzyme, die das abgespaltene Polyketid weiter prozessieren (z.B. Aminotransferasen, Oxidasen, Methyltransferasen).^[31,54]



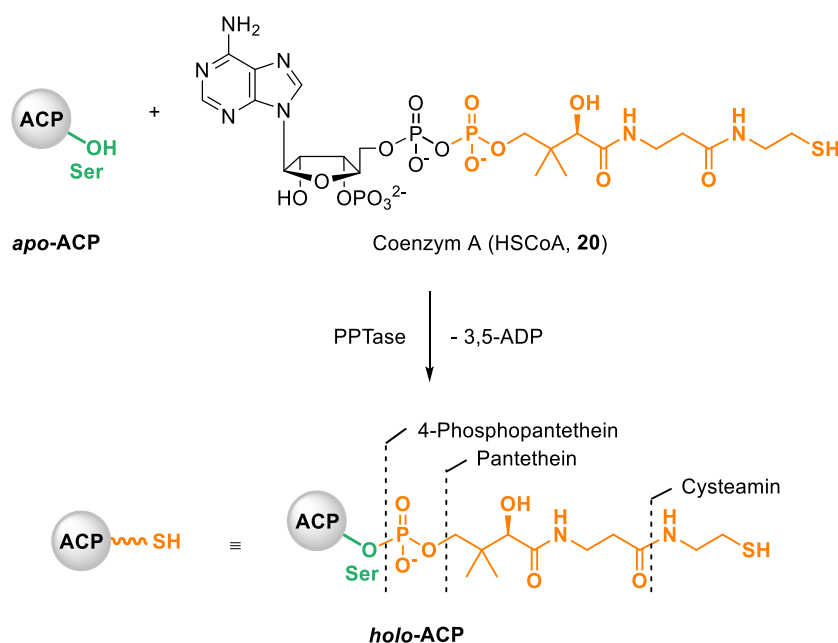
Schema 3. Ergebnis des Experiments von Bali und Weissman zur Reduktion des Diketidanalogs *rac*-**18** mittels NADPH/H⁺ und der Ketoreduktase MycKR_B.^[62]

In vielen Fällen lassen sich die Reaktionen auch *in vitro* durchführen. Beispielsweise lassen sich mit isolierten KR-Domänen hoch stereoselektive Reduktionen durchführen, was sie zu interessanten Biokatalysatoren macht.^[63,64] Allerdings spielt dabei die Art des Substrats bei Selektivität und Aktivität eine große Rolle. So wurde bei der Reaktion des SNAC-Diketids *rac*-**18** unter Anwesenheit der KR_B aus der Mycolacton-PKS nicht das erwartete 2L,3D-Isomer von **19** erhalten, sondern alle drei sonstig möglichen Stereoisomere (Schema 3). Erklärt wurde

dies mit dem Unterschied zwischen der natürlichen Umgebung des Proteins innerhalb der *assembly line* und der experimentellen mit der isolierten Domäne.^[62] Im gezeigten Beispiel sollte aber beachtet werden, dass sich das Substrat **18** stark von denen der MycKR_B unterscheidet.

1.2.2 STRUKTUREN DER PKS-SUBSTRATE

Insbesondere wenn man Bedingungen von *in vivo*-Biosynthesen möglichst genau auf *in vitro*-Experimente übertragen will, ist eine gute Kenntnis der Strukturen ihrer natürlichen Substrate unabdingbar.



Schema 4. Acylgruppen(über)träger im Rahmen der Polyketidbiosynthese. Coenzym A (**20**) dient als Überträger von (Methyl)Malonyl- (PKS I und II) und Acylresten (PKS III). Auch dient es dazu die prosthetische Gruppe 4-Phosphopantethein (orange, in Kurzform als geschlängelte Line) auf eine Serin-Seitenkette (grün) des apo-ACP zu übertragen.^[65]

Im Rahmen der Polyketidbiosynthese sind die Substrate, also die wachsende Kette und die Verlängerungsbausteine, entweder an Coenzym A (HSCoA, **20**) oder an das ACP gebunden. Coenzym A dient auch dazu, die prosthetische Gruppe 4-Phosphopantethein, auf das ACP zu übertragen. Da die ACP an Ribosomen synthetisiert werden, können nur natürliche Aminosäuren eingebaut werden, womit sie noch nicht in der Lage sind Acylgruppen zu übertragen (*apo*-ACP). Mit Hilfe von 4-Phosphopantetheinyltransferasen (PPTasen) wird in einer

Kondensationsreaktion ein Phosphatester zwischen dem 4-Phosphopantetheinarm und einer Serin-Seitenkette gebildet (*holo*-ACP, hier: ACP; Schema 4). Sowohl das ACP wie auch HSCoA (**20**) sind in der Lage die Acylgruppe als Thioester an das primäre Thiol zu binden. Die Thioester können leicht gebildet, aber auch leicht wieder gespalten werden, was die Grundvoraussetzung für einen effektiven Transfer ist.^[65,66] Eine andere Funktion der flexiblen prosthetischen Gruppe ist die Substrate durch die Länge von ca. 20 Å in die aktiven Zentren der Domänen „hineinreichen“ zu können.

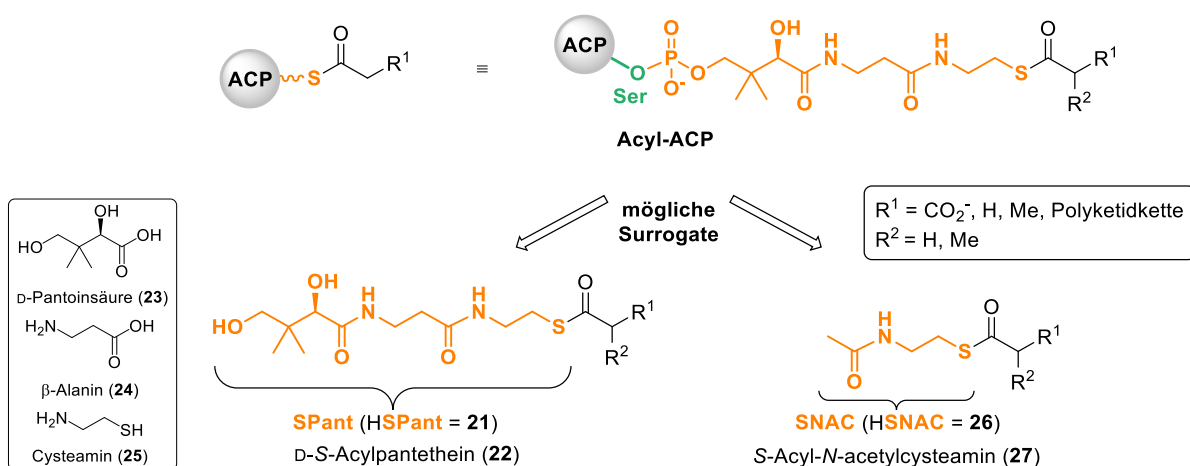
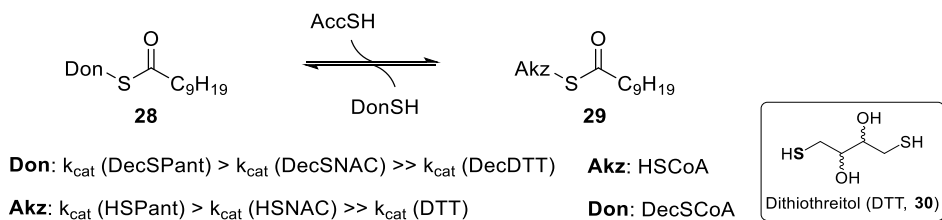


Abbildung 8. Mögliche Surrogate für PKS-Substrate.

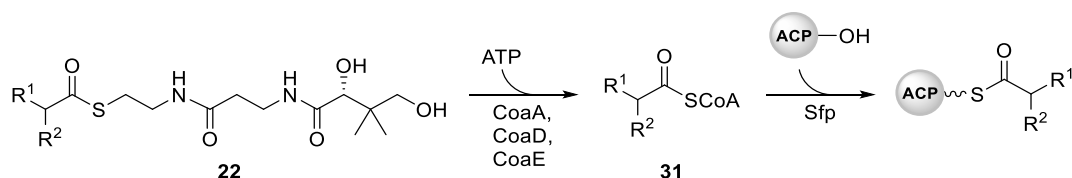
4-Phosphopantethein ist ein Derivat des Pantetheins (**21**), bei dem die primäre Hydroxygruppe mit Phosphorsäure verestert ist. Pantethein (**21**) wiederum besteht aus den Bausteinen Pantoinsäure (**23**), β-Alanin (**24**) und Cysteamin (**25**). Das Amid aus β-Alanin und Pantoinsäure ist auch als Pantothenensäure, bzw. Vitamin B5 bekannt.

Mit dem Wissen über die Struktur der PKS-Substrate lassen sich vereinfachte Substratsurrogate ableiten mit denen sich die Verwendung der hochmolekularen, nur umständlich synthetisierbaren, schwer zu analysierenden und sehr polaren ACP- bzw. CoA-Ester vermeiden lässt (Abbildung 8). Es ist möglich den vollständigen Pantetheinarm (**21**) oder den Cysteamin-Teil in Form des Acetylamids **26** (HSNAC) zu verwenden. Beide lassen sich synthetisch gewinnen und können in die Form der entsprechenden Acylverbindungen **22** bzw. **27** überführt werden (vgl. Kapitel 1.7).



Schema 5. Experiment von Smith *et al.* zur Transferrate zwischen Coenzym A und artifiziellen Acylträgern mittels einer AT aus der tierischen Fettsäuresynthase.^[67]

Smith *et al.* wiesen in Kinetikexperimenten nach, dass Pantethein (**21**) ein deutlich besserer Donor/Akzeptor für den AT-katalysierten Decanoyl-Transfer als *N*-Acetylcysteamin (**26**) und dieses wiederum als Dithiothreitol (**30**) ist (Schema 5).^[67] Insbesondere in fungalen PKS-Systemen sind die Pantetheinthioester **22** in der Lage die natürlichen Bedingungen bestmöglich zu übertragen.^[68] In vielen Fällen eignen sich die verhältnismäßig einfachen SNAC-Thioester allerdings ausgezeichnet als Substrate für die Reaktionen mit einzelnen PKS-Domänen, -Modulen oder auch den vollständigen Polyketidsynthasen.^[69] Durch die relativ problemlose Synthese, einer besseren Atomökonomie und gleichzeitig guten Umsätzen lohnt sich der Einsatz von SNAC insbesondere auch für (semi)präparative biokatalytische Reaktionen bis zum Grammaßstab.^[70]



Schema 6. Chemoenzymatische Synthese von *S*-Coenzym A-Acylenen **31**, bzw. acylierten Acylträgerproteinen nach Moore *et al.*^[71]

Neben einer teilweise erhöhten Selektivität von *S*-Pantetheinacylenen **22** im Vergleich zu anderen Thioacylenen bieten diese weitere wichtige Vorteile wie eine erhöhte Löslichkeit und insbesondere die Möglichkeit chemoenzymatisch daraus CoA- oder ACP-Acylate herstellen zu können (Schema 6). Die Reaktionen lassen sich unter Anwesenheit sämtlicher benötigter Enzyme und Cofaktoren in einer leicht praktikablen Ein-Topf-Reaktion durchführen.^[71]

1.3 AMBRUTICINE

Die Ambruticine (**1**) sind eine Familie von polyketidischen Naturstoffen, die äußerst vielversprechende Kandidaten für neuartige Antimykotika darstellen. Aufgrund ihres Wirkmechanismus, für den es im Gegensatz zum häufigen Target Ergosterol keinen ähnlichen, entsprechend adressierbaren Konterpart im menschlichen Organismus gibt, sind sie deutlich nebenwirkungsärmer als aktuell verwendete Antimykotika.^[72]

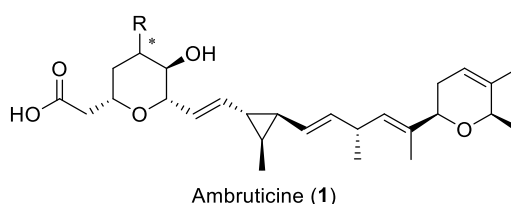


Abbildung 9. Allgemeine Struktur der Ambruticine (**1**).^[29]

Der limitierende Faktor in der Einsetzbarkeit der Ambruticine (**1**) ist allerdings deren hohe strukturelle Komplexität und damit verbundenen aufwändigen Synthese (Abbildung 9). Aus diesem Grund kann ein tieferes Verständnis für die ausgesprochen ungewöhnliche Biosynthese wertvoll sein, um chemoenzymatische oder biomimetische Schritte in deren Synthese etablieren und darüber hinaus auch auf andere Synthesen übertragen zu können.

1.3.1 VORKOMMEN, STRUKTUR UND BIOLOGISCHE WIRKUNG

Die Ambruticine (**1**) wurden 1977 von Ringel *et al.* aus *Sorangium cellulosum* So ce10 (vormals *Polyangium cellulosum* var. *fulvum*) isoliert.^[30] Diese Bakterien gehören zur Ordnung der Myxobakterien, die neben den Actinomyceten (v.a. Streptomyceten) und *Bacillus* spp. zu den größten Naturstoffproduzenten in der Domäne der Bakterien gehören.^[73] *Sorangium* spp. ist dabei innerhalb der Myxobakterien mit ca. 46% der produzierten Naturstoffe die relevanteste Gattung.^[74]

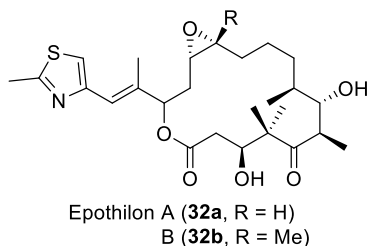


Abbildung 10. Epothilon A (**32a**) und B (**32b**), Zytostatika aus *Sorangium cellulosum* So ce90, die große Bekanntheit erlangten.^[75]

Insbesondere *Sorangium cellulosum* So ce90 hat als Produzent der Epothilone (**32**, Abbildung 10), in der Wirkung dem Taxol ähnliche Zytostatika, große wissenschaftliche Aufmerksamkeit erlangt.^[75] Neben ihrer Eigenschaften als Produzenten pharmakologisch aktiver Substanzen sind auch die biologischen Besonderheiten der Myxobakterien von Interesse. Sie werden oft als Übergang zwischen ein- und vielzelligem Leben angesehen, da sie in der Lage sind sich zu großen Verbänden zu assemblieren und so auf Oberflächen gleiten und Schwärme sowie Fruchtkörper ausbilden können.^[76] Weiterhin fallen sie mit bis zu 13 Mbp außergewöhnlich großen und GC-reiches Genom auf.^[77,78]

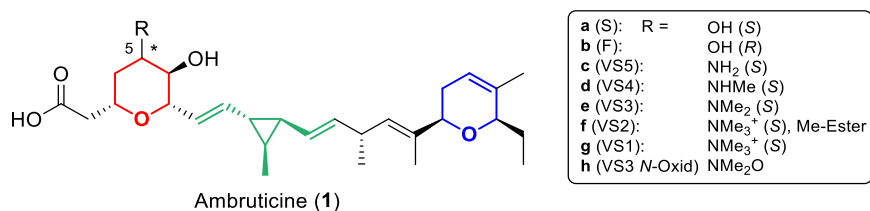


Abbildung 11. Die Ambruticine (**1a-h**), eine strukturell komplexe aber pharmakologisch und biosynthetisch hochinteressante Familie der Polyketide aus *Sorangium cellulosum* So ce10.^[29,30] Die strukturellen Hauptmerkmale sind farbig hervorgehoben.

Die Struktur des Ambruticin S (**1a**) wurde 1977 von von Strandtmann *et al.* mithilfe von MS, NMR, IR und Röntgenkristallstrukturanalyse aufgeklärt.^[30] Höfle, Reichenbach *et al.* beschrieben 1991 die weiteren Mitglieder dieser Familie (Abbildung 11). Diese unterscheiden sich anhand der Reste an C-5 voneinander, wobei neben dem Epimer von **1a**, Ambruticin F (**1b**), insbesondere Aminoverbindungen unterschiedlichen Methylierungsgrads zu finden sind. Zusätzlich konnte noch ein Derivat isoliert werden, bei dem die terminale Carboxylgruppe methyliert ist (Ambruticin VS2 (**1f**)) sowie das Ambruticin VS3 N-Oxid (**1h**).^[29] Die

individuelle Benennung der natürlichen Ambruticinderivate wurde anhand des Retentionsverhaltens bei der Dünnschichtchromatographie (F = fast, S= slow, VS = very slow) und ihres Stickstoffgehalts (VS5 > VS1) vorgenommen.^[29]

Die Ambruticine (**1**) haben durch die Doppelbindungen und den drei Ringsystemen mit dem Tetrahydropyran (rot) im West-, dem Dihydropyran (blau) im Ost- und dem Divinylcyclopropan im Mittelteil (grün) eine rigide Grundstruktur (Abbildung 11). Daneben finden sich in den Ambruticinen (**1**) mit dem Divinylcyclopropandiyl (DVC)-Fragment und dem nicht-konjugierten 1,4-Dien zwei für Polyketide außergewöhnliche Strukturmerkmale.

Die biologische Wirkung der Ambruticine (**1**), insbesondere von Ambruticin S (**1a**), fiel bereits bei der Isolierung auf, da von Strandtmann *et al.* bei der Untersuchung des *S. cellulorum* So ce10-Extrakts die Bioautographie an *Candida parapsilosis* zur Identifizierung möglicher antimykotischer Wirkstoffe nutzten. Hierzu wurden die Extrakte mittels DC aufgetrennt und die DC-Platte in Kontakt mit dem zu hemmenden Organismus gebracht, wobei sich die hemmende Wirkung des Ambruticins S (**1a**) auf den Testorganismus zeigte. In weiteren *in vitro*-Experimenten wurde eine sehr stark hemmende Wirkung u.a. auf die klinisch relevanten Pathogene *Coccidioides immitis* (<0.025 µg/mL), *Epidermophyton floccosum* (0.1 µg/mL), *Microsporium audouinii* (0.2 µg/mL) und *Trichophyton mentagrophytes* (0.4 µg/mL) nachgewiesen. Auch wurde die Toxizität von **1a** in Tierexperimenten an Mäusen bestimmt, wobei die LD₅₀ mit 315 mg/kg KG (intravenös), bzw. >1000 mg/kg KG (peroral) im-Vergleich zu anderen Antimykotika hoch ist.^[30] Spätere Experimente wiesen auch die perorale Wirksamkeit bei geringer Toxizität und Resistenzbildung nach.^[79]

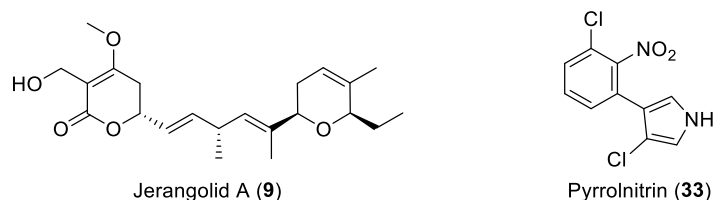


Abbildung 12. Jerangolid A (**9**) und Pyrrolnitrin (**33**). Beide zeigten im Experiment Kreuzresistenzen mit den Ambruticinen (**1**).^[80]

Der Wirkmechanismus der Ambruticine (**1**) ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch fiel bereits früh eine Kreuzresistenz mit den beiden Antimykotika Jerangolid A (**9**) und

Pyrrolnitrin (**33**) auf.^[80] Bei gleichzeitiger Anwendung von Pyrrolnitrin (**33**) und Ambruticin VS3 (**1e**) konnte eine additive Wirksteigerung beobachtet werden.^[50] Beides deutet auf ein gemeinsames Target der drei Verbindungen hin.

Der jetzige Stand der Forschung ist, dass die Ambruticine (**1**) durch Wechselwirkung mit der Gruppe III-Histidinkinase Hik1 auf den Hoch-Osmotischen-Glycerol (HOG)-Signalweg einwirken. Dieser Signalweg ist in den Pilzorganismen für die Reaktionen auf osmotischen Stress verantwortlich. Normalerweise wird er bei hohem osmotischem Druck des umgebenden Mediums aktiviert und führt zu einer erhöhten Ansammlung von Glycerol und später freien Fettsäuren, um dem osmotischen Druck entgegenzuwirken. Fehlt jedoch der äußere Gegendruck, so führt dies zu Zelleckagen, was schließlich zum Tod der Zelle führt.^[81]

1.3.2 BIOSYNTHESE DER AMBRUTICINE

Die Grundlage für die Biosynthesestudien der Ambruticine (**1**) wurde von Reeves *et al.* mit der Identifizierung und Sequenzierung der verantwortlichen Gene gelegt.^[31]



Abbildung 13. Organisation des Genclusters der Ambruticin-PKS. Dieses besteht aus sieben PKS-Genen (grün) und zehn sonstigen Biosynthese-Genen (blau). Die *amb*-Gene sind mit den Buchstaben in den Pfeilen beziffert. Diese haben teils große Sequenzähnlichkeit (78% – 95%) mit denen des Jerangolid-Gencluster aus *S. cellulosum* So ce307 (Asterisk). Abbildung nach Reeves *et al.*^[31]

Durch Mutagenese fanden Reeves *et al.* das Gencluster, welches neben regulatorischen Genen sieben PKS-assoziierte Gene und zehn Gene von *tailoring*-Enzymen beinhaltet (Abbildung 13). Anhand von Sequenzvergleichen mittels BLAST und dem Erstellen von Knockout-Mutanten wurde den meisten Genen eine biosynthetische Funktion zugeordnet.^[31]

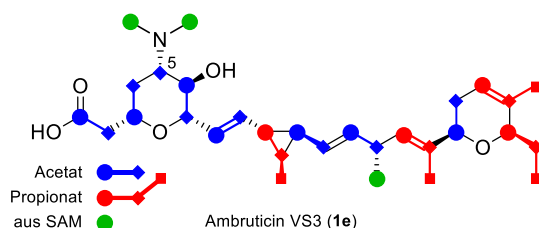
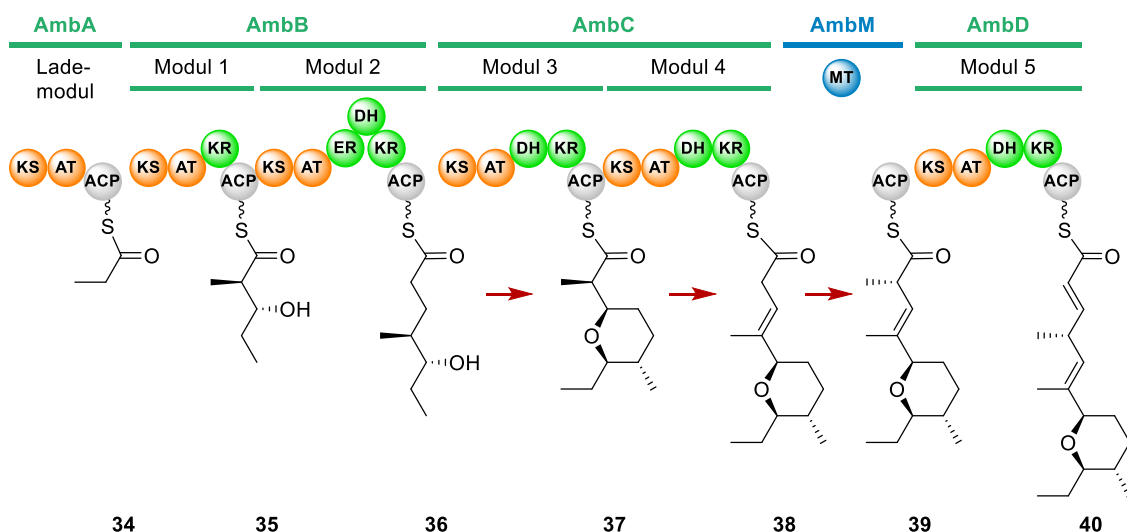


Abbildung 14. Ergebnisse des Isotopenmarkierungsexperiments von Reeves *et al.*^[31]

Mit isotope-markierten Vorstufen konnten sie den Verbleib der jeweiligen Kohlenstoffatome verfolgen (Abbildung 14). Es war ihnen so möglich aufzuzeigen, dass die Bildung der Kette durch eine PKS Typ I katalysiert wurde und alle Kohlenstoffatome des Cyclopropan Teil der Polyketidkette waren. Ebenfalls konnte so nachgewiesen werden, dass das Kohlenstoffatom C-5, welches die unterschiedlichen Substituenten trägt, aus einer Acetateinheit stammt, welche im Laufe der Biosynthese decarboxyliert worden sein muss.^[31]

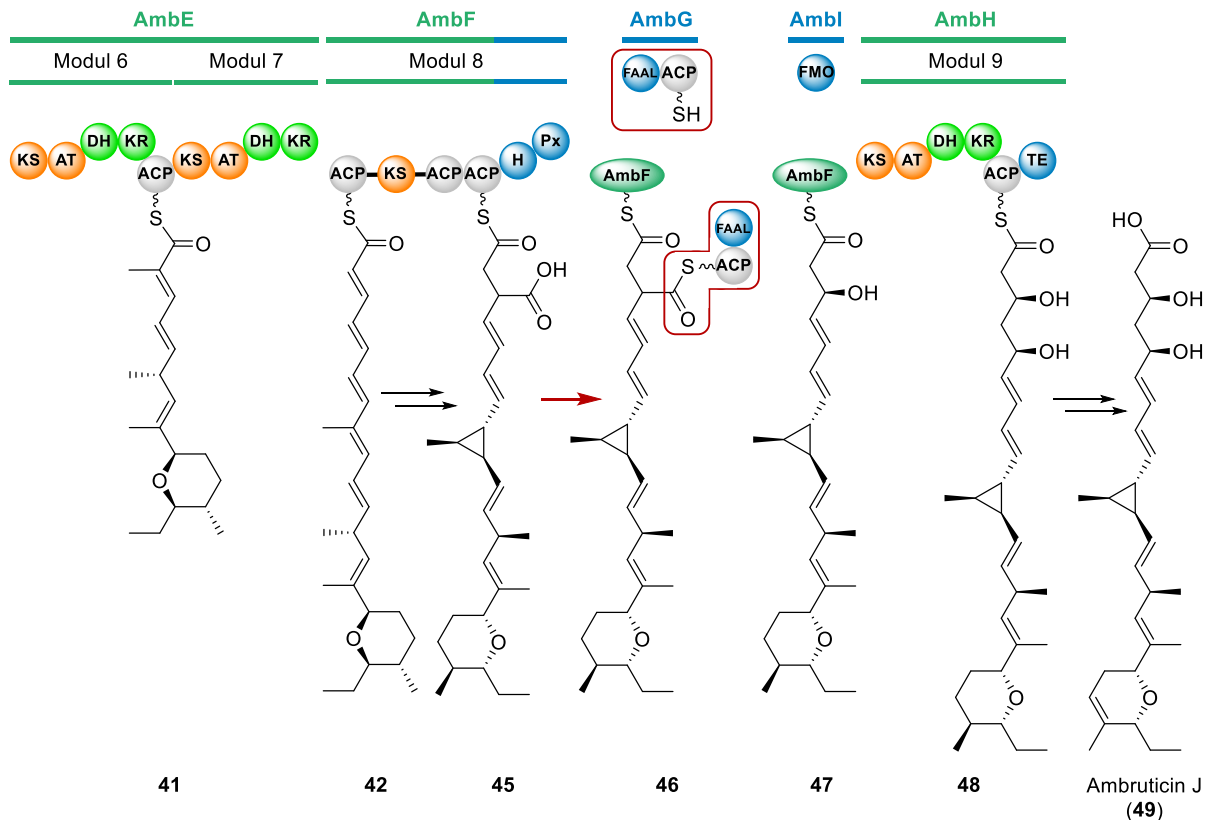


Schema 7. Postulierte Biosynthese bis Modul 5 (AmbD) nach Reeves *et al.* inkl. neuerer Erkenntnisse durch Hahn *et al.* (rote Pfeile).^[31,82] Kettenverlängernde PKS-Enzyme sind grün, sonstige biosynthetische Enzyme blau dargestellt.

Mithilfe der Genclusteranalyse, Sequenzvergleichen, Deletionsmutanten und der Isolierung von Biosyntheseintermediaten stellten Reeves *et al.* 2006 ein Biosyntheschema vor, dass die Synthese des Intermediats bis Modul 5 zeigte.^[31] Die postulierte Biosynthese verläuft hier relativ stringent nach der Kollinaritätsregel (vgl. Kapitel 1.2), wenn man von der fehlenden Cyclase und Epimerase in AmbC, die für die Bildung des Tetrahydropyrans in **37** als auch der β,γ -Doppelbindung in **38** verantwortlich ist, absieht. Hahn *et al.* konnten in ihren nachfolgenden

Arbeiten jedoch schlüssig zeigen, dass die Annahmen für diese Schritte nicht den Ergebnissen aus den *in vitro*-Ergebnissen entsprachen und somit das ursprüngliche Schema um ihre Resultate erweitern (Schema 7, rote Pfeile). So katalysiert die Dehydratase aus Modul 3 *in vitro* sowohl die Eliminierung von Wasser als auch die Cyclisierung zum Tetrahydropyran **37**.^[83] Auch die Dehydratase aus Modul 4 bewirkt nicht nur die Abspaltung von Wasser, sondern auch die Epimerisierung der 4-Methylgruppe und die Verschiebung der Doppelbindung hin zu Intermediat **38**, welches im nächsten Schritt von der Methyltransferase AmbM in α -Stellung methyliert wird.^[84] Nach der Methylierung wird Intermediat **39** von AmbD (Modul 5) um eine nicht-substituierte Doppelbindung verlängert, wodurch die charakteristische 1,4-Dien-Einheit erhalten wird.

Bis zum Ende von Modul 5 verlaufen die Biosynthesen der Ambruticine (**1**) und Jerangolid (**9**) identisch. Während das Intermediat **40** in der Jerangolid-Biosynthese an dieser Stelle abgespalten und die Synthese durch *tailoring*-Enzyme abgeschlossen wird, wird das Intermediat bei den Ambruticinen (**1**) durch einige kryptische, in solcher Weise bisher beispiellos agierender Enzyme weiter prozessiert.

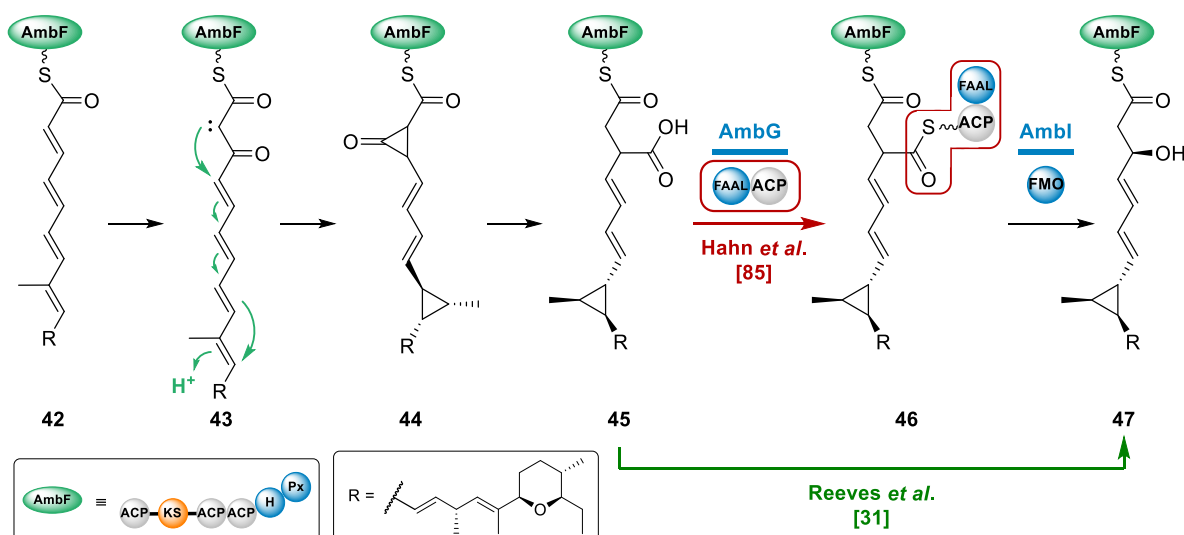


Schema 8. Reeves' *et al.* Vorschlag zur Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments. Bei Modul 8 ist unklar, an welches ACP das Intermediat gebunden ist.^[31] Ab Intermediat **46** wurde darum eine neutrale Abbildungsweise gewählt. Das Schema ist um die Ergebnisse von Hahn *et al.* zur Didomäne AmbG erweitert (rote Markierungen).^[85] Kettenverlängerende PKS-Enzyme sind grün, sonstige biosynthetische Enzyme blau dargestellt. H = Hydrolase; Px = Pyridoxalphosphat-abhängige Domäne; FAAL = Fettsäure:Adenylat-Ligase; FMO = Flavin-abhängige Monooxygenase.

Auch für die Synthese des Mittelfragments schlugen Reeves *et al.* ein Biosyntheschema vor (Schema 8). Die Autoren betonten bei diesem Part aber, dass noch weitere Arbeit vonnöten ist, um den Mechanismus vollständig und zweifelsfrei aufzuklären.^[31] Modul 6 katalysiert demnach die Kondensation des Intermediats **40** mit einer Methylmalonateinheit, nachfolgend die Reduktion des β -Ketons und Dehydratisierung zur Doppelbindung (\rightarrow **41**). Modul 7 erweitert die Kette formal um drei weitere, unsubstituierte Doppelbindungen zum Pentaen **42**.^[31] Solche iterativ agierenden PKS-Module sind zwar eher in fungalen PKS zu finden, kommen vereinzelt aber auch in bakteriellen Typ I PKS vor.^[86,87] Zusätzlich fehlt Modul 7 das C-terminale ACP, wobei es möglicherweise das erste ACP aus Modul 8 (AmbF) nutzt. Dafür spricht, dass sich an der KR C-terminal mehrere Reste befinden, die als *docking domain* (DD) fungieren können. Obwohl eine solche DD am N-Terminus des ersten ACP aus AmbF fehlt,

könnte doch die Zwischensequenz aus ca. 120 Aminosäuren zwischen diesem ACP und der folgenden KS an dem Andocken von AmbE und AmbF beteiligt sein.^[88]

Modul 8 (AmbF) ist das wohl ungewöhnlichste Modul innerhalb der Ambruticin-Biosynthese. Es ist aus einem *N*-terminalen ACP und einer KS gefolgt von zwei weiteren ACP aufgebaut. Dieses Motiv aus KS-ACP-ACP findet sich normalerweise in 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthasen (HMGS), die den Einbau von β -Methylverzweigungen in Polyketidketten ermöglichen.^[89] Aber auch in mindestens einem anderen, literaturbekanntem PKS-Cluster finden sich mehrere nicht HMGS-assoziierte ACP hintereinander, welche teils nicht obligat sind, aber zu einer gesteigerten Produktion führen.^[90,91] C-terminal befinden sich in Modul 8 mit der Hydrolase (H)- und Pyridoxylphosphat-abhängigen (Px)-Domäne zwei nicht-kanonische Domänen.



Schema 9. Die von Reeves *et al.* postulierten Reaktionen, die von AmbF, AmbG und AmbI katalysiert werden.^[31] Während Reeves *et al.* die direkte Reaktion von Intermediat **45** zu **47** vorschlugen (grüner Pfeil), konnten Hahn *et al.* zeigen, dass die Didomäne AmbG durch Aktivierung der Säure als ACP-Dithioester sehr wahrscheinlich maßgeblich an der Reaktion beteiligt ist (roter Pfeil und Markierungen).^[85] Da nicht bekannt ist, an welchem ACP von AmbF das Substrat zu welchem Moment gebunden ist, wurde eine neutrale Darstellungsweise (s. Kästchen links unten) gewählt.

Reeves *et al.* nahmen an, dass AmbF zuerst die Kettenverlängerung zum β -Ketopentaen **43** katalysiert (Schema 9). Da Modul 8 keine eigene Acyltransferase beinhaltet, muss dafür eine aus einem anderen Modul als *trans*-AT fungieren. Am β -Ketopentaen **43** soll eine Favorskii-ähnliche Umlagerung mit einem Elektronenshift entlang des Polyens unter Ringschluss zum Cyclopropan und gleichzeitig zwischen C-2 und C-4 zum Cyclopropanon stattfinden (\rightarrow **44**).

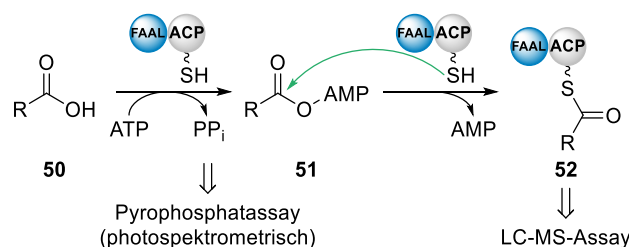
Ob die angedeutete Protonierung der Doppelbindung vor, während oder nach dem Ringschluss erfolgt, wurde nicht diskutiert. Das Cyclopropanon solle hydrolytisch zur verzweigten Carbonsäure **45** geöffnet und diese dann zum sekundären Alkohol **47** decarboxyliert werden.^[31]

Welche Domänen, bzw. welche Enzyme für die Reaktionen von **43** zu **47** verantwortlich sind, wurde von Reeves *et al.* nicht genau zugeordnet. Sie hielten es aber für möglich, dass die H-Domäne als α/β -Hydrolase die hydrolytische Ringöffnung und die Flavin-abhängige Monooxygenase (FMO) AmbI die oxidative Decarboxylierung der verzweigten Säure katalysiert. Als Beleg für die postulierte Aktivität von AmbI wird auf die hohe Sequenzverwandtschaft (45% Identität, 63% Ähnlichkeit) zu PedG aus der Pederin-Biosynthese verwiesen.^[31] PedG ist ebenfalls eine FMO und katalysiert die oxidative Spaltung eines Thioesters zum Alkohol.^[92] Die Funktionen der Px-Domäne und auch der Didomäne AmbG konnte von Ihnen hingegen nicht zugeordnet werden. AmbG wurde als Adenylierungs (A)-Thiolierungs (T)-Didomäne mit ungewöhnlicher Substratselektivität annotiert. Solche A-Domänen finden sich normalerweise in NRPS und aktivieren die Aminosäuren als AMP-Anhydride unter Verbrauch von ATP. Aufgrund dessen und der häufigen Funktion von Px-Domänen als Aminotransferasen wurde eine zwischenzeitlich installierte Amingruppe diskutiert.^[31] Hahn *et al.* konnten in Experimenten allerdings zeigen, dass es sich bei AmbG nicht um eine A-T-Didomäne, sondern vielmehr um eine FAAL-ACP-Didomäne handelt.^[85] FAAL (*fatty acyl:adenylate ligase*; Fettsäure:Adenylat-Ligase) bilden Acyl-AMP-Intermediate, die anschließend auf ein ACP übertragen werden. Die Bildung des entsprechenden ACP-Thioesters könnte die Spaltung durch AmbI erleichtern. Dies stünde auch besser in Homologie zum bereits erwähnten PedG, das ebenfalls einen Thioester spaltet.^[92]

Nach der Bildung des Cyclopropans und des sekundären Alkohols wird **47** von dem kanonischen PKS-Modul AmbH um eine Acetateinheit verlängert, das entstandene β -Keton zum Alkohol reduziert und das Intermediat **48** von der TE am Ende von Modul 9 abgespalten. Nach Oxidation des Tetrahydropyrans zum Dihydropyran durch die zwei *tailoring*-Enzyme AmbO und AmbP wird Ambruticin J (**49**) erhalten, welches als zentrale Zwischenstufe dann von weiteren *tailoring*-Enzymen zu den jeweiligen Ambruticin-Derivaten umgesetzt wird.^[31]

1.3.3 CHARAKTERISIERUNG DER DIDOMÄNE AMBG

Die Didomäne AmbG wurde von Reeves *et al.* als A-T-Didomäne bezeichnet, wie sie normalerweise in NRPS vorkommen. Die biosynthetische Funktion blieb dabei unklar.^[31] Um diese offene Frage zu klären, haben Hahn *et al.* die Didomäne AmbG eingehender untersucht. Durch bioinformatische und enzymologische Analysen sollte sie in den PKS-Kontext eingeordnet und ihre Funktion in der Ambruticin-Biosynthese bestimmt werden.^[85]



Schema 10. Aktivierung von Carbonsäuren durch die FAAL-ACP-Didomäne AmbG nach Hahn *et al.*^[85] Die Selektivität im ersten Schritt wurde durch Quantifizierung des freigesetzten Pyrophosphats analysiert, die des anschließenden Acylgruppen-transfers auf das ACP mittels LC-MS. FAAL: *fatty acyl:adenylate ligase*, Fettsäure:Adenylat-Ligase.

Anhand von Sequenzvergleichen und Strukturhomologiemodellen konnten sie AmbG als eine FAAL-ACP-Didomäne mit ungewisser Substratspezifität reannotieren. Die FAAL aktiviert die Fettsäure **50** durch Kondensation mit ATP, wobei unter Pyrophosphataustritt das gemischte AMP-Anhydrid **51** entsteht (Schema 10). In einem zweiten Schritt wird dann das ACP unter Freiwerden von AMP zu **52** acyliert.

Die bioinformatisch vermutete Aktivität wurde in *in vitro*-Experimenten mit einer Vielzahl unterschiedlicher Carbonsäuren überprüft. Der erste Schritt wurde mithilfe eines Testkits untersucht, dass die Bestimmung der freigesetzten Menge an Pyrophosphat ermöglicht. Es beruht auf der enzymatischen Hydrolyse des Pyrophosphats und anschließender phosphorolytischer Spaltung eines photospektrometrischen Reagenzes.

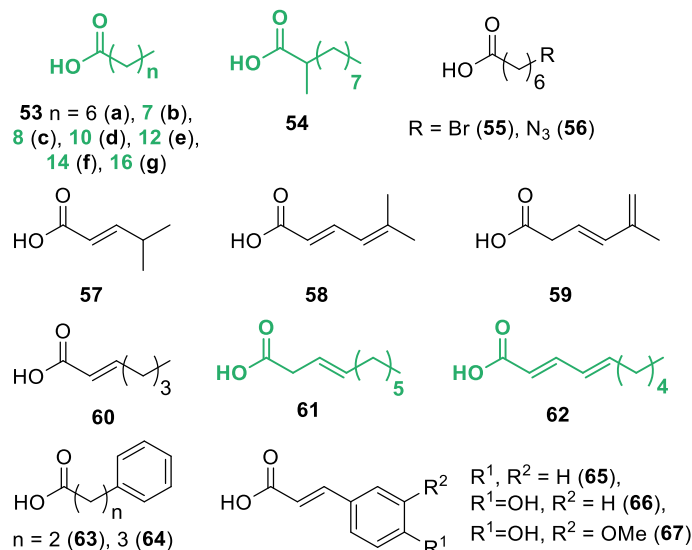


Abbildung 15. Getestete Carbonsäuren, die von AmbG in den *in vitro*-Enzymaktivitätstests akzeptiert wurden. Alle Gezeigten wurden effizient adenyliert, die farbig hervorgehobenen wurden vollständig auf das ACP übertragen.^[85]

Von 41 getesteten Carbonsäuren wurden nur langkettige Fettsäuren (**53**, $\text{C}_8 - \text{C}_{18}$), verzweigte (**54**), funktionalisierte (**55**, **56**) und ungesättigte Fettsäureabkömmlinge (**57** – **62**), sowie aromatische Carbonsäuren (**63** – **67**) akzeptiert (Abbildung 15). Aminosäuren, wie sie für A-Domänen typisch wären, wurden hingegen kaum bis nicht umgesetzt.

Für die Effizienzbestimmung des Acylgruppentransfers wurde die Menge des gebildeten Acyl-AmbGs mittels LC-MS bestimmt. Von den aktivierten Carbonsäuren wurden nur langkettige Fettsäuren (**53c-g**, $\text{C}_{10} - \text{C}_{18}$), Nonansäure (**53b**), Methyldecansäure (**54**) und 3- (**61**), bzw. 2,4- ungesättigte Decansäure (**62**) effizient auf das ACP übertragen. In Vergleichsexperimenten, bei denen AmbG mit jeweils zwei Carbonsäuren gemeinsam inkubiert wurde, zeigte sich eine Präferenz für die Kettenlängen C_{14} sowie C_{16} und allgemein hin zu höheren Kettenlängen. Die ungesättigte Carbonsäure **61** mit zehn Kohlenstoffatomen wurde ähnlich gut akzeptiert wie die etwas längere Fettsäure **53d**. Dies spricht für einen positiven Einfluss des π -Systems, der die niedrigere Hydrophobizität durch die niedrigere Kettenlänge kompensiert.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass für eine effiziente Adenylierung und Acylierung ein hydrophobes Substrat mit einer Kettenlänge von mindestens neun Kohlenstoffatomen benötigt wird. Durch die Vergleichsexperimente wurde von Hahn *et al.* der Schluss gezogen, dass das natürliche Substrat eine Kettenlänge von mindestens C_{14} haben sollte.

Zusammengefasst ist AmbG das erste Beispiel einer FAAL, das augenscheinlich ein Polyketidintermediat auf einer späten Stufe der Biosynthese umsetzt. Ein π -System und eine Verzweigung in der Nähe der Carbonsäure wie sie im Biosyntheseintermediat **45** vorhanden sind, wurde in beiden katalysierten Schritten toleriert. Hahn *et al.* betonten noch einmal, dass es nicht zwingend notwendig ist, dass das Substrat an ein ACP gebunden ist, der Einfluss davon aber in weiteren Studien untersucht werden sollte. Auch unterstrichen sie die Bedeutung eines möglichst realistischen Surrogats von **45** oder das Einbinden von AmbG in Tests mit anderen Enzymen aus der Ambruticin-Biosynthese, um möglichst genaue Aussagen treffen zu können.^[85]

1.4 PLP-/PMP-ABHÄNGIGE ENZYME

Pyridoxalphosphat (PLP, **69**), bzw. Pyridoxaminphosphat (PMP, **70**) sind die aktiven Formen des Vitamin B₆ (Pyridoxin, **68**, Abbildung 16). Es sind vermutlich die Cofaktoren mit der breitesten Anwendung an enzymkatalysierten Reaktionen.^[93] Enzyme, die PLP/PMP als Cofaktor verwenden, finden sich sowohl in den elementarsten Stoffwechselwegen wie der Biosynthese und dem Abbau von Aminosäuren,^[93,94] der Bereitstellung von α -D-Glucose-1-phosphat aus dem Energiespeicher Glycogen,^[95] der Biosynthese von Hämoglobin,^[96] als auch in spezielleren Reaktionen wie der Biosynthese von Deoxy- und Aminosuktern^[97,98] und dem Aufbau einer Vielzahl, insbesondere stickstoffhaltiger, Sekundärstoffe.^[99]

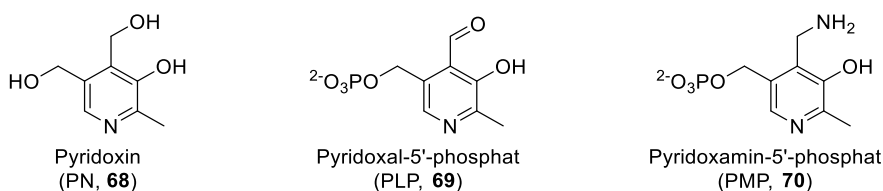
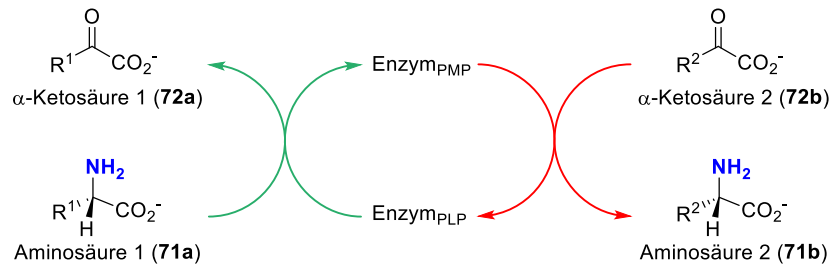


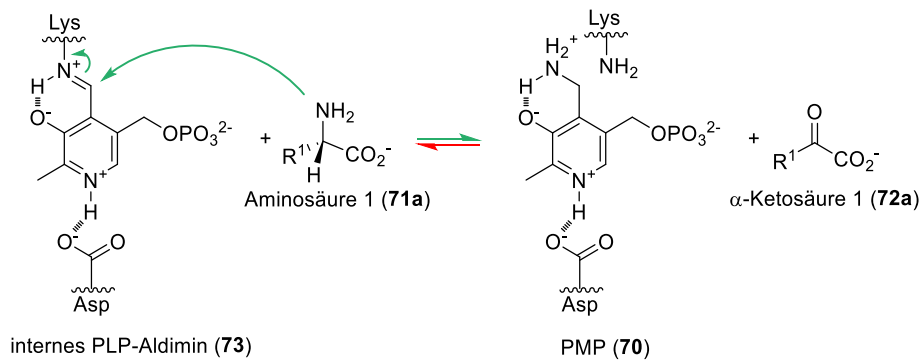
Abbildung 16. Pyridoxin (Vitamin B₆, **68**) und die daraus abgeleiteten, biologisch aktiven Formen Pyridoxal-5'-phosphat (**69**) und Pyridoxamin-5'-phosphat (**70**).^[100]

Als essenzielle Verbindungen müssen PLP und PMP über die Nahrung aufgenommen werden. Meist geschieht dies als Pyridoxin (**68**), welches darum oft als eigentliches Vitamin B₆ bezeichnet wird. Die daraus entstehenden aktiven Formen PLP (**69**) und PMP (**70**) werden durch Oxidation und Phosphorylierung, und ggf. Transaminierung im Körper hergestellt.^[101]



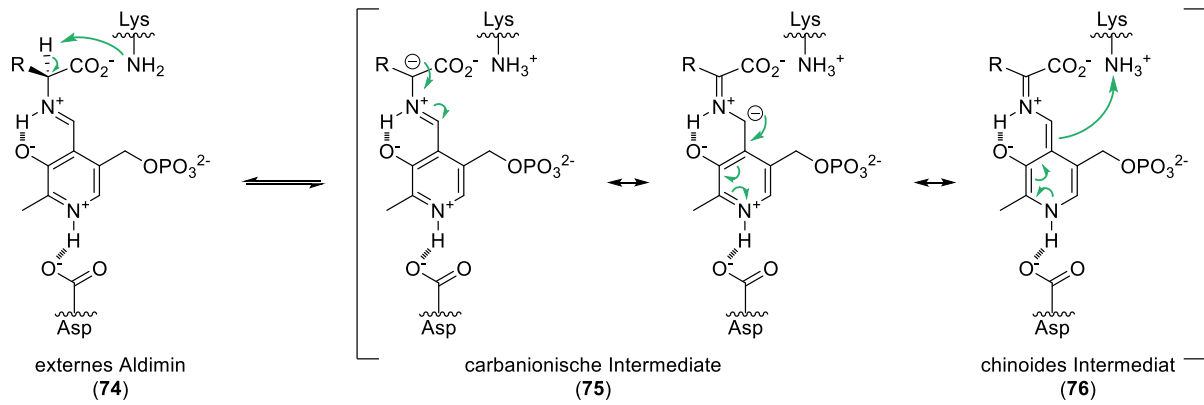
Schema 11. Die Transaminierung zwischen Aminosäuren (**71**) und Ketosäuren (**72**). Vereinfacht nach Lit.^[99]

Das klassische Beispiel einer Reaktion, die durch ein PLP-abhängiges Enzym katalysiert wird, ist die Transaminierung von Aminosäuren (Schema 11). Hier wird die Aminogruppe (blau) einer Aminosäure (Donor, **71a**) auf eine α -Ketosäure (Akzeptor, **72b**) übertragen.



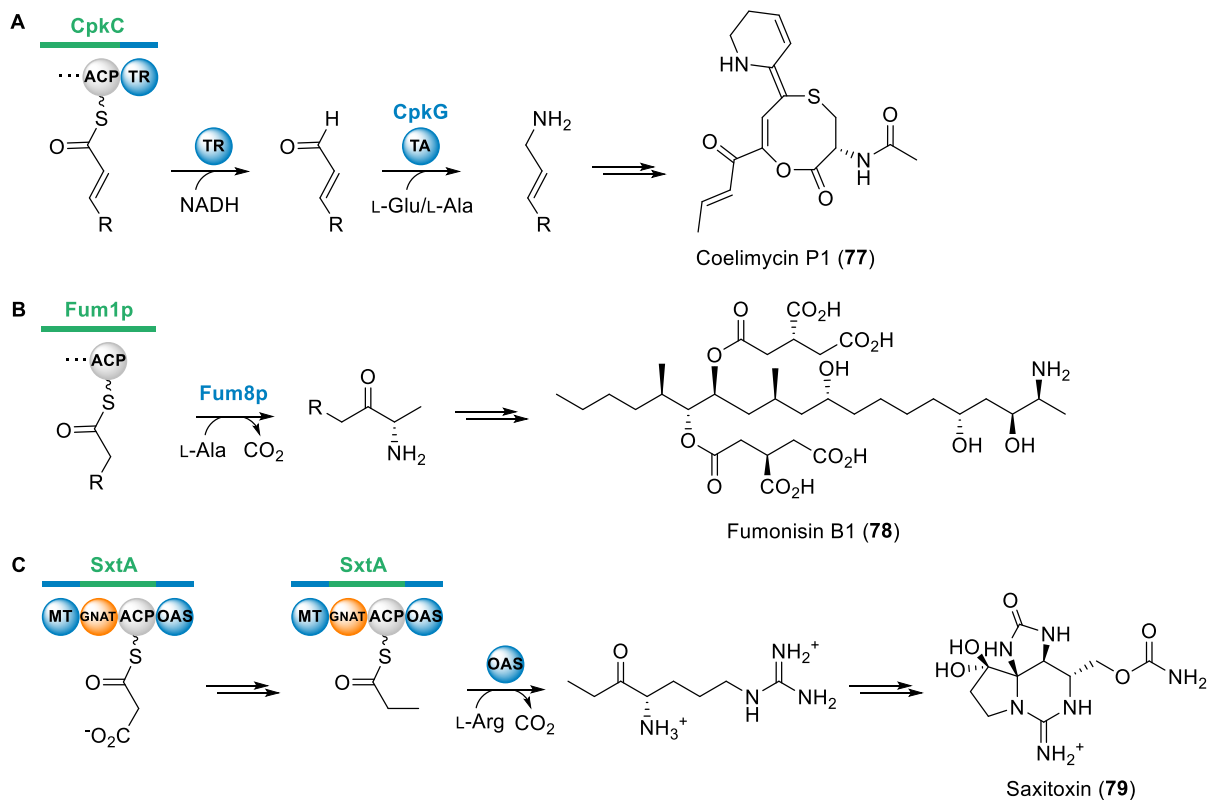
Schema 12. Halbreaktion der Transaminasen an Aminosäuren nach Lit.^[100]

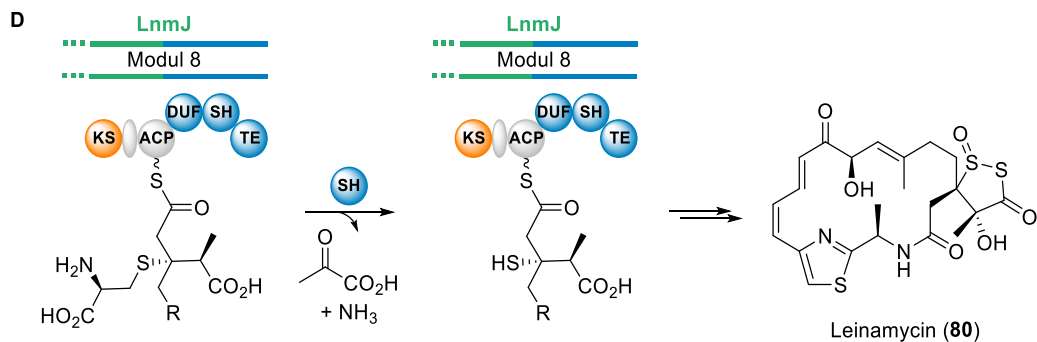
PLP (**69**) liegt dabei nicht als Aldehyd, sondern als internes Aldimin (**73**) über einen Lysinrest an das Enzym gebunden vorliegt (Schema 12). Dieser Lysinrest wirkt einerseits als Anker an den das PLP gebunden ist, andererseits im Laufe der Reaktion auch als Base. Beinahe sämtliche Enzyme, die das Cofaktorenpaar PLP-PMP nutzen, verfügen über diesen Lysinrest.^[93] In der Regel weisen Aminotransferasen mit artifiziiell ausgetauschtem Lysin im aktiven Zentrum signifikant niedrigere Aktivitäten auf.^[102–105] Es gibt aber auch seltene Fälle natürlich vorkommender Enzyme, in denen sich Histidin anstelle des Lysins im aktiven Zentrum findet. Dies betrifft bspw. solche die an der Biosynthese von Deoxyaminosackern beteiligt sind und die PMP (**70**) als Cofaktor nutzen.^[106]



Schema 13. Reaktionsschritte innerhalb der ersten Teilreaktion der Transaminierung nach Lit.^[100]

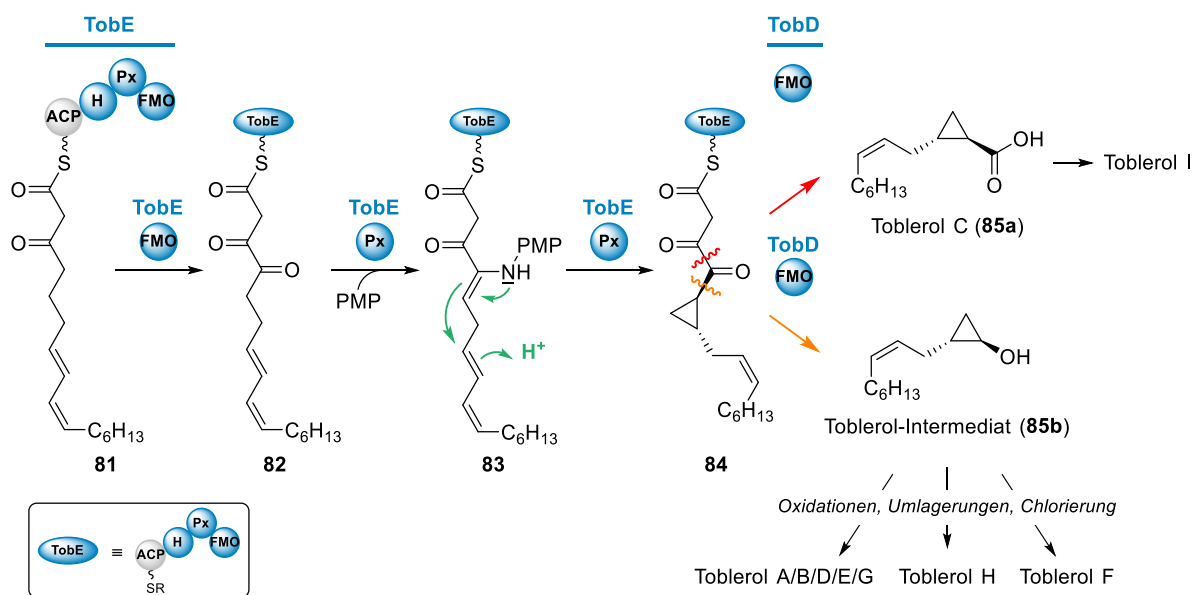
Ebenfalls stark konserviert sind saure Aminosäuren wie Asparaginsäure in der Nähe des Pyridinrings, die den Stickstoff des Heterozyklus protonieren.^[107] Dadurch ist der Cofaktor in der Lage die Energieniveaus von Elektronenüberschussverbindungen wie der Intermediate **75** und **76** stark zu erniedrigen (Schema 13). Man spricht daher von den *electron sink*-Eigenschaften des PLP(/PMP)-Cofaktors.^[100]





Schema 14. Beispiele für Reaktionen durch PLP-abhängige Enzyme bei der Biosynthese Polyketid-basierter Naturstoffe.^[99] **A)** Transaminierung des Aldehyds in der Biosynthese des Coelimycin P1 (**77**), TR = Thio-reductase, TA = Transaminase; **B)** Kettenabbruch durch Claisen-Kondensation mit L-Ala bei der Biosynthese von Fumonisin B1 (**78**); **C)** decarboxylative Claisen-Kondensation zwischen Arginin und der Polyketidkette bei der Biosynthese von Saxitoxin (**79**), MT = Methyltransferase, GNAT = Gcn5-verwandte Acyltransferase, OAS = α -Oxoaminsynthase; **D)** C-S-Bindungsspaltung durch β -Eliminierung während der Biosynthese von Leinamycin (**80**), DUF = *Domain of unknown function*, SH = Cysteinylase.

Während viele Reaktionen der PLP-abhängigen Enzyme im Rahmen des primären Stoffwechsels stattfinden, sind sie auch im Bereich der Biosynthese von Sekundärmetaboliten wie Polyketiden vertreten (Schema 14).^[99] Hier finden sich neben den relativ häufigen Transaminierungen (**A**, \rightarrow **77**) unter anderem decarboxylative Claisen-Kondensationen mit Aminosäuren (**B** und **C**, \rightarrow **78**, **79**) oder Eliminierungen um effizient einzelne funktionelle Gruppen einführen zu können, wie das Thiol im Laufe der Leinamycin (**80**)-Biosynthese, welches durch β -Eliminierung aus einem Cysteinrest erhalten wird (**D**). Die entsprechenden Proteine können dabei entweder als außenstehende *tailoring*-Enzyme fungieren (**A** und **B**) oder als Domänen in die *assembly line* integriert sein (**B** und **C**).



Schema 15. Hypothese zur Biosynthese der Toblerole (**85**) nach Piel *et al.*^[108]

Ein besonders interessantes Beispiel einer Px-Domäne im PKS-Kontext ist im Cluster der Toblerole (**85**) zu finden (Schema 15).^[108] Das Modul TobE ist ähnlich AmbF im Aufbau deutlich. In beiden Fällen findet sich das Muster ACP-H-Px. Es werden jeweils Cyclopropanringe aufgebaut und der – scheinbar – verwendete Cofaktor ist PMP. Auf Sequenzebene ist noch eine weitere Besonderheit zu bemerken, da beiden Px-Domänen das Lysin im aktiven Zentrum fehlt, was gegen PLP als Cofaktor spricht.^[108,109] Auch die Struktur der jeweiligen Intermediate deutet auf PMP hin, da keine Amin- aber eine Carbonylgruppe vorhanden ist.^[108] Pascarella *et al.* haben in ihrer bioinformatischen Studie zu PLP-abhängigen Enzymen in PKS/NRPS sowohl AmbF_Px (UniProt A1YBQ7), als auch TobE_Px (UniProt C5B3B9) untersucht und dabei einen relativ hohen Verwandtschaftsgrad festgestellt.^[109]

Die genaue Weise in der das Cyclopropan der Toblerole (**85**) gebildet wird ist zwar noch unbekannt, jedoch haben Piel *et al.* eine schlüssige These aufstellen können. Demnach wird das β-Ketosubstrat **81** in γ-Position durch die FMO aus TobE zum Diketon **82** oxidiert. An dieses bindet nun der Cofaktor PMP der Px-Domäne. Nach Tautomerisierung zum Enamin kommt es zum Ringschluss. Hydrolyse des Ketimins liefert das zentrale Intermediat **84**. Dieses wird im Anschluss durch die Monooxygenase TobD abgespalten, wobei je nach gespaltener Bindung entweder die Carbonsäure Toblerol C (**85a**) erhalten wird oder der Alkohol **85b**, der für die meisten anderen Toblerole als Zwischenstufe fungiert.^[108]

Auch wenn die Funktion der Px-Domäne in AmbF nicht klar ist, kann auch in Hinblick auf die Ergebnisse von Piel *et al.* davon ausgegangen werden, dass sie maßgeblich an der Bildung des Cyclopropan beteiligt ist. Aus diesem Grund wurde ihr im Rahmen dieser Doktorarbeit ein besonderes Maß an Aufmerksamkeit zuteil.

1.5 HYDROLASEN

Hydrolasen sind eine Enzymfamilie zu der eine Vielzahl wichtiger, strukturell ähnlicher Enzyme mit den unterschiedlichsten biosynthetischen Funktionen gehören. Die wahrscheinlich wichtigste Rolle erfüllen sie im Metabolismus bei der Hydrolyse von Energieträgern wie Triacylglyceriden oder Peptiden, aber auch bei der Regulierung chemischer Signalüberträger wie Acetylcholin.^[110] Ebenso wichtig sind Hydrolasen in Sekundärstoffwechselwegen wie der Polyketidbiosynthese. Hier sind sie beispielsweise als Thioesterasen, die am Ende der meisten PKS-Cluster die Kette hydrolytisch oder als (Makro-)Lacton abspalten, zu finden.^[111] Und auch für das *proofreading*, d.h. das hydrolytische Entfernen falscher Intermediate, sind Hydrolasen zuständig. So finden sich in manchen *trans*-AT-PKS Acyltransferasen denen die Transferaktivität fehlt, die dafür jedoch diese Funktion übernehmen. Hier sieht man die große Ähnlichkeit zu den Acyltransferasen und Hydrolasen.^[112–114]

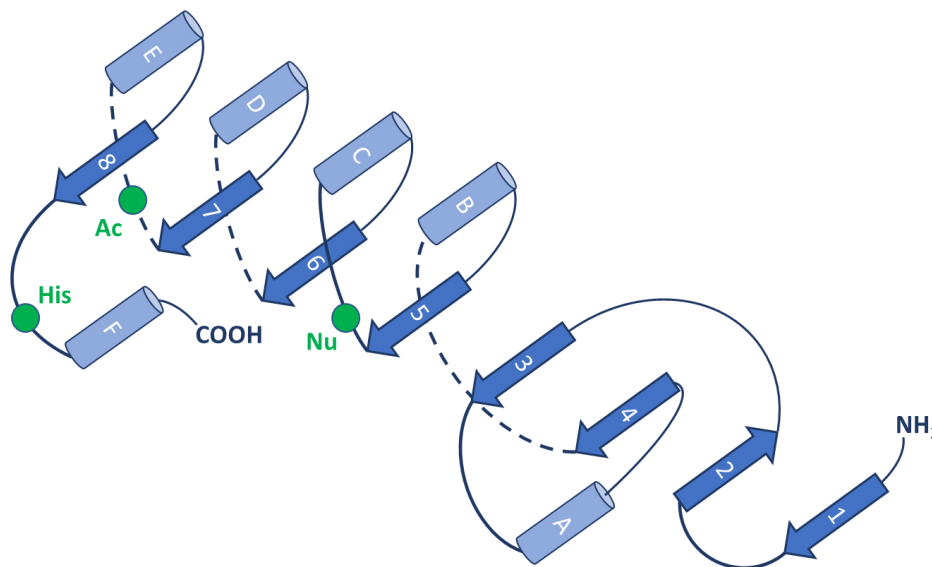


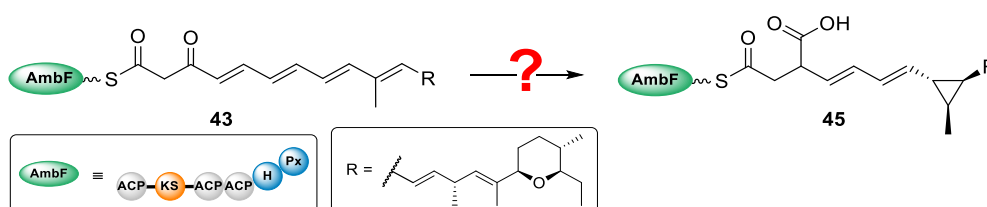
Abbildung 17. Strukturschema einer typischen α/β -Hydrolase. Innerhalb der gestrichelten Linien können noch weitere Strukturelemente eingebaut sein. Pfeile repräsentieren die Stränge des β -Faltblatts, Zylinder α -Helices und Linien ungeordnete

Bereiche bzw. Loops. Die katalytische Triade ist mit grünen Kreisen gekennzeichnet; His = Histidin, Ac = saure Aminosäure, Nu = nucleophile Aminosäure. Abbildung nach Lit.^[115]

Die meisten Hydrolasen gehören strukturell zu den α/β -Hydrolasen (Abbildung 17). Namensgebend ist dabei der α/β -Kern, der aus acht Strängen des zentralen Faltblatts mit sechs α -Helices besteht. Die Aminosäuren die die katalytische Triade (saure AS–Histidin–Nucleophil) bilden, finden sich jeweils zwischen einem Strang des Faltblatts und einer Helix. Eine Klassifizierung der Hydrolasen richtet sich nach dem vorhandenen Nucleophil wie Serin-, Cystein- oder seltener Aspartat-Hydrolasen.^[110,116] Neben zahlreichen struktureller Variationen der α/β -Hydrolasen wird ihnen auch eine hohen Anzahl katalysierter Reaktionen zugeordnet. So waren im Jahr 2009 bereits 46 Enzymfamilien bekannt, die hinsichtlich ihrer Strukturen und katalysierten Reaktionen unterscheiden.^[115] Entsprechend kryptisch ist auch die Zuordnung als α/β -Hydrolasedomäne in AmbF. Jedoch sollte die hohe Ähnlichkeit der Modulorganisation der Toblerole zu der in AmbF (vgl. Kapitel 1.4, Schema 15), in denen ebenfalls das Motiv H-Px im Rahmen der Cyclopropanbildung vorkommt, auch hier beachtet werden.^[108]

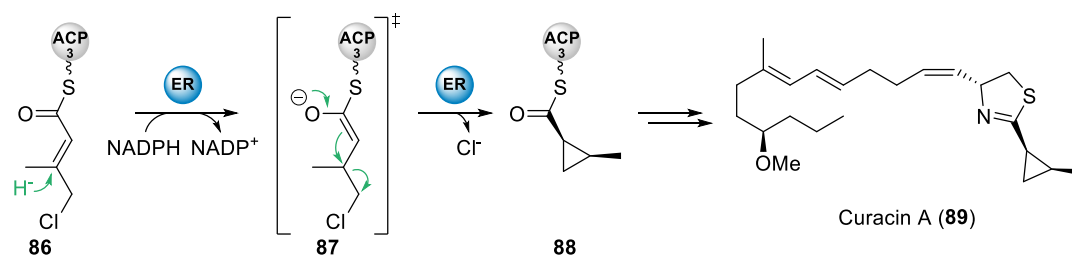
1.6 CYCLOPROPANIERUNGEN IN POLYKETIDBIOSYNTHESEN

Der Teil der Ambruticin-Biosynthese, der wohl die meisten Fragen aufwirft, ist die Bildung des Cyclopropan.



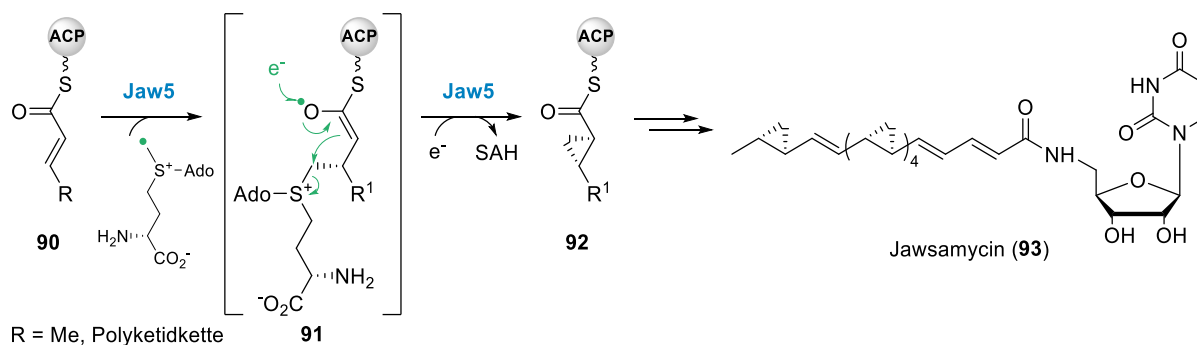
Schema 16. Hypothese zur Bildung des Cyclopropanrings nach Julien *et al.*^[31]

Julien *et al.* gehen in ihrer Hypothese von einer Favorskii-ähnlichen Umlagerung aus, bei der im ersten Teil der Cyclopropanring gebildet wird (vgl. Schema 9). Auch wenn einige wenige Cyclopropanpolyketide bekannt sind, findet sich kein übereinstimmender Mechanismus.



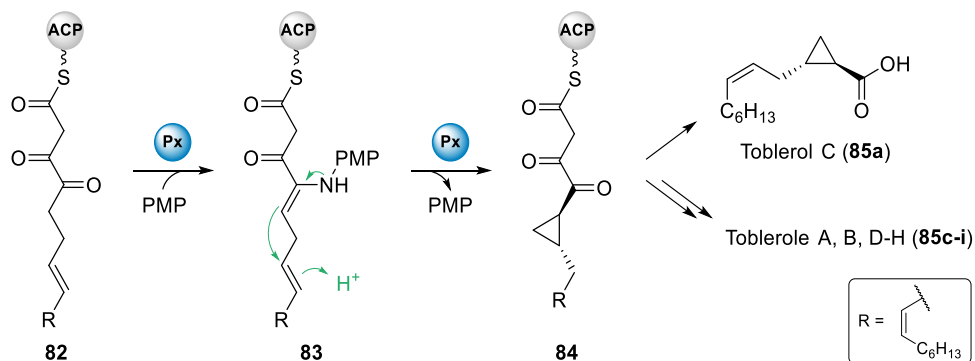
Schema 17. Bildung des Cyclopropanes in Curacin A (**89**).^[117]

Bei dem Polyketid Curacin A (**89**) erfolgt der Ringschluss an dem α,β -ungesättigten β -Chlorthioester **86** (Schema 17). Nach Reduktion durch die ER-ähnliche Cyclase mit NADPH wird zuerst das Enolat **87** gebildet, aus welchem in einer intramolekularen nucleophilen Substitution der Cyclopropylthioester **88** entsteht.^[117]



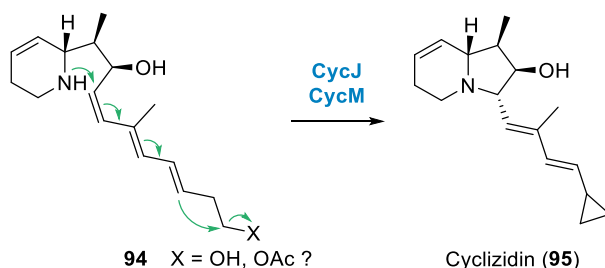
Schema 18. Bildung der Cyclopropanringe in dem fünffach cyclopropanierten Polyketid Jawsamycin (**93**).^[118]

Der Polyketid-Nucleotid-Hybrid Jawsamycin (**93**) trägt in der Polyketidkette fünf Cyclopropaneinheiten, deren Bildung von nur einem Enzym katalysiert wird (Schema 18). Hierbei wird die Kette jeweils zum α,β -ungesättigten Thioester **90** verlängert. An dieses addiert, katalysiert durch Jaw5, ein *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM)-Radikal, wodurch sich das Enoylradikal **91** bildet. Nach Reduktion durch ein Elektron greift das Enolat an der Methylengruppe aus SAM an, wodurch unter Eliminierung von *S*-Adenosyl-L-homocystein das Cyclopropan (\rightarrow **92**) gebildet wird.^[118]



Schema 19. Bildung des Cyclopropanes der Toblerole (**85**) durch die PMP-abhängige Px-Domäne.^[108]

Bei den Toblerolen (**85**) wird die Cyclopropanierung vermutlich durch die PMP-abhängige Px-Domäne katalysiert (Schema 19). Dabei wird zuerst das Enamin **83** des 2,3-Dioxothioesters **82** mit PMP gebildet. Ausgehend von **83** findet der Ringschluss zu **84** statt. Ob die angegriffene Doppelbindung dabei vorher protoniert wird oder erst im Zuge der Zyklisierung ist unklar und aus dem Schema von Piel *et al.* nicht ersichtlich. Ebenfalls nicht geklärt ist die Funktion der Hydrolasedomäne.^[108] Bemerkenswert ist die hohe Ähnlichkeit der beteiligten Domänen (FMO-H-Px, vgl. Kapitel 1.4, Schema 15) im Toblerol-Biosynthesecluster und denen aus AmbF.



Schema 20. Finaler Schritt der Biosynthese des polyketidischen Indolizinalkaloids Cyclizidin (**95**).^[119,120]

Ein weiteres, besonders interessantes Beispiel ist die Bildung des Cyclopropanrings im Cyclizidin (**95**, Schema 20). Obwohl es sich bei **95** um ein Indolizidinalkaloid handelt, ist es rein polyketidischen Ursprungs und vollständig aus Acetat- und Propionateinheiten aufgebaut.^[120,121] Die Cyclopropanierung im letzten Schritt der Biosynthese ähnelt mechanistisch der der Ambruticine (**1**). In beiden Fällen greift ein Nucleophil an der ersten Doppelbindung der Polyenkette an und in einer Elektronenshift-Zyklisierungskaskade wird das Cyclopropan gebildet. Im Intermediat **94** steht dabei als Nucleophil der Piperidinstickstoff zur Verfügung.

Statt eines Abfangs mit einem Proton, dient vermutlich eine Hydroxygruppe als Abgangsgruppe, so dass es sich insgesamt um eine intramolekulare nucleophile Substitution handelt.^[119,120]

Für die Cyclopropanierung im Zuge der Ambruticin-Biosynthese gibt es keine direkte Vergleichsreaktion bei den bekannten Cyclopropanpolyketiden. Die Mechanismen bei Curacin (**89**) und Jawsamycin (**93**) würden das Vorhandensein einer Halogenase, resp. eines SAM-abhängigen Enzyms erfordern, die beide nicht im Ambruticin-Cluster zu finden sind. Die Zyklisierungsmechanismen der Toblerole (**85**) und auch des Cyclizidins (**95**) zeigen Gemeinsamkeiten zu dem der Ambruticine (**1**). So sind im Toblerol-Cluster ebenfalls eine H- und eine Px-Domäne vorhanden, bei denen Piel *et al.* von einer maßgeblichen Beteiligung ausgehen.^[108] Bei Cyclizidin (**95**) findet die Zyklisierung zwar durch *tailoring*-Enzyme statt, dennoch ähnelt sie mechanistisch stark der bei den Ambruticinen (**1**).

1.7 SUBSTRATCHEMIE

Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, ist es für *in vitro*-Experimente wichtig die Eigenschaften von Substraten möglichst gut zu kennen. Bei PKS-Substraten bestimmt oft die Thioeinheit die Eigenschaften wie Polarität, Sensitivitäten, etc. Je größer die Thiolkomponente dabei ist, desto größer ist dessen Einfluss. Dies trifft insbesondere auf Substrate früher Stufen zu. Wird die Polyketidkette aber länger und nimmt an Komplexität zu, gewinnt auch der Acylteil zunehmend an Bedeutung.

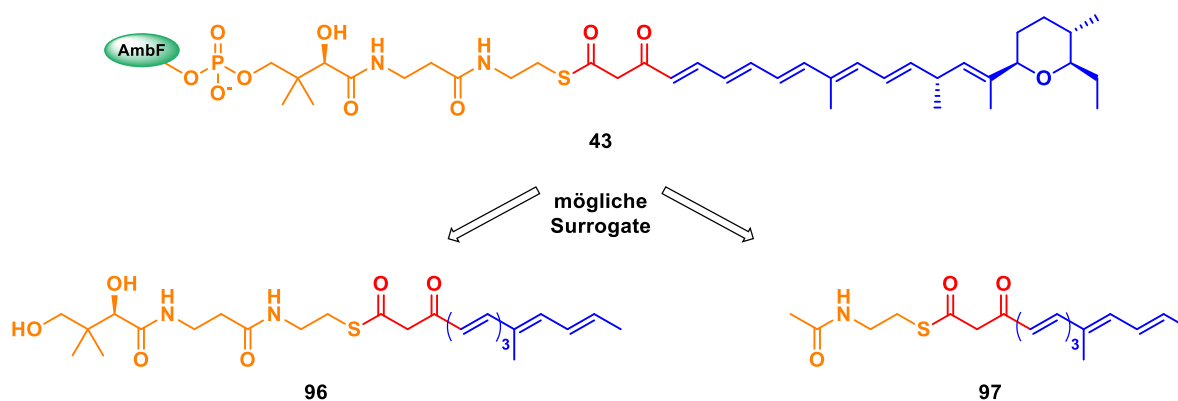
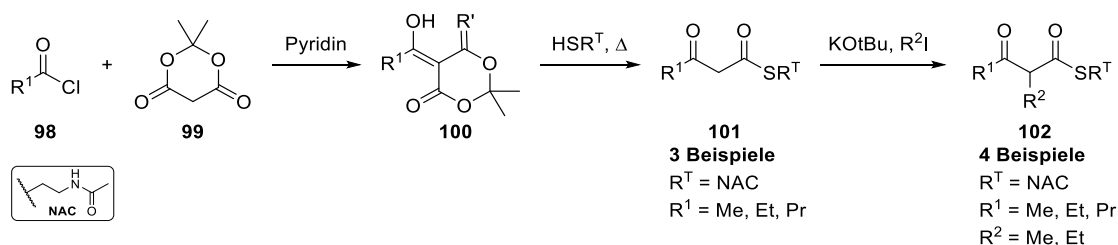


Abbildung 18. Das putative Substrat **43** der AmbF-Domänen H und Px und die beiden möglichen Surrogate **96** und **97**. Die Verbindungen enthalten einen polaren (orange, rot) und einen unpolaren (blau) Teil.

Das zentrale Intermediat in der Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments ist vermutlich der sechsfach ungesättigte β -Ketothioester **43** (Abbildung 18). Sinnvolle Surrogate, die die Funktionalitäten abbilden und möglichst gut durch die beteiligten Domänen umgesetzt werden sollten, sind die Verbindungen **96** und **97**.

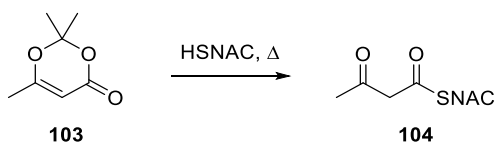
Für die Synthese von Alkylthioestern gibt es zahlreiche Syntheseverfahren. Viele basieren auf der Acylierung der Thiole durch Carbonsäuren und einem Aktivierungsreagenz wie DCC oder alternativ aktivierte Acylverbindungen wie Acylhalogeniden (**98**).^[71,122–124] Da β -Ketosäuren allerdings leicht decarboxylieren, lassen sich die Methoden nicht einfach übertragen.^[125] Für die Synthese solcher Ester gibt es in der Literatur zwei häufig verwendete Synthesen.



Schema 21. Synthese von β -Ketothioestern (**101** und **102**) durch die Ringöffnung acylierter Meldrumsäuren **100**.^[63]

Eine davon ist die Acylierung von Meldrumsäure (**99**, Schema 21). Die acylierte Verbindung **100** kann dann mit dem entsprechenden Thiol wie HSNAC (**26**) zum β -Ketothioester **101** geöffnet werden.

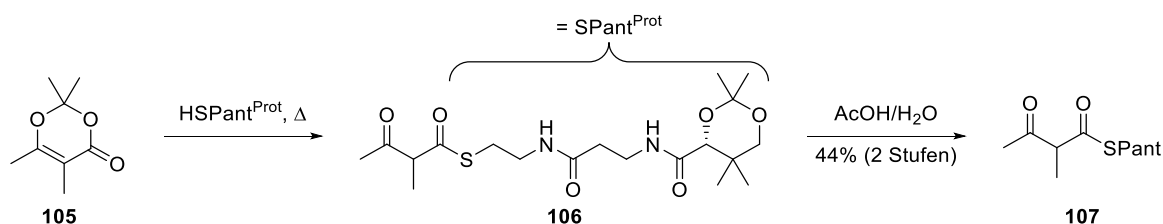
Da nur α -unsubstituierte β -Ketothioate (**101**) zugänglich sind, müssen diese ggf. alkyliert werden (\rightarrow **102**).^[63]



Schema 22. Synthese des SNAC-Thioesters **104** durch Ringöffnung von 2,2,6-Trimethyl-4H-1,3-dioxin-4-on (**103**).^[126]

Die andere Variante verwendet 4H-1,3-Dioxin-4-one (Schema 22). Am häufigsten wird sie für die Synthese der Acetoacetatthioate wie **104** verwendet, da 2,2,6-Trimethyl-4H-1,3-dioxin-4-

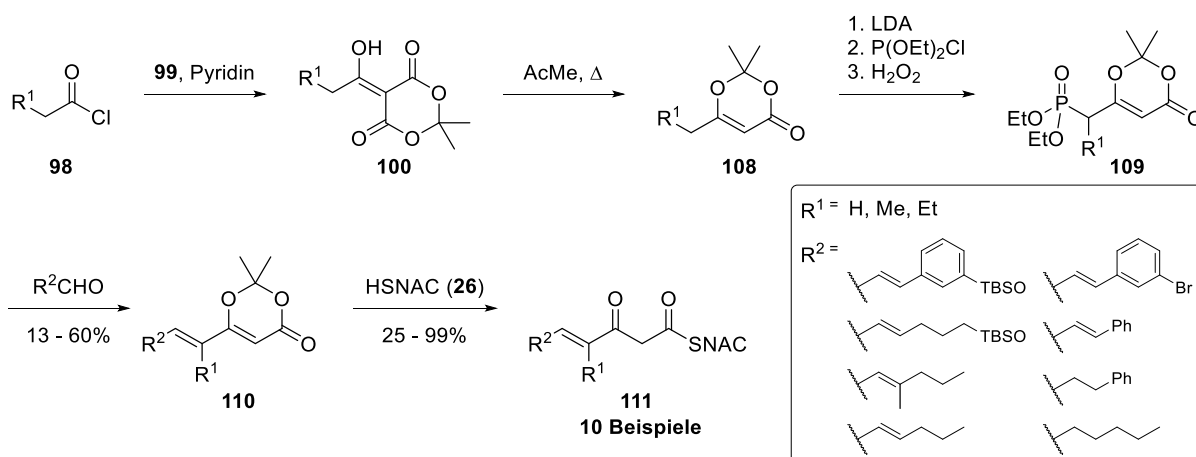
on (**103**) kommerziell verfügbar ist und in der Ringöffnung meist bessere Ausbeuten als Acetylmeldrumsäure (**100**, $R^1 = \text{Me}$) bietet.^[125,126]



Schema 23. Synthese des geschützten Pantetheinthioesters **106** und Entschützung zu **107**.^[71]

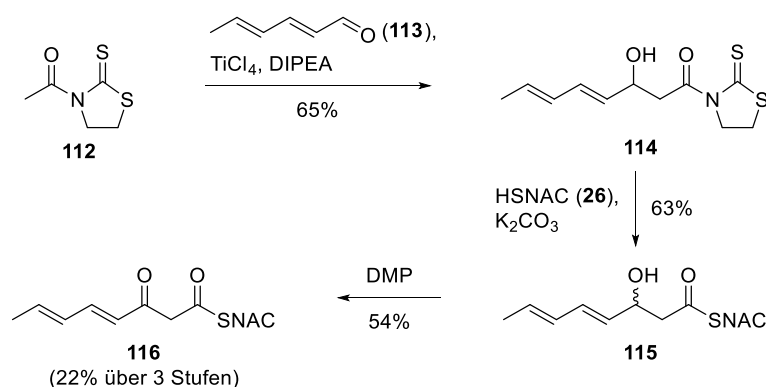
Mit dieser Methode ist auch die direkte Synthese α -alkylierter Thioate **106** möglich (Schema 23).^[71] Da Pantethein (**21**) über zwei Hydroxygruppen verfügt, müssen diese geschützt vorliegen, um eine chemoselektive Ringöffnung durchführen zu können.

Bei den Verbindungen **96** bzw. **97** nimmt die Polyenkette eine besondere Stellung ein, da sie Sensitivitäten und damit Herausforderungen bei der Synthetisierbarkeit, aber auch die Analyse-möglichkeiten maßgeblich bestimmt. So sind Polyene oft sehr empfindlich gegenüber Licht, Hitze und Säuren oder Basen.^[34,127] Die Empfindlichkeit steigt dabei einerseits mit dem Vorhandensein *cis*-konfigurierter Doppelbindungen, andererseits mit zunehmender Anzahl an Doppelbindungen.^[128]



Schema 24. Synthese (mehrfach) ungesättigter β -Ketothioester **111** durch Verwendung der Horner-Wadsworth-Emmons-Olefinierung mit Phosphonaten des Typs **109** und nachfolgender Ringöffnung mit HSNAC (**26**) nach Müller *et al.*^[129]

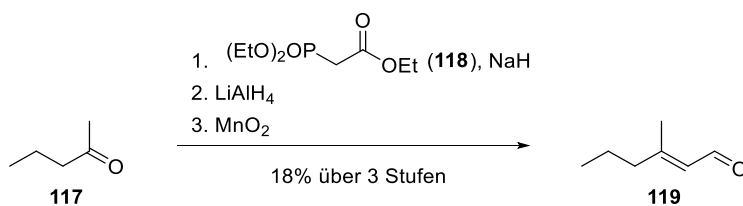
Eine elegante Methode für die Synthese komplexer ungesättigter biosynthetischer Vorläufer verwendeten Müller *et al.* für ihre Mutasyntesestudien zum Antibiotikum Myxopyronin (Schema 24). Indem sie die Umlagerung der acylierten Meldrumsäuren **100** zu den entsprechenden 2,2-Dimethyl-4-alkyl-4*H*-1,3-dioxin-4-onen **108** mit anschließender Phosphonylierung nutzten, konnten sie die Phosphonate **109** synthetisieren. In der nachfolgenden Horner-Wadsworth-Emmons-Olefinierung wurden die Alkylidendioxinone **110** erhalten. Diese konnten mit HSNAC (**26**) mit teils sehr guten Ausbeuten zu den einfach, bzw. zweifach ungesättigten β -Ketothioaten **111** umgesetzt werden.^[129]



Schema 25. Synthese des β -Ketothioesters **116** durch Aldoladdition, Thiolyse und Oxidation nach Tang *et al.*^[130]

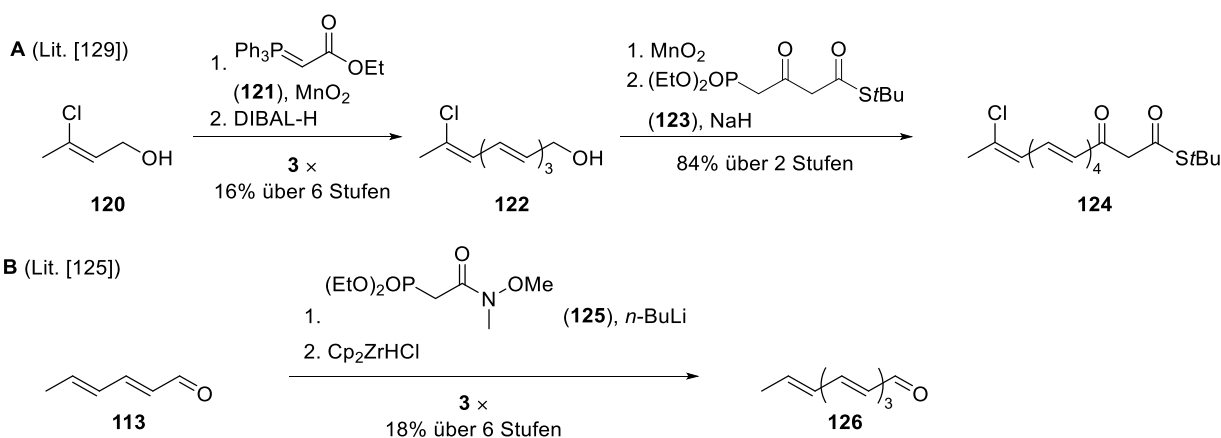
Eine weitere Methode für die Synthese des mehrfach ungesättigten β -Ketothioesters **116** verwendeten Tang *et al.* (Schema 25). Hierbei wurde die Kette mittels Aldoladdition an **112** eingeführt. Nach Thiolyse mit HSNAC (**26**) wurde der β -Hydrothioester **115** mit DMP zu **116** oxidiert.^[130]

Für die Synthesen der für die Kette benötigten polyolefinischen Aldehyde gibt es ebenfalls mehrere Methoden, die sich insbesondere in der Anzahl der benötigten Schritte unterscheiden. Die Bindungsbildung findet dabei meist über Olefinierungsreaktionen nach Wittig oder Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) statt.



Schema 26. Dreistufige Synthese des Aldehyds **119** durch HWE-Olefinierung, Reduktion und Oxidation nach Müller *et al.*^[129]

Müller *et al.* nutzten für die Synthese des Aldehyds **119** eine dreistufige Synthese bestehend aus einer HWE-Reaktion an Pentan-2-on (**117**), Reduktion des entstehenden Esters mittels LiAlH_4 und die milde Oxidation des Allylalkohols mit Braunstein (Schema 26).^[129]

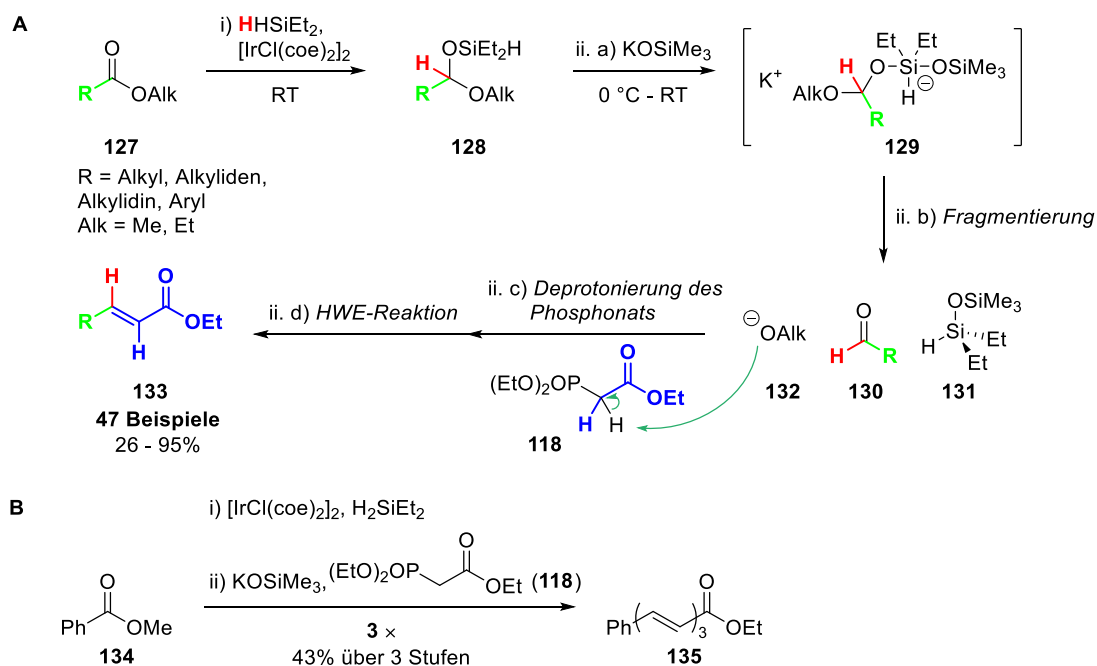


Schema 27. Polyolefinsynthesen durch iterative Reaktionen. **A)** Synthese des Allylalkohols **122** durch eine repetitive oxidative Wittig-Reaktion-Reduktions-Sequenz, anschließender Oxidation und Horner-Wadsworth-Emmons-Reaktion mit dem Phosphonat **123** zum β -Keto thioester **124** nach Schobert *et al.*^[131]; **B)** Synthese des Aldehyds **126** durch iterative HWE-Reaktion mit dem Phosphonat **125** und Reduktion mit Schwartz' Reagenz nach Dussault *et al.*^[127]

Mit zwei Schritten pro eingeführte Doppelbindung kommt die Strategie aus der Totalsynthese der Tetransäure Aurantonsid G von Schobert *et al.* aus, die für den β -Keto thioesters **124** verwendet wurde (Schema 27, **A**). Sie nutzten dafür die oxidative Wittig-Reaktion mit dem Phosphorylid **121** und MnO_2 am Allylalkohol **120**, ermöglicht durch die Inertheit des Ylids gegenüber dem Braunstein und ähnlicher Reaktionsbedingungen von Oxidation und Olefinierung. Durch dreifache Wiederholung konnte der Allylalkohol **122** in 16% Ausbeute über 6 Stufen erhalten werden. Da der jeweilige Aldehyd nur intermediär auftritt, konnten Ausbeuteverluste durch die sonst nötige Aufarbeitung und Nebenreaktionen vermieden werden. Nach einer letzten, separaten Oxidation mit Braunstein wurde der entsprechende Aldehyd erzeugt, welcher dann in einer HWE-Reaktion mit dem β -Keto thiophosphonat **123** umgesetzt

wurde. Sie konnten auf diese Weise den fünffach ungesättigten β -Ketothioester **124** in 13% über 8 Stufen darstellen.^[131]

Ebenfalls zwei Stufen je eingeführte Doppelbindung benötigten Dussault *et al.* bei der Synthese von Decatetraenal (**126**, Schema 27, **B**). Hier wurde das Weinrebamid der Diethylphosphonoessigsäure (**125**) in einer HWE-Reaktion genutzt, was nach Reduktion mit Cp_2ZrHCl formal zur Verlängerung des Aldehyds um eine Doppelbindung führte. Durch dreifache Wiederholung konnten sie so **126** in einer Ausbeute von 18% erhalten.^[127]



Schema 28. Reduktive HWE-Homologisierung nach Jeon *et al.* **A**) Allgemeiner Mechanismus der Reaktionskaskade; **B**) iterative Anwendung der rHWE-Reaktion zur Synthese von Ethylphenylheptatrienoat (**135**).^[132]

Eine sehr effektive Synthese ungesättigter Ester wurde 2015 von Jeon *et al.* vorgestellt (Schema 28, **A**).^[132] Es handelt sich dabei um eine zweistufige Iridium-katalysierte reduktive HWE-Homologisierung, die in einer Ein-Topf-Reaktion durchgeführt werden kann. Im ersten Schritt erfolgt durch Katalyse mit 0.1 Mol-% $[\text{IrCl}(\text{coe})_2]_2$ und Diethylsilan eine Hydrosilylierung der C-O-Doppelbindung des umzusetzenden Esters **127**. Im zweiten Schritt werden dann Kaliumtrimethylsilylanolat als Lewis-Base und das Phosphonat **118** zugegeben. Die Base addiert an das Silylatom des gemischten Silylacetals **128** unter Oktetaufweitung zum Anion **129**. Dieses fragmentiert spontan zum Aldehyd **130**, dem Disiloxan **131** und dem Alkoholat **132**.

Das Alkoholat deprotoniert anschließend das Phosphonat **118**, wodurch dieses in einer HWE-Olefinierung mit dem Aldehyd **130** reagiert. Dadurch wird der α,β -ungesättigte Ester **133** erhalten, was formal einer Verlängerung des Esters **127** um eine Doppelbindung entspricht. An 47 Beispielen konnten Jeon *et al.* die Anwendbarkeit bestätigen, wobei die Produkte mit akzeptablen bis sehr guten Ausbeuten und exzellenten *E/Z*-Verhältnissen von in der Regel > 20:1 erhalten wurden.^[132]

Die Reaktionskaskade ist für die Synthese von Polyenen deshalb besonders interessant, da der Ester **133** für weitere rHWE-Reaktionen zur Verfügung steht und so durch eine iterative Anwendung mit wenigen Schritten mehrfach ungesättigte Ester dargestellt werden können. Die Gruppe um Jeon konnte (*all-E*)-Ethylphenylhepta-2,4,6-trienoat (**135**) so in nur drei Schritten ausgehend von Methylbenzoat (**134**) in 46% Ausbeute ohne signifikant im NMR erkennbaren Anteil an *Z*-Isomeren erhalten werden (Schema 28, **B**).

Neben den Problemen, die die Polyenkette mit sich bringt, ermöglicht sie auf der anderen Seite die Analyse durch UV/vis-Spektroskopie/-metrie. So werden lediglich drei unsubstituierte Doppelbindungen benötigt um ein Absorptionsmaximum zu erhalten, das mit ca. 255 nm über denen der meisten gängigen Lösungsmittel für Flüssigchromatographie oder UV/vis-Spektroskopie liegt.^[133,134]

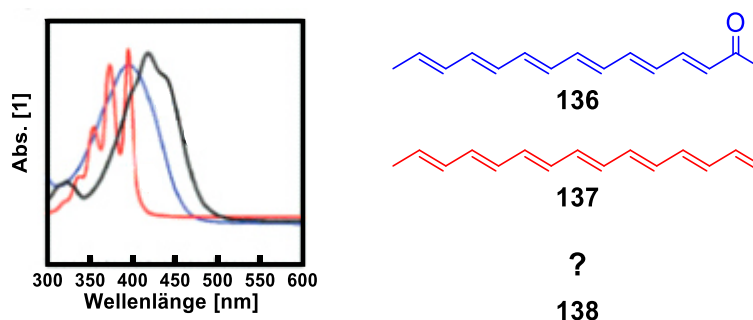


Abbildung 19. UV/vis-Spektren der Hauptprodukte von CalE8 **136** (blau) und DynE8 **137** (rot), sowie einem Nebenprodukt unbekannter Struktur **138** (schwarz). Beachtenswert sind die Verschiebungen der Absorptionsmaxima von **136** und **137** und der Verlust der Feinstruktur bei **136** durch Konjugation der Doppelbindungen zum Polyensystem. Abbildung abgewandelt nach Lit.^[135]

Durch Analyse des Absorptionsmaximums kann auch festgestellt werden, ob die Doppelbindungen in Konjugation zu einer funktionellen Gruppe wie einem Keton stehen. So tritt bei

Vorhandensein einerseits eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums hin zu längeren Wellenlängen auf. Andererseits kommt es bei Konjugation zu einer Carbonylgruppe zum Verlust der Feinstruktur, das heißt die scharfen Absorptionsmaxima der Doppelbindungen gehen verloren und ein breites, einzelnes Signal wird erhalten (Abbildung 19).^[135,136]

2 ZIELSETZUNG

Die Ambruticine (**1**) sind stark antimykotische Polyketide, die aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* So ce10 isoliert wurden.^[30]

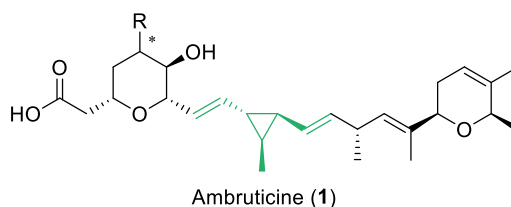
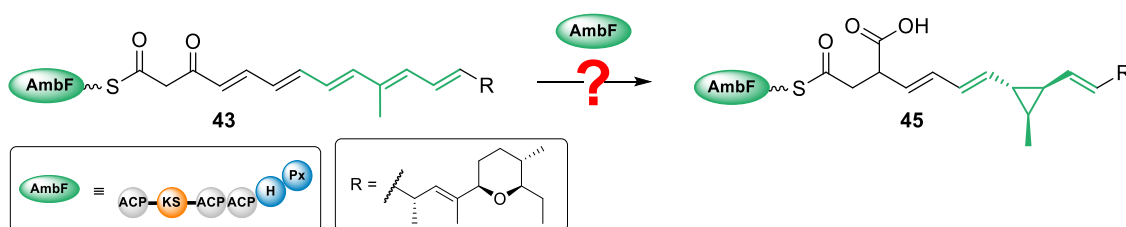


Abbildung 20. Zentrale Thematik dieser Arbeit, die Ambruticine (**1**) und die ungewöhnlichen Mechanismen mit denen das Mittelfragment (grün) gebildet wird.^[30] R = u.a. OH, NH₂, NHMe, NMe₂

Ambruticine (**1**) sind strukturell sehr komplex aufgebaut und besitzen unter anderem ein ungewöhnliches Divinylcyclopropyl (DVC)-Mittelfragment (Abbildung 20, grün).^[29] Obwohl sie von einer multimodularen Typ I-Polyketidsynthese produziert werden, die normalerweise der stringenten Logik der Celmer-Regeln folgen sollte, enthält der Mechanismus doch einige nicht-kanonische Abschnitte.^[31,84,85,137]



Schema 29. Bisher liegen die Mechanismen mit denen das DVC-Fragment gebildet wird im Unklaren.

Insbesondere die Bildungsmechanismen des Ambruticin-Mittelfragments, die im Fokus dieser Arbeit stehen, wurden bislang nur unzureichend aufgeklärt. Maßgeblich beteiligt ist das Modul 8 der Ambruticin-PKS, AmbF (Schema 29).^[31] Dieses ungewöhnliche Modul enthält keine Acyltransferase- (AT), dafür aber drei Acylträgerproteine (ACP), eine Ketosynthase- (KS) und zwei kryptische Domänen. Basierend auf Aminosäuresequenzhomologien wird eine davon den Hydrolasen (H) zugeordnet, die andere scheint eine PMP-abhängige Domäne zu sein (Px). Es wird angenommen, dass diese beiden Domänen eine tragende Rolle bei der komplexen

Zyklisierung zum DVC und der Umlagerung an der β -Position einnehmen.^[31] Ein möglicherweise verwandter Mechanismus ist zum Zeitpunkt dieser Arbeit nur bei einem weiteren Naturstoff entdeckt und diskutiert, aber noch nicht näher untersucht worden.^[108]

Bisher ist die Funktion der H- und Px-Domäne aus dem Ambruticin-Cluster in der Literatur nur theoretisch behandelt worden. Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten den Mechanismus der Cyclopropanierung experimentell zu bestimmen. Dies liefert ein tieferes Verständnis für die Bildung der Ambruticine, könnte aber auch als Ausgangspunkt für die Verwendung der beteiligten Enzyme in der Biokatalyse dienen.

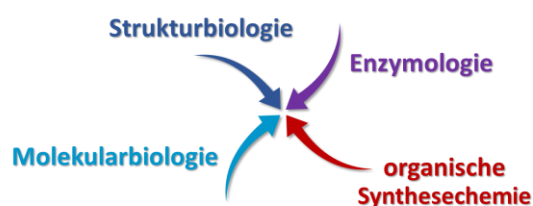


Abbildung 21. Die verwendeten Methoden im Rahmen dieser Arbeit.

Um ein möglichst vollständiges Bild zu erhalten, wurde in dieser Arbeit ein interdisziplinärer Ansatz verfolgt (Abbildung 21). Mithilfe bioinformatischer Methoden sollten die Sequenzen der einzelnen Domänen bestimmt werden. Die zugehörigen Proteine sollten rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt werden, um sie enzymologisch untersuchen zu können und bestenfalls erste strukturelle Zusatzinformationen zu erhalten.

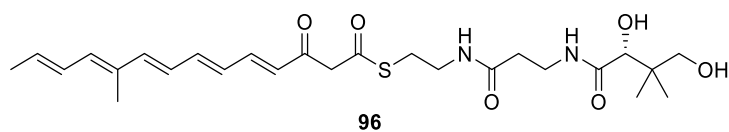
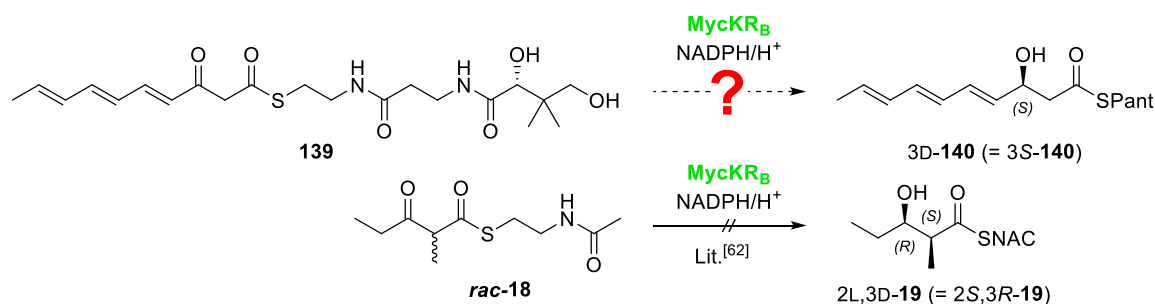


Abbildung 22. Das hoch realistische Substratsurrogat **96** für *in vitro*-Tests mit den einzelnen Domänen.

Um experimentell belegte Ergebnisse zu erhalten, war es wichtig realistische Substrate wie das Pentaen **96** zu verwenden, die aussagekräftige Schlussfolgerungen erlauben (Abbildung 22). Aus diesem Grund sollte eine entsprechende Synthesestrategie für mehrfach ungesättigte β -Ketothioester entwickelt und umgesetzt werden. Diese sollte flexibel, selektiv und praktikabel sein. Dabei sollten die Produkte in einer hohen Reinheit vorliegen, um Fehler durch potenziell störende Verunreinigungen ausschließen zu können.

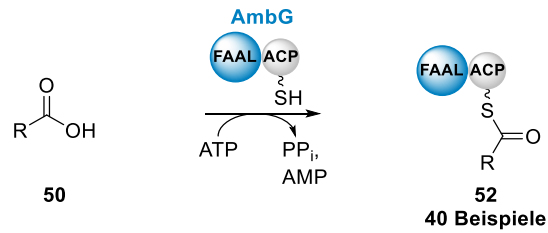
Das Ziel war es dann in *in vitro*-Tests die Umsetzung des Substrats **96** mit den entsprechenden Domänen verfolgen und die Produkte analysieren zu können. Die wichtigsten Analysemethoden sollten dabei Photospektroskopie, UPLC-MS und NMR-Spektroskopie sein.

Durch die Kombination und den Abgleich der Ergebnisse aus den *in vitro*-Experimenten mit strukturellen Erkenntnissen, könnte so eine wesentlich fundiertere Aussage über den Mechanismus getroffen werden.



Schema 30. Untersuchung der Substratselektivität hoch-realistischer Substrate am Beispiel MycKR_B.^[62]

Ferner sollte die Relevanz der Verwendung realistischer Substratsurrogate am Beispiel der Ketoreduktase MycKR_B gezeigt werden (Schema 30). Dafür sollte mit der für das Substratsurrogat **96** evaluierten Syntheseroute ein Polyenthioester **139** hergestellt und durch mit MycKR_B reduziert werden. Die Ketoreduktase MycKR_B wurde von Weissman *et al.* bereits ausgiebig mit einfacheren Substratsurrogaten untersucht. Beispielsweise wurde jedoch bei der Umsetzung des Diketids **rac-18** das erwartete 2L,3D-Produkt **19** nicht erhalten. Es blieb jedoch unklar, woran die fehlende Stereoselektivität lag, ob an den Versuchsbedingungen oder den verwendeten, sehr einfach gehaltenen Substratsurrogate.^[62] Da selten komplexere Polyketid-surrogate in enzymologischen Versuchen eingesetzt werden, sollte diese Lücke durch die Verwendung der langkettigen Thioester wie **139** geschlossen werden. So sollten dann Informationen darüber gewonnen werden, ob - wie postuliert - hauptsächlich die Umgebung der Ketoreduktase, oder die Struktur des Substrats für eine selektive Reaktion maßgeblich von Bedeutung ist.



Schema 31. Aktivierung und Thiolierung von Carbonsäuren **50** durch die FAAL-ACP-Didomäne AmbG.^[85]

Darüber hinaus sollten für die Untersuchung der FAAL-ACP-Didomäne AmbG geeignete Carbonsäuresubstrate synthetisiert werden. AmbG scheint maßgeblich an der Installation der sekundären Hydroxygruppe an C-5 beteiligt zu sein, indem es die oxidative Decarboxylierung der Carbonsäure in Form ihres Thioesters ermöglicht.^[85]

3 EIGENE ERGEBNISSE

3.1 SYNTHESE MEHRFACH UNGESÄTTIGTER SUBSTRATE

Das primäre Ziel der chemischen Arbeiten war die Synthese eines geeigneten Substrats für die enzymologische Charakterisierung der AmbF-Domänen.

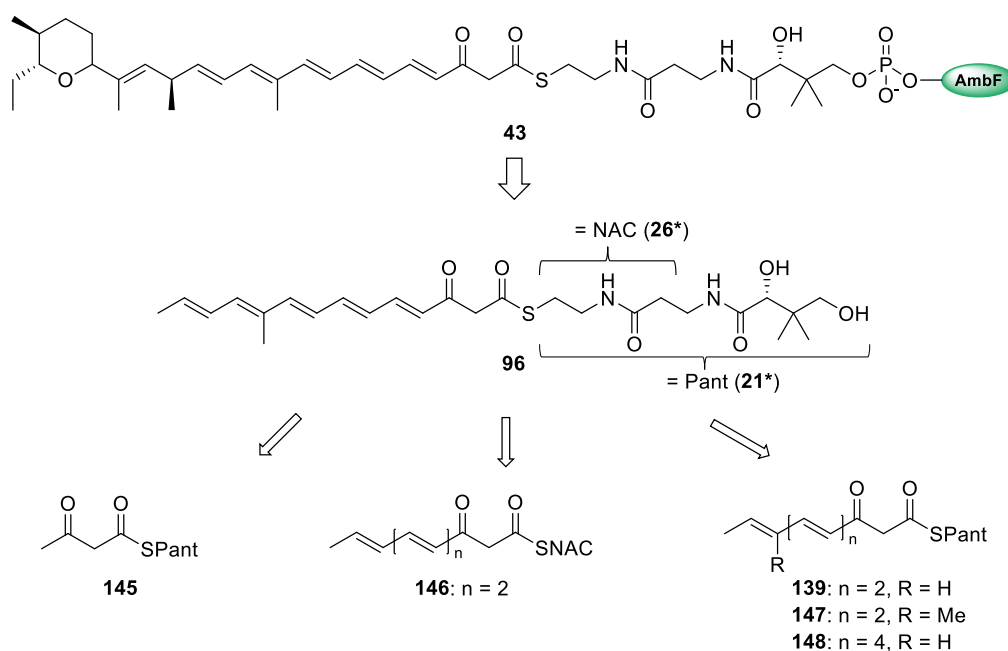
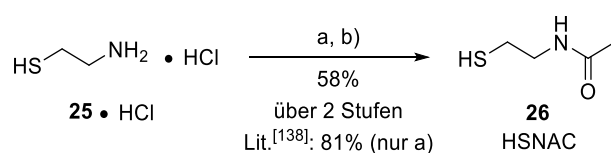


Abbildung 23. Die vom postulierten natürlichem Substrat **43** abgeleiteten Surrogate, die in dieser Arbeit synthetisiert wurden. Das Substratsurrogat **96** stand aufgrund seiner hohen Ähnlichkeit zu **43** im Zentrum der Bemühungen.

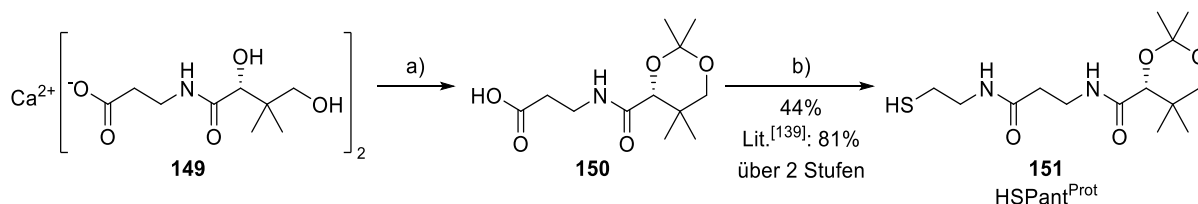
Das Substratsurrogat **96** sollte **43** möglichst gut abbilden, dabei leicht zugänglich und aus Gründen der Analysierbarkeit niedermolekular sein. Dafür wurden kurz- und langkettige, verzweigte und unverzweigte β -Ketothioester mit HSNAC (**26**) oder D-Pantethein (**21**) als eingesetzte Thiolkomponente synthetisiert (Abbildung 23). Entsprechend wurde eine flexible und dabei selektive Methode benötigt, um in einer angemessenen Zeitspanne eine größere Anzahl Substrate mit möglichst hoher Reinheit herzustellen. Bei der Synthese war darüber hinaus auf die Empfindlichkeit der involvierten Verbindungen zu achten. Besonders die konjugierten Polyenkette sind u. a. säure- und lichtempfindlich und Nucleophile können durch (intermediäre) Michael-artige Reaktionen damit Nebenreaktionen eingehen.^[127,135]

Um die Löslichkeit der Thioester und die Substratakzeptanz zu steigern sowie wegen der Möglichkeit ACPs damit zu beladen, wurde Pantethein (**21**) als Thiolkomponente verwendet (vgl. Kapitel 1.2.2). *N*-Acetylcysteamin (**26**) wurde hingegen genutzt um ein einfacher handhabbares Substratsurrogat, ohne der Notwendigkeit einer Entschützung am Ende der Synthese, zu erhalten. Die Synthesen der Triene **139**, **146** und **147** dienten der Evaluierung der verwendeten Routen, andererseits sollten die Produkte als vereinfachte Substrate für die Enzymaktivitätstests der AmbF-Domänen, aber auch in den Studien mit MycKR_B angewandt werden. Schließlich wurden die Pentaene **148** und **96** synthetisiert. Insbesondere **96** stellte das realistischste Substrat für die enzymologischen Tests dar.



Schema 32. Synthese von Disulfid-freiem HSNAC in Anlehnung an Lit.^[138]

Reagenzien und Bedingungen: a) Ac₂O, KOH, RT, 1 h; b) NaBH₄, MeOH/H₂O 2:1, 60 °C, 30 min.



Schema 33. Synthese Disulfid-freien *D*-Isopropylidenpantethein nach Lit.^[139]

Reagenzien und Bedingungen: a) *p*TsOH, MS 3Å, AcMe, RT, 1 d; b) CDI, THF, 1.5 h, dann **25** · HCl, RT, 20 h.

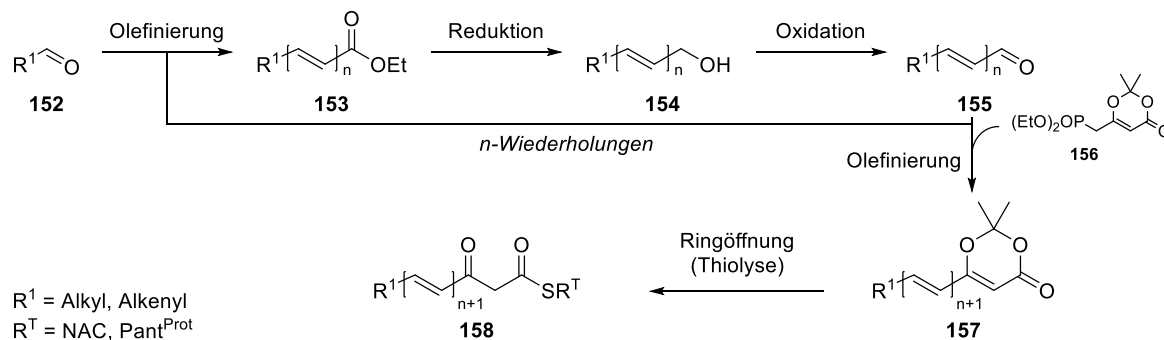
Die Synthesen der Thiole *N*-Acetylcysteamin (**26**, Schema 32) und *D*-Isopropylidenpantethein (= HSPant^{Prot}, **151**, Schema 33) wurden nach Literaturvorschriften durchgeführt.^[138,139] Die Acetonid-Schutzgruppe in **151** wurde eingeführt um chemoselektive Kupplungsreaktionen, ohne Konkurrenzreaktionen des primären Alkohols zum Thiol, zu ermöglichen.

Es wurde bei beiden Synthesen ein besonderes Augenmerk darauf gelegt reine, Disulfid-freie Produkte herzustellen, da diese sonst bei vielen Reaktionen und Reinigungen gestört hätten. Da die Reaktionen aber im großen Maßstab und mit kostengünstigen Ausgangsstoffen durchgeführt wurden, wurden schlechten Ausbeute in Kauf genommen wurde. Es war nicht praktikabel die Thiole durch Säulenchromatographie zu reinigen. Darum wurde vorhandenes Disulfid entweder noch nachträglich mit NaBH₄ in das Produkt überführt (**26**) oder das Produkt

durch Kristallisation gereinigt (**151**, *n*-Hexan/ EtOAc). Darüber hinaus wurde stets unter N₂-Atmosphäre gearbeitet.

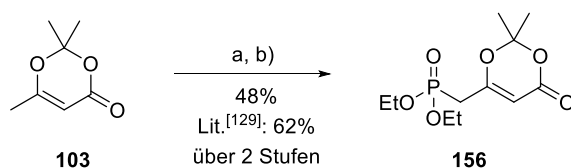
3.1.1 AUFBAU DER POLYEN-β-KETOTHIOESTER

Route I - Dreistufige Verlängerung und Ringöffnung



Schema 34. Route I zur Synthese von Substratsurrogaten **158** in Anlehnung an Lit.^[71]

Der erste Ansatz für die Synthese mehrfach ungesättigten β-Ketothioester **158** beruhte auf der Strategie von Agarwal *et al.* (Schema 34).^[71] Es wurde eine dreistufige Verlängerung der Polyenkette durchgeführt. Diese bestand aus einer Olefinierung nach Horner-Wadsworth-Emmons oder Wittig sowie Reduktion mit DIBAL-H und MnO₂-Oxidation und wurde wiederholt, bis ein Aldehyd **155** der gewünschten Kettenlänge erreicht war. Dieser wurde in einer HWE-Reaktion mit dem Phosphonat **156** zum Dioxinon **157** umgesetzt. Durch Thiolyse wurde daraus das Produkt **158** erhalten.

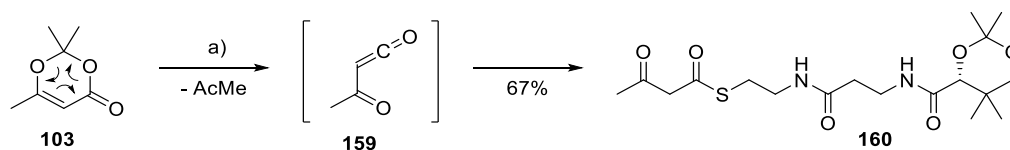


Schema 35. Synthese des Phosphonats **156** nach Lit.^[129]

Reagenzien und Bedingungen: a) LDA, THF, -78 °C, 45 min, dann ClP(OEt)₂, RT, 30 min; b) H₂O₂, DCM, RT, 1 h.

Das Dioxinonphosphonat **156** wurde nach einer Literaturvorschrift hergestellt.^[129] Dafür wurde frisch destilliertes 2,2,6-Trimethyldioxinon (**103**) mit LDA und dann Diethylchlorphosphit zum entsprechenden Phosphinat umgesetzt, welches mit H₂O₂ zum Phosphonat **156** oxidiert wurde.

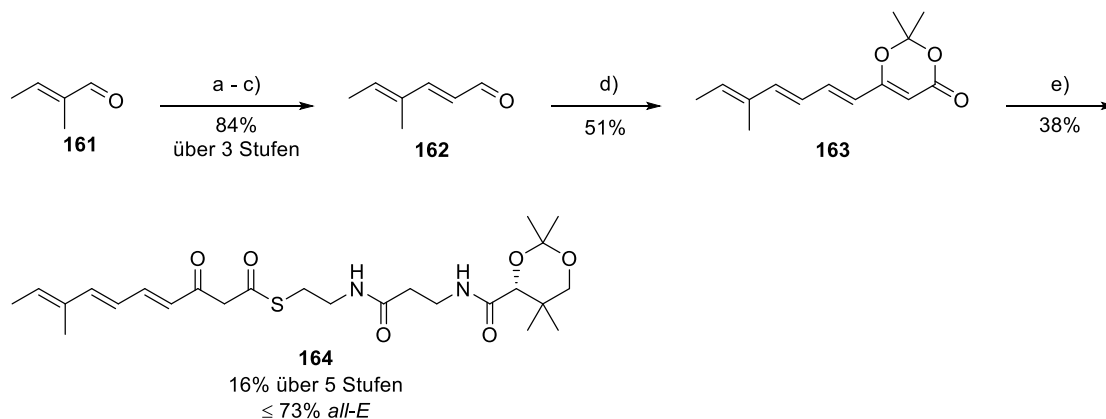
Die Ausbeute lag nach Säulenchromatographie bei 48%, wobei bei mehreren Ansätzen größere, kaum weiter trennbare Mischfraktionen entstanden.



Schema 36. Thiolyse von 2,2,6-Trimethyl-4*H*-1,3-dioxin-4-on (**103**) mit HSPant^{Prot} (**151**) nach Lit.^[129]

Reagenzien und Bedingungen: a) **151** (0.80 Äquiv.), PhMe, 110 °C, 19 h.

Für die Synthese des einfachsten Pantetheinthioesters **160**, welcher keine ungesättigte Kette, sondern eine Methylgruppe trägt, wurde 2,2,6-Trimethyl-4*H*-1,3-dioxin-4-on (**103**) mit einem Unterschuss HSPant^{Prot} (**151**) umgesetzt (Schema 36). Das geschützte Acetoacetylthioat **160** wurde dabei in 67% Ausbeute erhalten. Mechanistisch handelt es sich bei der Reaktion um eine [4+2]-Cycloreversion von **103** mit der Bildung des Ketens **159** unter Abspaltung von Aceton. Das Keten reagiert nach seiner Bildung sehr schnell mit dem nucleophilen Thiol **151**.^[140]



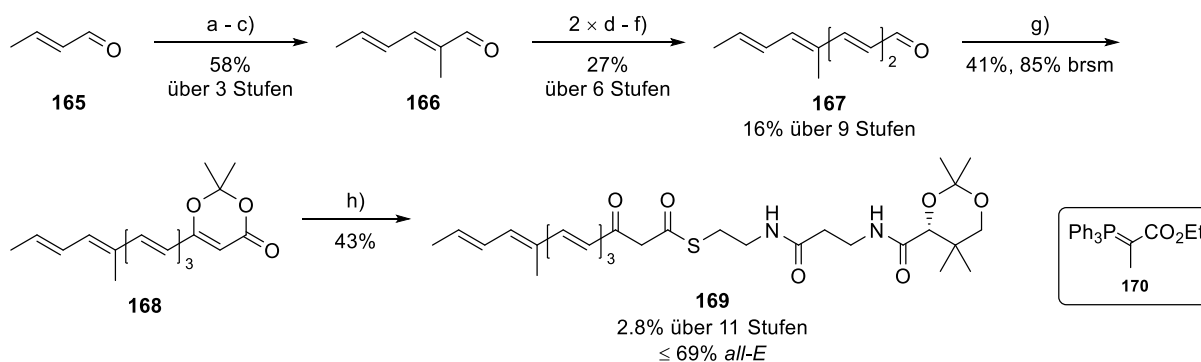
Schema 37. Synthese des methylverzweigten Trienyl- β -ketothioesters **165**.

Reagenzien und Bedingungen: a) Triethylphosphonoacetat, NaH, THF, RT, 10 min, dann **161**, RT, über Nacht; b) DIBAL-H, DCM, -78 °C, 1.5 h; c) MnO₂, DCM, RT, über Nacht; d) **156**, KHMDS, THF, -78 °C – 0 °C, 30 min, dann **162**, -78 °C – RT, über Nacht; e) **151**, PhMe, 130 °C, über Nacht.

Das methylverzweigte Trien **164** wurde ausgehend von Tigloylaldehyd (**161**) synthetisiert. Aufgrund der Photosensibilität der Polyene wurde bei allen Reaktionen unter Rotlicht mit Braunglas- oder Aluminiumfolie-umwickelten Kolben gearbeitet. In einer dreistufigen Sequenz aus HWE-Reaktion, Reduktion zum Allylalkohol und Oxidation mittels MnO₂ wurde **161** um

eine Doppelbindungseinheit verlängert. Obwohl die Wittig-Reaktion den Vorteil gehabt hätte, dass Oxidation und Olefinierung in einer Ein-Topf-Reaktion durchgeführt werden können, wurde auch in den nachfolgenden Synthesen bevorzugt die HWE-Reaktion verwendet.^[131] Die Vorteile der HWE-Reaktionen lagen in der hohen Reaktivität der verwendeten Phosphonate, der im Vergleich zu PPh_3O wesentlich leichteren Entfernung der wasserlöslichen Diethylphosphate und auch in der oft höheren *E*-Selektivität.

Der so erhaltene Aldehyd **162** wurde mit **156** zum Dioxinon **163** umgesetzt. Bei der Ringöffnung kam es durch Isomerisierung zu einem starken Selektivitätsverlust von ca. 18% *all-E*-Anteil. Die Ausbeute für den β -Ketothioester **164** lag bei 38%, bzw. 16% über fünf Stufen.



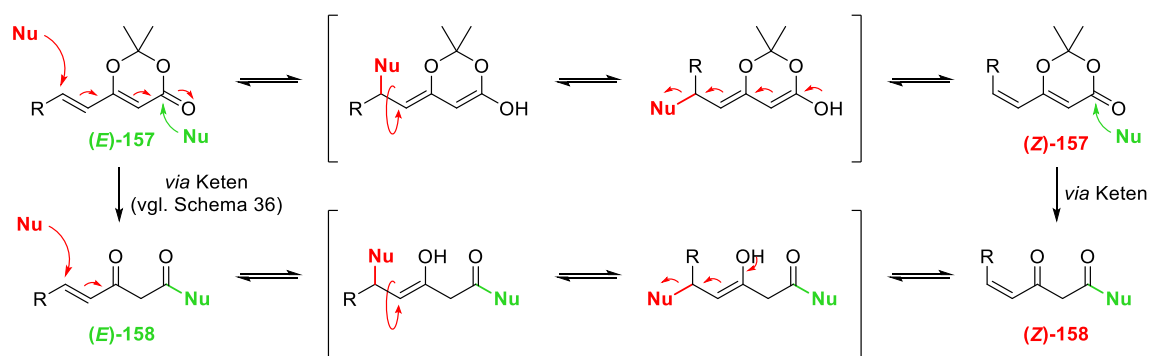
Schema 38. Synthese des fünffach ungesättigten β -Ketothioats **169** nach Route I.

Reagenzien und Bedingungen: a) Ylid **170**, DCM, RT, über Nacht; b) DIBAL-H, DCM, -78°C , 1.5 h; c) MnO_2 , DCM, RT, über Nacht; d) Triethylphosphonoacetat, NaH, THF, RT, 10 min, dann Aldehyd, e) DIBAL-H, -78°C , 1.5 h; f) MnO_2 , DCM, RT, über Nacht; g) **156** (1.25 Äquiv.), KHMDS, THF, $-78^\circ\text{C} - 0^\circ\text{C}$, 30 min, dann **167**, $-78^\circ\text{C} - \text{RT}$, über Nacht, dann **156** (0.75 Äquiv.), KHMDS, THF, $-78^\circ\text{C} - 0^\circ\text{C}$, 30 min, dann **167**, $-78^\circ\text{C} - \text{RT}$, über Nacht; h) **151**, PhMe, 130°C , über Nacht.

Auch das geschützte Pentaen-Substrat **169** wurde auf ähnliche Weise synthetisiert. Crotonaldehyd (**165**) wurde in einer Wittig-Reaktion mit dem Ylid **170** zu dem entsprechenden Ester olefiniert, welcher dann durch DIBAL-H und MnO_2 zum Aldehyd **166** umgesetzt wurde. Anschließend wurde zweimal die Verlängerungssequenz aus HWE-Reaktion, Reduktion und Oxidation durchgeführt. Da insbesondere die *E*-Selektivität bei der Wittig-Reaktion mit 92% relativ schlecht war, wurde bei der Säulenchromatographie auf Kosten der Ausbeute ein möglichst großer Teil der *Z*-Isomere entfernt. Dadurch war die Gesamtausbeute des Tetraenals **167** nur bei 16% über 9 Stufen. Bei der HWE-Funktionalisierung wurde trotz nachträglicher Zugabe von prämetalliertem Dioxinonphosphonat **156** ca. die Hälfte des Edukts **167** reisoliert. Bei der Ringöffnung mit $\text{HSPant}^{\text{Prot}}$ (**151**) lag die Ausbeute mit 43% ähnlich wie beim

Trienthioat **164**. Die Gesamtausbeute des β -Ketothioats **169** betrug insgesamt bei nur 2.8% über 11 Stufen bei einem niedrigen *all-E*-Anteil von ca. 69%.

Zusammenfassend weist diese Route noch deutliche Schwachstellen auf. Neben der hohen Anzahl an Stufen zum Aufbau der Kette ist besonders der hohe Anteil an *Z*-Isomeren nach der Ringöffnung ein großer Nachteil, da nicht klar ist, ob diese bei der Enzymreaktion stören oder im schlimmsten Fall sogar inhibitorisch wirken. Während die *Z*-Isomere der Ester, Aldehyde oder Allylalkohole relativ leicht durch Säulenchromatographie abgetrennt werden können, ist das auf der Stufe der β -Ketothioate kaum mehr möglich, da diese durch die Keto-Enol-Tautomerie und hohe Polarität ein starkes *tailing* zeigen.

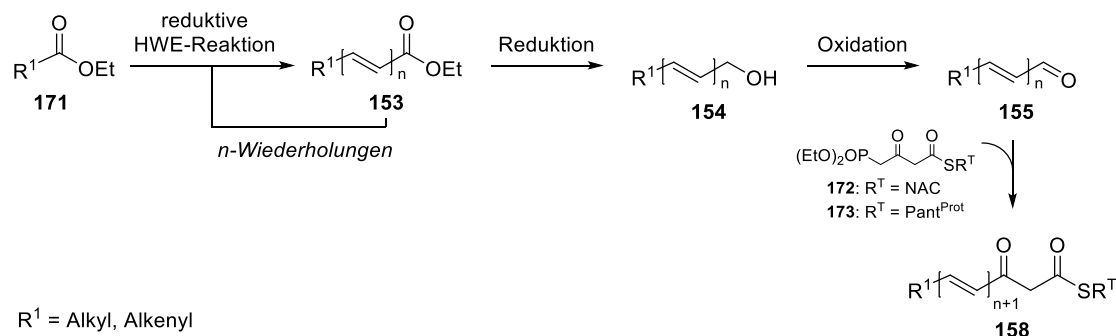


Nu = HSPant^{Prot} (**151**), HSNAC (**26**)

Schema 39. Möglicher Mechanismus der Nucleophil-induzierten Isomerisierung bei der Ringöffnung von **157**.

Es gibt mehrere potenzielle Gründe für die Isomerisierung während der Thiolyse. Einerseits bestünde die Möglichkeit einer thermischen Isomerisierung, da für die Cycloreversion über lange Zeitspannen hohe Temperaturen nötig sind. Eine andere Möglichkeit wäre eine Michael-Addition an das konjugierte π -System mit der Bildung einer frei drehbaren σ -Bindung und nachfolgender Eliminierung (Schema 39). Da es sich in beiden Fällen um eine thermodynamisch kontrollierte Reaktion handelt, werden zwar bevorzugt die *E*-Isomere gebildet, jedoch mit schlechten Selektivitäten. Eine photochemische Isomerisierung, wie sie oft zur Bildung von *Z*- aus *E*-Alkenen verwendet wird, kann aufgrund der sorgfältigen Abschirmung vor Strahlung so gut wie ausgeschlossen werden.^[141]

Route II – Einstufige Verlängerung und HWE-Funktionalisierung



Schema 40. Route II zur Synthese von Substratsurrogaten **158**.

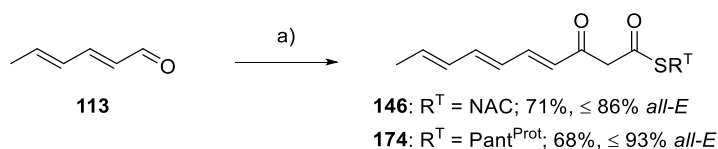
Um den Nachteilen von Route I Rechnung zu tragen, wurden zwei grundlegende Änderungen eingeführt (Schema 40). Die erste war die Reduktion der Schritte durch Verwendung einer reduktiven HWE-Reaktion, die zweite war die Verwendung der Phosphonate **172**, bzw. **173**. Diese sollten die starken Verunreinigungen durch *Z*-Isomere durch die Thiolyse vermeidbar machen.



Schema 41. Synthese der β -Ketothioatphosphonate **172** und **173**.

Reagenzien und Bedingungen: a) **172:** **26**, THF, 70 °C, 1 d; **173:** **151**, PhMe, 120 °C, 1 d.

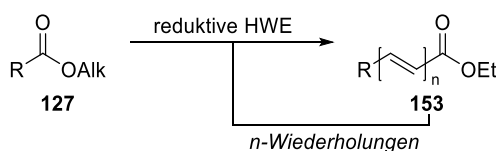
Die Synthese der Phosphonate **172** und **173** wurde ähnlich der Ringöffnung bei den Polyendioxinonen **157** durchgeführt. Dafür wurde das Dioxinonphosphonat **156** mit HSNAC (**26**), bzw. HSPant^{Prot} (**151**) umgesetzt (Schema 41). Die Phosphonate konnten so mit Ausbeuten von 84% (**172**) und 74% (**173**) dargestellt werden.



Schema 42. Einstufige Synthese der β -Ketotrienylthioate **146** und **174** ausgehend von Sorbaldehyd (**113**).

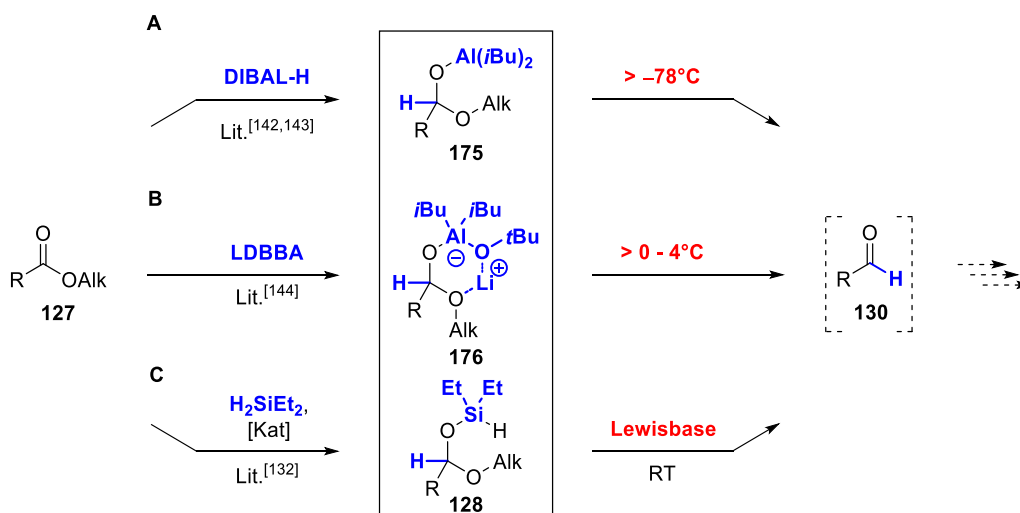
Reagenzien und Bedingungen: a) **172** ($\text{R}^{\text{T}} = \text{NAC}$)/**173** ($\text{R}^{\text{T}} = \text{Pant}^{\text{Prot}}$), LiHMDS, THF, 0 °C, 30 min, dann **113**, THF, 0 °C – RT, über Nacht.

Um die Einsetzbarkeit der β -Kethioatphosphonate **172** und **173** zu verifizieren, wurden diese im 500 μmol -Maßstab jeweils mit frisch hergestelltem (2*E*,4*E*)-Hexadienal (**113**) zur Reaktion gebracht (Schema 42). Neben einer deutlich verbesserten Ausbeute war auch der *all-E*-Anteil der Triene signifikant höher. Deutliche Unterschiede zwischen dem NAC (**146**)- und dem $\text{Pant}^{\text{Prot}}$ (**174**)-Thioat traten dabei nicht zu Tage.



Schema 43. Allgemeines Schema einer iterativen reduktiven HWE-Reaktion.

Die reduktive HWE (rHWE)-Reaktion ist eine Entwicklung der Olefinierungsreaktion bei der nicht ein Aldehyd, sondern eine Verbindung einer höheren Oxidationsstufe als Edukt eingesetzt wird, für gewöhnlich ein Ester **127** (Schema 43). Entsprechend war das Ziel direkt aus einem Carbonsäureester **127** einen um eine Doppelbindungseinheit verlängerten Ester **153** zu synthetisieren. Im besten Fall sollte sich dies iterativ bis zur gewünschten Anzahl Doppelbindungen durchführen lassen. Dadurch sollte die Stufenzahl für den Aufbau der Kette reduziert werden.

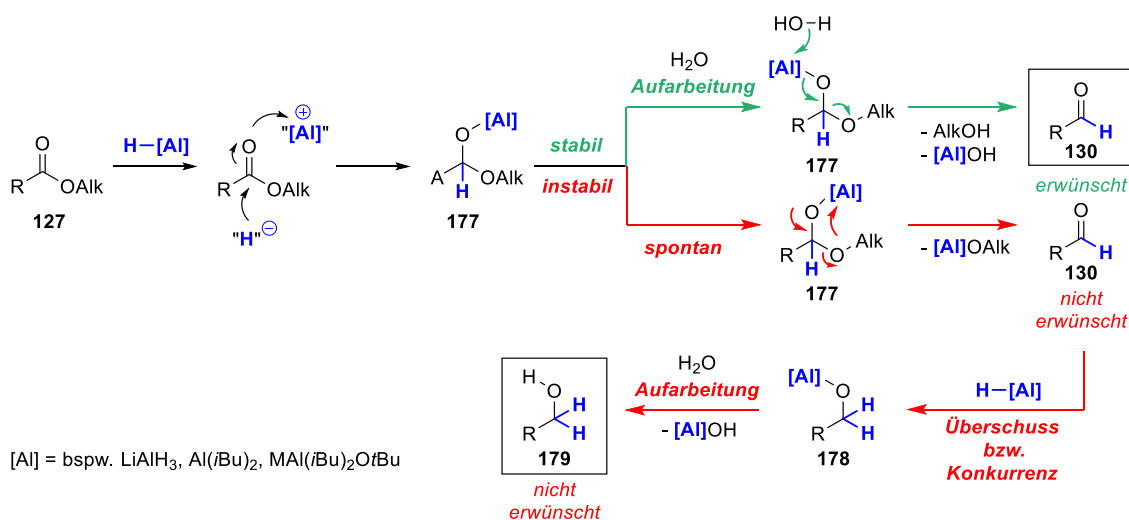


Schema 44. Bildung und Zerfall von Heteroatomacetalen aus Alkylestern **127**. A) Tetraedrische Aluminoacetale **175** nach Lit.^[142,143]; B) Komplexe Aluminoacetale **176** nach Lit.^[144] und C) Silylacetale **128** nach Lit.^[132]

Für die Durchführung reduktiver HWE-Reaktionen wurde bereits früh nach Reagenzien gesucht, die möglichst selektiv stabile Heteroacetalzwischenstufen generieren, die dann gezielt in einem zweiten Schritt zur Reaktion mit dem Olefinierungsreagenz gebracht werden können. Die wohl älteste Entwicklung in diesem Bereich war die Reduktion von Estern **127** mit DIBAL-H (Schema 44, A). Nachdem erkannt wurde, dass dabei Aluminoacetale **175** entstehen, die bei tiefen Temperaturen weitestgehend stabil sind, wurde untersucht, ob man diese nach Zugabe eines Sekundärreagenz wie Metallorganylanen oder metallierten Phosphonaten und anschließend (thermisch) induzierter Fragmentierung zum Aldehyd **130** für eine zweischrittige Ein-Topf-Reaktion verwenden kann.^[142,143] Die Gruppe An *et al.* konnte durch die Verwendung komplexer Aluminiumhydride wie LDBBA die Stabilität der erhaltenen Aluminoacetale **176** deutlich erhöhen, so dass diese nicht vor Erwärmen über 0–4 °C fragmentieren sollen (Schema 44, B).^[144] Temperaturtolerante, gleichzeitig aber auch gezielt spaltbare Acetale sind die Silylacetale **128** nach Jeon *et al.*^[132] Durch die Verwendung des relativ unreaktiven H₂SiEt₂ als Reduktionsmittel, wird zur Bildung des Acetals ein Iridium-Katalysator und dadurch ein strikt inertes Umfeld benötigt. Nach der Hydrosilylierung der C-O-Doppelbindung entsteht eine auch bei RT stabile Silylacetalzwischenstufe **128**. Durch die Behandlung mit einer Lewisbase fragmentiert diese unter Oktetaufweitung, wodurch der Aldehyd **130** gebildet wird. Neben dem

Silylrest wird dabei ein Alkoxid frei, welches dann dazu dienen kann Pronucleophile wie Phosphonate durch Deprotonierung zu aktivieren und so die Reaktion mit **130** zu initiieren (vgl. Kapitel 1.7, Schema 28).

Die verschiedenen Aluminiumhydride würden einen günstigen, einfachen Zugang für die reduktive HWE-Reaktion bieten. Der kritische Punkt ist hierbei jedoch die Stabilität der Aluminoacetale. Solange wasser- und sauerstofffrei, gearbeitet wird, sollte man die Stabilität dieser Acetale als eine intrinsische Eigenschaft betrachten können. So sind, wie bereits beschrieben, die Aluminoacetale ausgehend von DIBAL-H und einem Ester **127** wesentlich empfindlicher als die mit MDBBA (M = Li, Na, K). Da zwar insbesondere von Hoye *et al.* und Takacs *et al.* viele Versuche zur rHWE-Reaktion durchgeführt, allerdings nur in einem Fall mit mäßigen Erfolg ein ungesättigter Ester als Edukt verwendet wurde, blieb nach einer ausführlichen Literaturrecherche unklar, inwiefern sich die Methodik für den Aufbau von Polyenen eignet.^[142,143] Insbesondere bei DIBAL-H war es unwahrscheinlich, dass der Versuch erfolgreich sein würde, wurde dieses Reduktionsmittel in Route I doch ebenfalls stets bei tiefen Temperaturen für die Reduktion der ungesättigten Ester **153** zu den Allylalkoholen **154** verwendet.

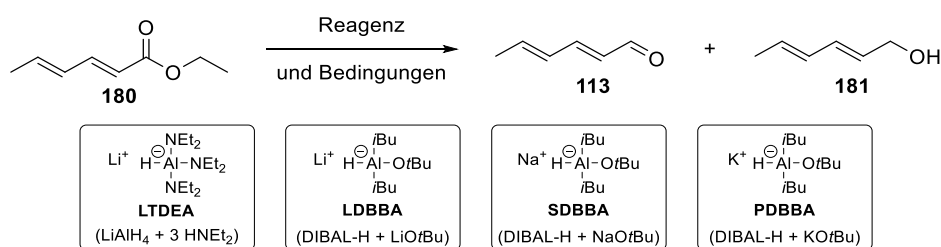


Schema 45. Mögliche Reaktionen zwischen **127** und Aluminiumhydriden. Entscheidend ist dabei die Stabilität von **177**.

Die Stabilität der Aluminoacetale **177** beeinflusst aber nicht nur den Ausgang einer zwei-stufigen reduktiven HWE-Reaktion, sondern bereits den Versuch einen Ester spezifisch zum Aldehyd zu reduzieren, wofür Wasser statt eines Phosphonats für die konsekutive Reaktion

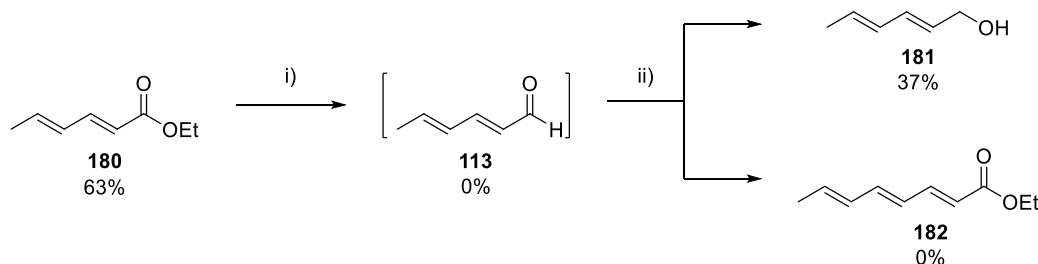
verwendet wird (Schema 45). Sind die Aluminoacetale stabil, wird bei der hydrolytischen Aufarbeitung erst nach Deaktivierung des Reduktionsmittels der Aldehyd **130** erhalten. Entsteht der Aldehyd aufgrund mangelnder Stabilität durch Fragmentierung hingegen vor Zugabe des Wassers, wird über den Verbrauch eines zweiten Reduktionsäquivalents vorzugsweise der primäre Alkohol **179** gebildet.

Tabelle 1. Tests zur selektiven Reduktion ungesättigter Carbonsäureester, resp. der Stabilität der entsprechenden Aluminoacetale **176** am Beispiel von Ethylsorbit (**180**). Anteile im Rohprodukt entsprechend des ^1H -NMR-Spektrums.



Reagenz	Lösungsmittel	Bedingungen	180 [%]	113 [%]	181 [%]	Lit.
DIBAL-H	DCM	1.00 Äq., -78 °C, 1 h	68	13	19	[145]
LTDEA	THF	1.50 Äq., 0 °C, 1.5 h	46	40	14	[146]
LDBBA	THF	1.30 Äq., 0 °C, 1 d	68	11	21	[144]
SDBBA	THF	1.50 Äq., 0 °C, 1 d	66	34	0	[147]
PDBBA	THF	1.50 Äq., 0 °C, 1 d	64	36	0	[148]

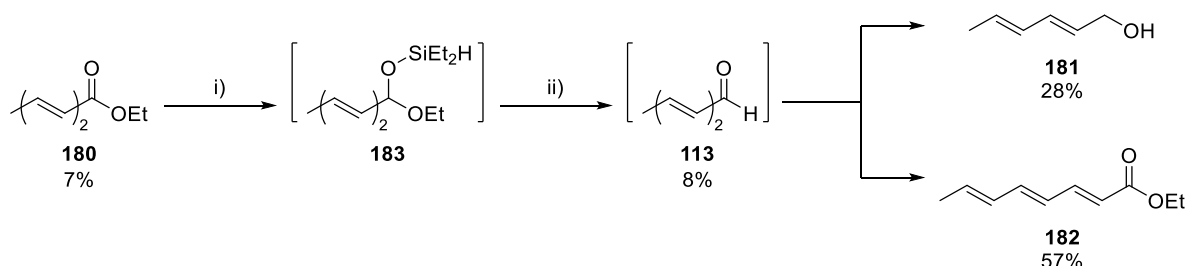
Vor diesem Hintergrund wurde ein Experiment entwickelt, um die Stabilität der beteiligten Aluminoacetale **177** bei der Umsetzung und damit die Aussichten auf Erfolg der rHWE-Reaktion bei mehrfach ungesättigten Estern wie Ethylsorbit (**180**) abschätzen zu können (Tabelle 1). Dafür wurde Ethylsorbit mit verschiedenen Hydriden des MDBBA-Typs, DIBAL-H und LTDEA, einem weiteren milden Reduktionsmittel aus der Gruppe der Aluminiumhydride, umgesetzt. Bei stabilen Aluminoacetalen sollte Sorbaldehyd (**113**) als prädominantes Produkt der Reaktion erhalten werden, im Falle von instabilen Aluminoacetalen vorzugsweise Sorbinalkohol (**181**). Für DIBAL-H und LDBBA entstanden laut ^1H -NMR-Spektrum dabei keine nennenswerten Mengen des Sorbaldehyds, sondern überwiegend Sorbinalkohol. Zwar wurde nach Reaktion mit den anderen Reduktionsmitteln LTDEA, SDBBA und PDBBA der Aldehyd als Hauptprodukt nachgewiesen, jedoch waren in allen Fällen die Umsätze ungenügend.



Schema 46. Versuchte rHWE-Reaktion an Ethylsorbit (**180**) mit DIBAL-H in Anlehnung an Burton *et al.*^[149]

Reagenzien und Bedingungen: i) DIBAL-H (1.00 Äquiv., 0.5 mL/min), THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min; ii) Li · Triethylphosphonoacetat, THF, $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 min.

Inwiefern sich die Ergebnisse dieses Tests auf die Durchführung einer rHWE-Reaktion übertragen ließen, wurde mit Ethylsorbit (**180**), DIBAL-H und prämetalliertem Triethylphosphonoacetat als Nucleophil in Anlehnung an ein Protokoll von Burton *et al.* überprüft (Schema 46).^[149] Bei ähnlichem Umsatz wie im Reduktionsversuch wurde ausschließlich Sorbinalkohol (**181**) im Rohprodukt gefunden, weswegen die Methode nicht weiter verfolgt wurde. Wegen der schlechten Umsätze in den Vorversuchen wurde auch auf weitere Versuche mit LTDEA, SDBBA oder PDBBA verzichtet.



Schema 47. Reduktive HWE-Reaktion an Ethylsorbit (**180**) mit H_2SiEt_2 in Anlehnung an Jeon *et al.*^[132]

Reagenzien und Bedingungen: i) H_2SiEt_2 (2.00 Äquiv.), $[\text{IrCl}(\text{coe})_2]_2$ (0.1 Mol-%), DCM, RT, über Nacht; ii) KOTMS, Triethylphosphonoacetat, THF, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h.

Neben den Aluminoacetalen sollen sich insbesondere die Silylacetale wie **183** nach Jeon *et al.* für die Durchführung reduktiver HWE-Reaktionen eignen.^[132] Bereits ein erster Versuch an Ethylsorbit (**180**) zeigte mit 57% des Trienylesters **182** vielsprechende Ergebnisse (Schema 47). Problematisch war in ersten Versuchen aber die ungewöhnlich schlechte Löslichkeit des verwendeten KOTMS, was auf die Anwesenheit von KOH schließen ließ. Auch die Aufarbeitung war problematisch, was sich anhand der schlechten Ausbeute und Rückgewinnung der Produkte und des Edukts von 29 Mol-% zeigte. Da die Entfernung des Reduktionsmittels

H_2SiEt_2 für eine selektive Reduktion zum Silylacetal essenziell war, wurde dieses durch möglichst schonende Evaporation im N_2 -Strom und anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Trotz großer Siedepunktunterschiede sowohl des Edukts als auch der möglichen Produkte zum Lösungsmittel DCM und H_2SiEt_2 (Sdp = 56 °C) ist es wahrscheinlich, dass hierbei ein großer Teil des Produkts ausgeschleppt wurde.

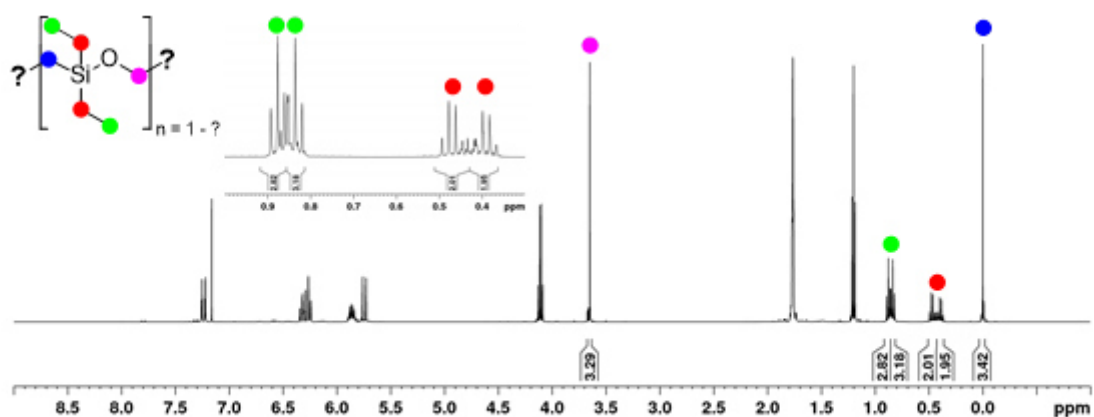
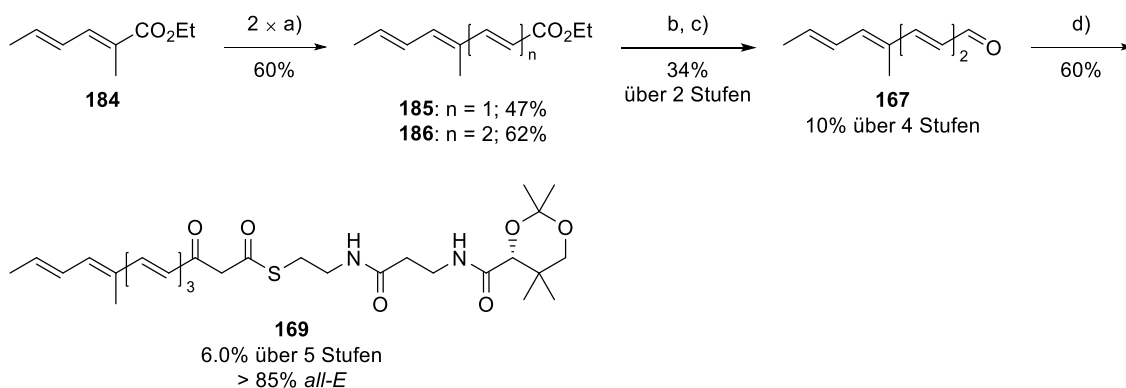


Abbildung 24. $^1\text{H-NMR}$ (300 Hz, CDCl_3) der bei unzureichender Entfernung flüchtiger Komponenten auftretenden Silylverunreinigung.

Neben der Möglichkeit der Überreduktion bestand aber ein weiteres Problem darin, dass bei unzureichender Entfernung der flüchtigen Reaktionskomponenten ein Silylnebenprodukt entstand, welches sich weder durch fraktionierte Destillation noch durch Säulenchromatographie entfernen ließ, so dass die Vollständigkeit der Abtrennung unabdingbar war (Abbildung 24).

Diesen Umständen wurden in den folgenden Versuchen durch Verwendung einer kommerziellen KOSiMe_3 -Lösung, sowie einer vorsichtigen, mehrschrittigen azeotropen Entfernung des DCM und H_2SiEt_2 mit Et_2O am Rotationsverdampfer unter N_2 -Atmosphäre Rechnung getragen.

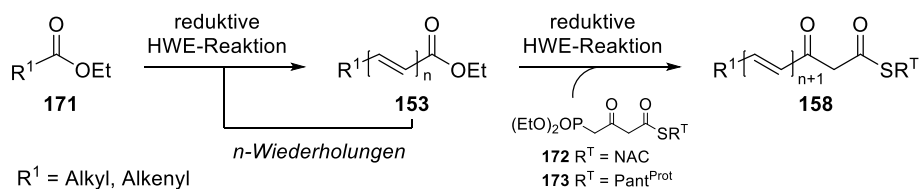


Schema 48. Synthese des fünffach ungesättigten β -Ketothioats **169** nach Route II.

Reagenzien und Bedingungen: a) i: H_2SiEt_2 , $[\text{IrCl}(\text{coe})_2]_2$, DCM, RT, über Nacht; ii: KOTMS, Triethylphosphonoacetat, THF, 0°C , 1 h; b) DIBAL-H, DCM, -78°C , 1.5 h; c) MnO_2 , DCM, RT, über Nacht; d) **173**, LiHMDS, THF, 0°C , 30 min, dann **167**, THF, 0°C – RT, über Nacht.

Die präparative Anwendung der rHWE-Reaktion für die Synthese des β -Ketopentaenylthioats **169** startete ausgehend vom zweifach ungesättigtem Ester **184**. In zwei aufeinanderfolgenden rHWE-Reaktionen wurde dieser um zwei Doppelbindungen zum Ester **186** verlängert. Auch bei diesen beiden Reaktionen konnten nur mäßig Ausbeuten erhalten werden, was vermutlich auch hier an der Flüchtigkeit der beteiligten Produkte lag. Dafür spricht auch die höhere Ausbeute im zweiten Verlängerungsschritt von **185** zu **186**. Nach der standardmäßigen Reduktions-/Oxidationssequenz wurde der Aldehyd **167** mit dem *O,O'*-Isopropylidenpantetheinylphosphonat **173** umgesetzt. Das β -Ketothioat **169** wurde so in einer Gesamtausbeute von 6.0% über 5 Stufen erhalten. Im Vergleich zu 2.8% bei Route I konnte eine signifikante Ausbeutesteigerung und insbesondere auch eine große Verbesserung der *E*-Selektivität (>85% statt $\leq 69\%$ all-*E*) erreicht werden.

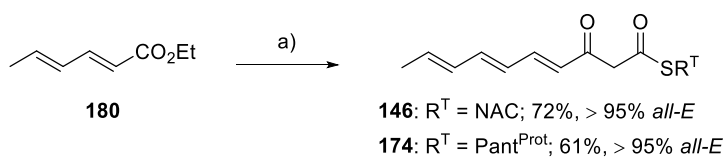
Route III – Einstufige Verlängerung und rHWE-Funktionalisierung



Schema 49. Allgemeines Schema von Route III zur Synthese der β -Ketothioester **158** mit rHWE-Reaktionen.

Die logische Fortführung von Route II war der Versuch auch die Phosphonate **172**, bzw. **173** im Zuge der reduktiven HWE-Reaktion einzusetzen um mögliche Ausbeute-, bzw. Selektivitätsverluste während der Reduktion und Oxidation zu vermeiden.

Die ersten Versuche dazu wurden mit Ethylsorbat (**180**) durchgeführt, welches ohne weitere Verlängerungsschritte direkt mit den Phosphonaten **172**, bzw. **173** zu den entsprechenden dreifach ungesättigten β -Ketothioaten umgesetzt werden sollte.



Schema 50. Ein-Topf-Synthese der β -Ketotrienylthioate **146** und **174** ausgehend von Ethylsorbat (**180**).

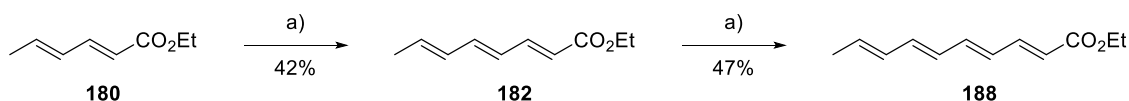
Reagenzien und Bedingungen: a) i: H_2SiEt_2 , $[\text{IrCl}(\text{coe})_2]_2$, DCM, RT, über Nacht; ii: KOTMS, **172** ($\text{R}^T = \text{NAC}$)/**173** ($\text{R}^T = \text{Pant}^{\text{Prot}}$), THF, 0°C , 1 h.

Sowohl für $\text{R}^T = \text{NAC}$ (**146**), als auch für $\text{R}^T = \text{Pant}^{\text{Prot}}$ (**174**) wurden passable Ausbeuten erhalten, der Anteil der *all-E*-Produkte lag dabei bei exzellenten > 95%. Aufgrund des großen Störpotentials der schwer abzutrennenden *Z*-Isomere im Rahmen der enzymologischen Tests ist die im Vergleich zu Route II leicht niedrigere Ausbeute für **174** absolut tolerabel gewesen. Insbesondere bei der Reinigung besteht dabei aber noch Potential die Ausbeute zu steigern. Mit der Verwendung eines tertiären Eluentengemischs aus Dichlormethan, Acetonitril und Methanol konnte bereits eine scharfe chromatographische Trennung - selbst der Isomere - unter standardisierten Bedingungen erreicht werden, jedoch könnte eine weitere Untersuchung einer breiten Palette an Eluenten und Absorbenzien zu besseren Ausbeuten führen, da immer noch verhältnismäßig große Mischfraktionen zwischen 10 – 20 Gew.-% anfielen. Zusätzlich besteht weiterhin das Problem der Flüchtigkeit der Reaktionskomponenten, was möglicherweise durch veränderte Reaktions- oder Aufarbeitungsbedingungen behoben werden kann.

Dennoch kann Route III bereits ohne weitere Optimierung als effektive und selektive Synthesemethode für die Triene **146** und **174** bewertet werden, die gute Resultate mit einem angemessenen Aufwand erbringt. Neben der hohen Selektivität ist besonders die Stabilität der

Zwischenprodukte (Carbonsäureester) ein bestechender Faktor, der bei der Präparation hochsensibler Polyensubstrate nicht außer Acht gelassen werden darf und der durch diese Methode optimal genutzt wird.

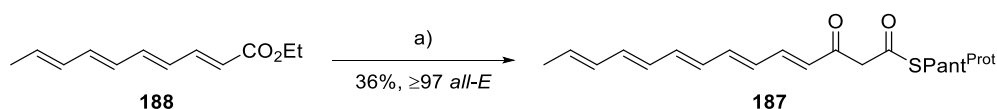
Inwiefern sich die Methode auch für anspruchsvollere Substrate nutzen lässt, sollte an der Darstellung des Pentaens **187** evaluiert werden, da hier potenzielle Störeinflüsse aufgrund der höheren Anzahl benötigter Wiederholungen und der chemischen sowie physikalischen Sensibilität der Verbindung besonders leicht sichtbar werden würden.



Schema 51. Synthese des Tetraenoats **188** durch zweifache rHWE-Reaktion.

Reagenzien und Bedingungen: a) i: H_2SiEt_2 , $[\text{IrCl}(\text{coe})_2]_2$, DCM, RT, über Nacht; ii: KOTMS, Triethylphosphonoacetat, THF, 0°C , 1 h.

Die Polyenkette wurde ausgehend von Ethylsorbat (**180**) durch zweifache rHWE-Reaktion aufgebaut (Schema 51). Durch den Kompromiss zwischen Volatilität der beteiligten Silylacetale und der Notwendigkeit die überschüssigen flüchtigen Reaktionskomponenten vollständig zu entfernen, wurden hierbei jeweils nur mäßige Ausbeuten von 43%, resp. 47% erhalten. Damit ergibt sich für den vierfach ungesättigten Ester **188** eine Gesamtausbeute von 20% mit einem ausgezeichneten *all-E*-Anteil $\geq 97\%$.



Schema 52. Ein-Topf-Synthese des fünffach ungesättigten β -Kethioats **187**.

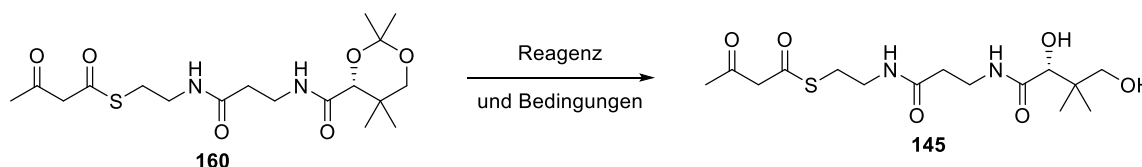
Reagenzien und Bedingungen: a) i: H_2SiEt_2 , $[\text{IrCl}(\text{coe})_2]_2$, DCM, RT, über Nacht; ii: KOTMS, **172** ($\text{R}^T = \text{NAC}$)/**173** ($\text{R}^T = \text{Pant}^{\text{Prot}}$), THF, 0°C , 1 h.

Bei der Funktionalisierung mittels rHWE-Reaktion zwischen **188** und dem Phosphonat **173** wurde eine Ausbeute von 36% erreicht, wobei die gleichen Verlustfaktoren wie bei **146** und **174** ausschlaggebend gewesen sein sollten. Da das gereinigte Produkt aber auch mit einem hervorragenden *all-E*-Anteil von $\geq 97\%$ vorlag, erwies sich mit diesem Versuch Route III als die geeignetste Methodik für die Synthese der Polyen- β -kethioester.

3.1.2 ENTSCHÜTZUNG DER D-PANTETHEINTHIOATE

Wie bereits eingangs diskutiert handelt es sich bei Polyen- β -ketothioaten um Verbindungen die unter anderem empfindlich gegen Säuren sind.^[127,150] Zusätzlich besteht die Gefahr der Hydrolyse des Thioesters und nachfolgender Decarboxylierung. Aufgrund dieser Sensitivitäten stellte die Entschützung der *O,O'*-Isopropylidenpentetheinthioate, die in der Regel mit (wässrigen) Brønsted- oder Lewissäuren durchgeführt wird, eine besondere Herausforderung dar.^[151]

Tabelle 2. Versuche zur Spaltung des Acetonids in **160** zu **145**.



Nr	Reagenz	Lösungsmittel	T [°C]	n [μmol]	Ergebnis
1	AcOH (33 Vol.-%)	H ₂ O	RT	80	22% ¹ , Hydrolyse
2	TFA (1 Vol.-%)	DCM	RT	80	<5% ¹ , Edukt

1) Umsätze laut ¹H-NMR.

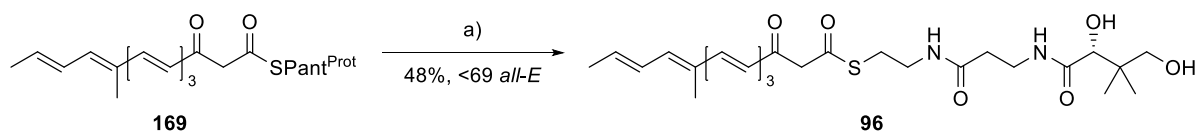
Die ersten Versuche zur Entschützung der *O,O'*-Isopropylidenpentetheinthioate wurden im semipräparativen Maßstab an der Acetoacetyl-Verbindung **160** durchgeführt. Nachdem die Verwendung literatur-abgeleiteter Protokolle an diesem Edukt hierbei keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte (aq. AcOH^[152] 22% **145**, TFA^[68] <5% **145**; Tabelle 2), wurden sie zugunsten der Verwendung mehrfach ungesättigter Edukte zur weiteren Evaluierung eingestellt um einen anschließend nötigen Methodentransfer zu vermeiden.

Tabelle 3. Verschiedene Ansätze zur Spaltung des Acetonids in **164** zu **147**.

Nr	Reagenz	Lösungsmittel	T [°C]	n [μmol]	Ergebnis
1	AcOH (33%)	H ₂ O	RT	91	<5% ¹ , Hydrolyse
2	Dowex™ G26 H ⁺	H ₂ O	RT	79	Keine Reaktion
3	Dowex™ G26 H ⁺	MeOH/H ₂ O 9:1	50 °C	86	50% ¹
4	Dowex™ G26 H ⁺	MeOH/H ₂ O 9:1	60 °C	218	83% ¹ , 21% ²

1) Anteil im Rohprodukt nach Filtration über ein schmales Silicabett laut ¹H-NMR, 2) isolierte Ausbeute.

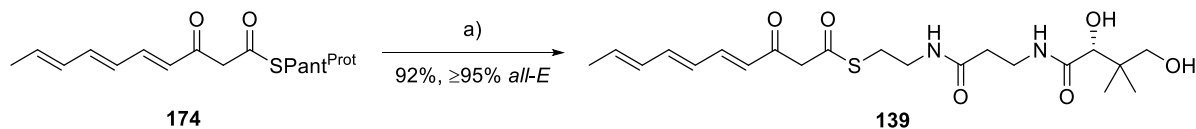
Weitere Versuche zur Findung einer geeigneten Entschützungs Methode wurden darum an **164** durchgeführt (Tabelle 3). Die von Agarwal *et al.* beschriebene Verwendung von 33% AcOH aq.^[152] führte bei **164** überwiegend zur Hydrolyse und einer Rohausbeute von < 5%. Die andere Methode wurde von Lee *et al.* für die Entschützung von Diacetonid-geschützten Kohlenhydraten mit säurelabilen Gruppen entwickelt.^[153] Hier wurde das saure Kationenaustauscherharz Dowex™ G26 H⁺ verwendet. Während unter den Literaturbedingungen keine Reaktion beobachtet werden konnte, was wahrscheinlich an der niedrigen Löslichkeit von **164** lag, ließ sich die Ausbeute an **147** durch kräftiges Rühren bei erhöhter Temperatur in einem 9:1 MeOH-H₂O-Gemisch steigern. Die besten Ausbeuten konnten bei 60 °C erreicht werden. Die Rohausbeute laut ¹H-NMR betrug unter diesen Bedingungen 83%, wovon durch Reinigung mittels Säulenchromatographie an C₁₈-modifizierten RP-SiO₂ allerdings nur 21% isoliert werden konnten.


Schema 53. Entschützung von **169** mit Dowex™ G26 H⁺.

Reagenzien und Bedingungen: a) Dowex™ G26 H⁺, MeOH/H₂O 9:1, 60 °C, über Nacht.

In einem semipräparativen Ansatz konnte **169** mit Dowex™ G26 H⁺ unter den ausgearbeiteten Bedingungen entschützt werden. Nach der Reinigung an C₁₈-SiO₂ wurden 8.0 mg **96** erhalten,

was einer Ausbeute von 48% entsprach. Neben der nur moderaten Ausbeute zeigte insbesondere die schlechte Isomerenreinheit bei <69% *all-E*-Anteil die Dringlichkeit einer weiteren Optimierung auf.



Schema 54. Entschützung von **174** mit Trifluorsulfonsäure in wfr. Trifluorethanol.

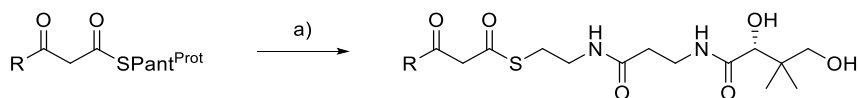
Reagenzien und Bedingungen: a) TfOH (5 Vol.-%), F₃CCH₂OH abs., RT, 2 h.

Hirama *et al.* verwendeten bei ihrer Synthese des Endiins N1999-A2 katalytische Mengen Trifluormethansulfonsäure in Trifluorethanol um unter gleichzeitigem TES-Verlust ein 1,2-Acetonid zu spalten.^[154] Da die Endiine ähnliche Sensitivitäten wie die Polyen-β-ketothioate aufweisen sollten, erschien die Methode ausreichend schonend, um sie bei Entschützung der Pantetheinreste einsetzen zu können.

Im Vergleich zu den Literaturbedingungen wurde die Reaktionstemperatur nach ersten Versuchen von 0 °C auf Raumtemperatur erhöht. Um eine schonende Aufarbeitung zu gewährleisten und Substanzverlust zu vermeiden, wurde zur Entfernung der Säure und des Trifluorethanol ein mit NaCl gesättigter Natriumphosphatpuffer verwendet. Der wichtigste Faktor für den Erfolg der Reaktion war allerdings die Reinheit des Trifluorethanol. So wurden beim Trien **174** mit TFE, welches entweder direkt aus der Flasche entnommen wurde oder bei dem längere Zeit zwischen der Absolutierung und der Verwendung lag, Ausbeuten um 70% erhalten. Bei TFE welches hingegen nach Lit.^[155] durch längeres Refluxieren über wfr. K₂CO₃, MgSO₄ und MS 3Å und fraktionierter Destillation von Wasser, Trifluoressigsäure und ggf. weiteren Kontaminationen befreit wurde wurden bis zu 92% Ausbeute erreicht (Schema 54). Neben guten Ausbeuten zeichnete sich die Methode auch dadurch aus, dass es zu keiner Isomerisierung kam, so dass stets *all-E*-Anteile >95% zu verzeichnen waren.

Tabelle 4. Entschützung mittels TfOH/TFE

Reagenzien und Bedingungen: a) TfOH (5 Vol.-%), F₃CCH₂OH abs., RT.



Nr	Edukt	Produkt	R	Ausbeute [%]	all-E [%]
1	160	145	Me	57 ¹	–
2	187	148		92 ²	>95%
3	169	96		60 ²	>85

1) Aufarbeitung mit NEt₃, 2) Aufarbeitung mit Phosphatpuffer

Mit der Methode ließen sich auch die Pentaene **187** und **169**, sowie das Acetoacetylthioat **160** in mittleren bis guten Ausbeuten und guten Reinheiten entschützen (Tabelle 4).

Abschließend lässt sich sagen, dass die Entschützung mit katalytischen Mengen TfOH in TFE abs. den anderen Methoden (Dowex™ G26 H⁺, TFA, AcOH) klar überlegen ist und gute Ausbeuten bei einem geringen Grad an Nebenreaktionen ermöglicht.

3.2 SYNTHESE DER AMBG-CARBONSÄURESUBSTRATE

Da die Sequenzvergleiche und Strukturhomologiemodelle keine Aussagen zur Substratspezifität der FAAL-ACP-Didomäne AmbG zuließen, wurde diese durch *in vitro*-Enzymaktivitätstests an einer Vielzahl unterschiedlicher Carbonsäuren näher untersucht.^[85] Da das dafür nötige Spektrum verschiedener Carbonsäuren nicht vollständig mit kommerziell verfügbaren Substanzen abgedeckt werden konnte, wurden die Synthesen für einen Teil der Substratbibliothek im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

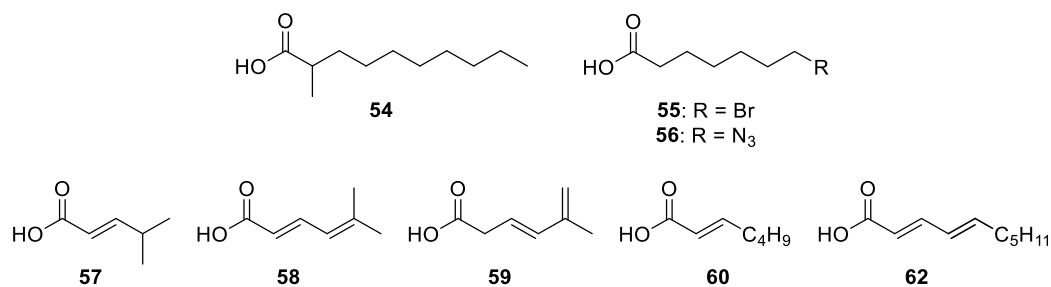
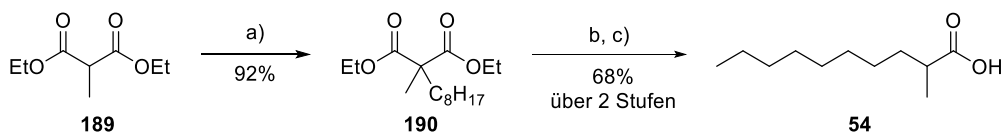


Abbildung 25. Carbonsäuren als Substrate für AmbG die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert wurden.

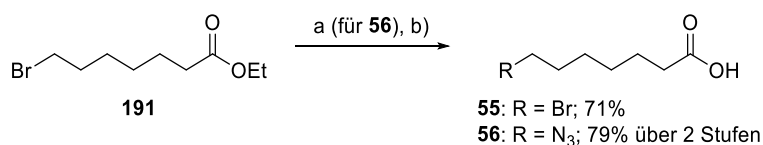
2-Methyldecansäure (**54**) wurde verwendet um den Einfluss einer α -Verzweigung wie im hypothetischen Ambruticin-Vorläufer **45** nachzuahmen. Die beiden Heptansäurederivate **55** und **56** sollten aufzeigen, ob AmbG polare, orthogonal adressierbare Funktionalitäten im eigentlich stark hydrophoben Bereich des Enzymvorläufers toleriert. Da es sich auch bei den Ambruticin-Vorläufern um (mehrfach) ungesättigte Verbindungen handelt, sollten diverse ungesättigte Carbonsäuren synthetisiert werden. Hierunter waren verschiedene konjugierte und nicht-konjugierte ein- und zweifach ungesättigte Säuren enthalten (Abbildung 25).



Schema 55. Synthese von 2-Methyldecansäure (**54**).

Reagenzien und Bedingungen: a) NaH, $\text{H}_{15}\text{C}_7\text{I}$, DMF, $0\text{ }^\circ\text{C}$ – RT, 2 h; b) NaOH aq., $100\text{ }^\circ\text{C}$, 33 h; c) Δ , neat, 3 h.

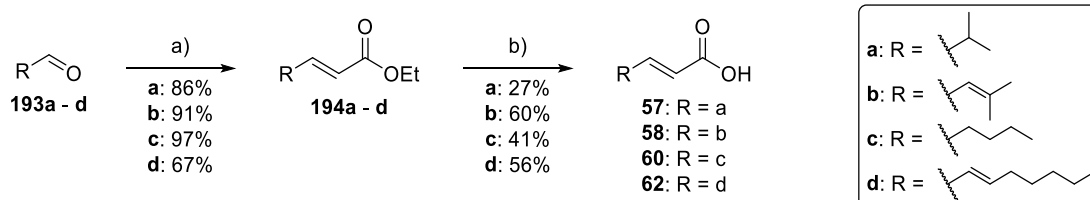
2-Methyldecansäure (**54**) wurde in 63% Ausbeute über drei Stufen mittels einer Malonester-synthese aus Diethylmethylmalonat (**189**) dargestellt. Da die Hydrolyse des alkylierten Diesters **190** im sauren Milieu nicht gelang, mussten Verseifung und Decarboxylierung zu **54** getrennt erfolgen (Schema 55).



Schema 56. Synthesen der funktionalisierten Heptansäurederivate **55** und **56**.

Reagenzien und Bedingungen: a) NaN_3 , DMF, $80\text{ }^\circ\text{C}$, 26 h; b) 1 N NaOH aq., MeOH, RT, über Nacht.

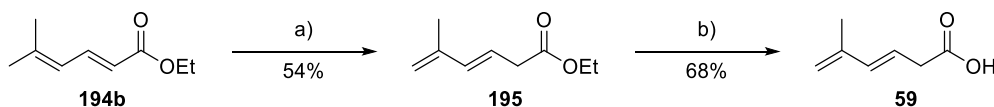
Zur Synthese der 7-Azidheptansäure (**56**) wurde Ethyl-7-bromheptanoat (**191**) mit Natriumazid in DMF umgesetzt und der erhaltene Ester **192** verseift. Die 7-Bromheptansäure (**56**) wurde direkt durch Verseifung von **191** erhalten.



Schema 57. Synthesen der α,β -ungesättigten Carbonsäuren **57**, **58**, **60** und **62**.

Reagenzien und Bedingungen: a) Ethyl-2-(triphenyl- λ^5 -phosphanyliden)acetat (**121**), DCM, 0 °C – RT, über Nacht; b) 1 N NaOH aq., MeOH, RT, ü.

Die α,β -ungesättigten Carbonsäuren **57**, **58**, **60** und **62** wurden jeweils aus dem entsprechenden Aldehyd mittels Wittig-Reaktion zu den Estern **194a - d** und anschließender Verseifung dargestellt. Die Gesamtausbeuten variierten zwischen 23% und 55%, wobei die größten Einbußen bei der Verseifung zustande kamen, die Olefinierung lief i.d.R. mit guten Ausbeuten und *E/Z*-Selektivitäten bei $\geq 97\%$ *E*-Anteil ab.



Schema 58. Synthese der 3,5-ungesättigten Säure **59**. Die Prozentangabe in Klammern gibt die rechnerische Ausbeute an, da die Produkte mit dem jeweiligen 2,4-ungesättigten Isomer verunreinigt waren.

Reagenzien und Bedingungen: a) LiHMDS, DMPU, THF, –35 °C, 6 h, dann 10% AcOH aq.; b) 1 N NaOH aq., MeOH, RT, über Nacht.

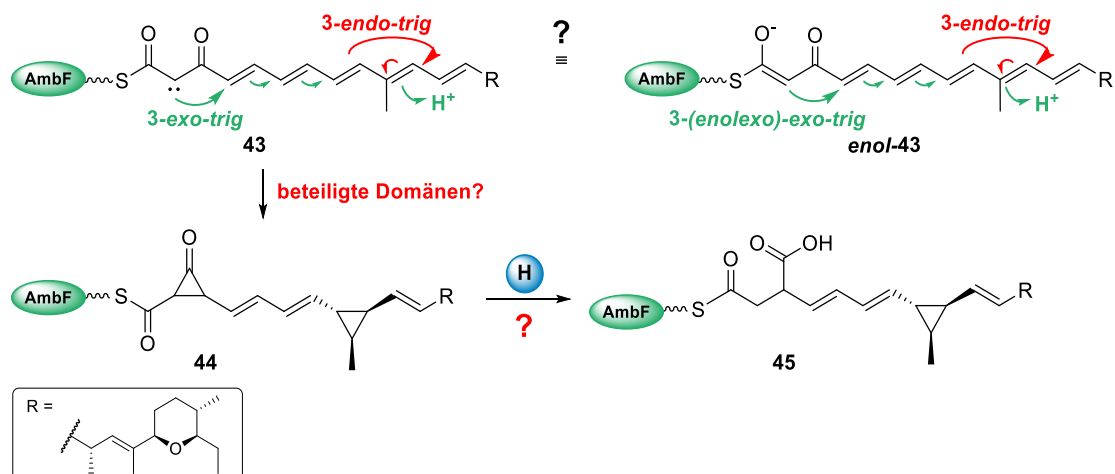
Da die Doppelbindungen des hypothetischen Ambruticin-Vorläufers **45** nicht in Konjugation zur Carboxylgruppe stehen, sollte neben den α,β -ungesättigten auch die unkonjugierte Carbonsäure **59** synthetisiert werden. Dafür wurde der zweifach ungesättigte Ester **194b** mit LiHMDS und DMPU bei –35 °C deprotoniert. Die Reprotonierung mit wässriger AcOH sollte dann zum Ethyl-(*E*)-5-methylhexa-3,5-dienoat (**195**) führen. Dies gelang zwar mit einer Ausbeute von 54%, jedoch ließ sich das zu noch 4% erhaltene Edukt **194b** nicht abtrennen. Nach Verseifung war das 2,4-Isomer **58** zu 11% vorhanden, so dass für das Produkt **59** nur eine faktische Gesamtausbeute von 68% erreicht wurde. Aufgrund der Verunreinigung mit dem

Isomer war **59** nur eingeschränkt für die *in vitro*-Versuche geeignet. Insbesondere der quantitative Pyrophosphat-Freisetzungstest war so nur bedingt aussagekräftig, während der Einfluss auf den semiquantitativen Versuch zur Selbstacylierung von AmbG weniger eklatant sein sollte.

3.3 UNTERSUCHUNGEN DER AMBF-DOMÄNEN H UND PX

3.3.1 REVIDIERTE BIOSYNTHESEHYPOTHESE

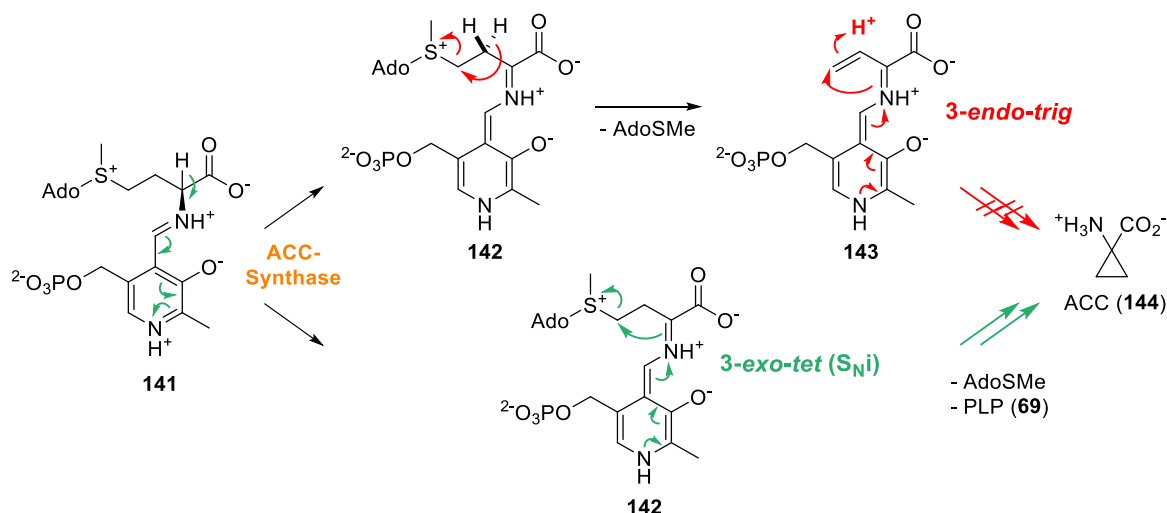
Die Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments wirft, wie sie in der Literatur beschrieben ist, einige Fragen auf (vgl. Kapitel 1.3.2).^[31]



Schema 59. Mechanismus der Cyclopropanierung des Ambruticin-Intermediats **43** zu **45** nach Reeves *et al.*^[31]

Abgesehen von den unklaren Rollen der H- und insbesondere der Px-Domäne sollte auch der Mechanismus der Favorskii-ähnlichen-Reaktion kritisch betrachtet werden (Schema 59). Das abgebildete Schema und der dazugehörige Text in der Publikation lassen offen, wie die Reaktion von der α -Position aus abläuft. Denkbar wäre hier die Deprotonierung zu *enol-43*.

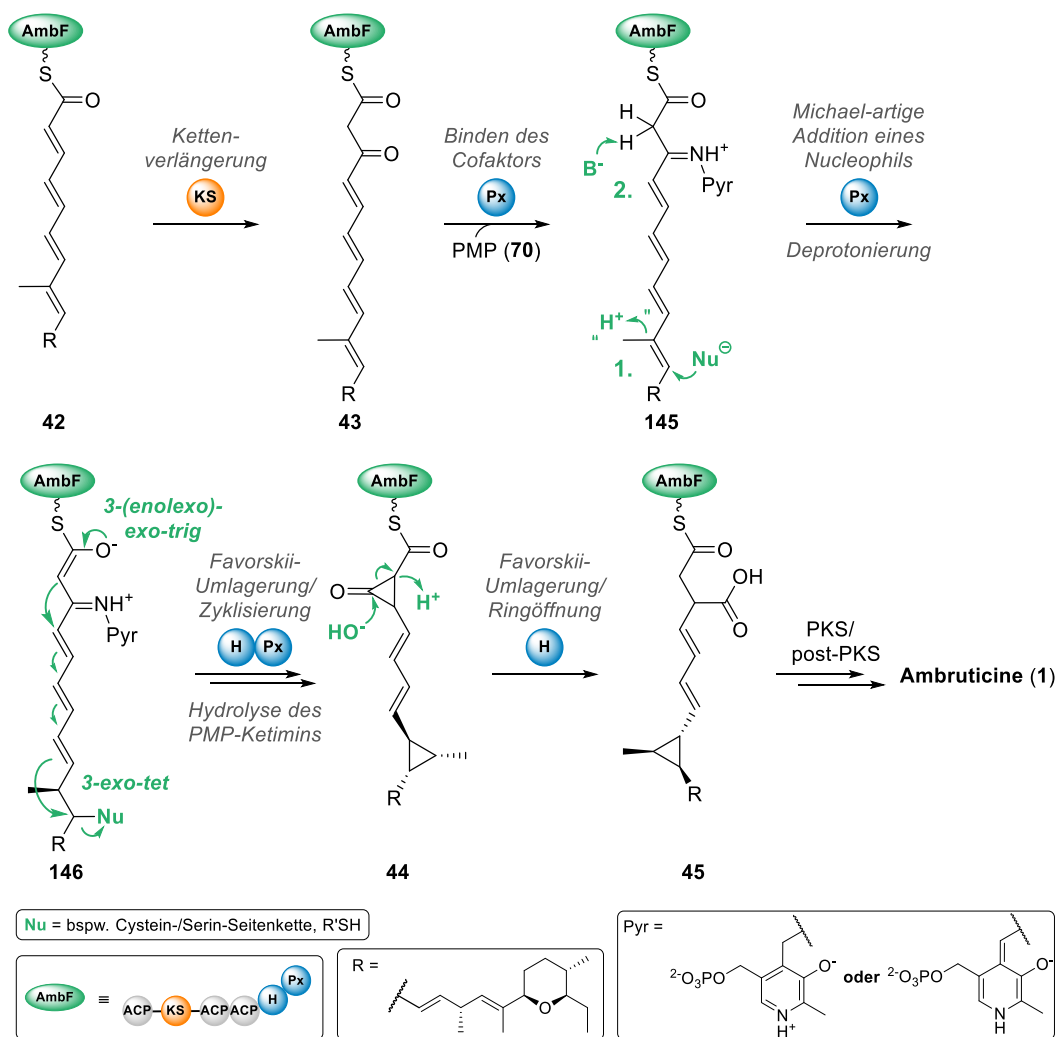
Die Autoren argumentierten, dass die Nettoreaktion von **43** zu **45** durch einen Energieverlust des Systems von 17 kcal/mol (\equiv 71 kJ/mol) begünstigt sei.^[31] Allerdings müsste bei der Reaktion von **43** zu **44** gemäß der Argumentation von Reeves *et al.* 10 kcal/mol (\equiv 42 kJ/mol) aufgewendet werden, was in etwa den Aktivierungsenergien von Ringschlüssen bei sehr hohen Temperaturen entspricht.^[156] Auch wenn die Aktivierungsenergie durch die katalytische Wirkung des Enzyms herabgesetzt wird, scheint die Reaktion zu **44** doch thermodynamisch und entsprechend der Baldwin-Regeln durch den 3-endo-trig-Ringschluss auch kinetisch stark gehindert. Obwohl die Baldwin-Regeln keine absoluten Regeln mit entsprechenden Verboten, sondern empirisch begründet sind und eher starke Tendenzen wiedergeben, gibt es einige Beispiele, die dafürsprechen, dass auch enzymkatalysierte Reaktionen den Baldwin-Regeln folgen.^[157]



Schema 60. Verschiedene Reaktionswege des SAM-PLP-Kondensationsprodukts **141** zu 1-Aminocyclopropancarbonsäure (ACC, **144**). Abbildung verändert Lit.^[158]

Kende *et al.* konnten dies für die enzymatische Synthese von 1-Aminocyclopropansäure (**144**) auf eine elegante Weise durch Deuterierungsexperimente zeigen (Schema 60). Hier wurde lange Zeit diskutiert, ob die Zyklisierung über die ungesättigte Zwischenstufe **143** in einem 3-endo-trig-Ringschluss abläuft, was durch die Experimente widerlegt wurde, da kein entsprechender D-Verlust an der β -Position des Aminosäureteils stattfand.^[158]

Unter Beachtung der Baldwin-Regeln und Miteinbinden der Px-Domäne, resp. des wahrscheinlichen PMP-Cofaktors (**70**) wurde so eine alternative Hypothese zur Bildung des Ambruticin-Mittelfragments unter Katalyse von AmbF erstellt (Schema 61). Hierbei flossen die Erkenntnisse aus den Biosynthesen der Toblerole (**85**), Cyclizidin (**95**, vgl. Kapitel 1.4) und 1-Aminocyclopropansäure (**144**) mit ein.



Schema 61. Eigene Arbeitshypothese zur Bildung des Ambruticin-Mittelfragments durch AmbF.

Nach der Kettenverlängerung durch das AT-freie Modul, kann davon ausgegangen werden, dass als Cofaktor PMP (70) an den β -Ketothioester **43** bindet (\rightarrow **145**). Eine Möglichkeit wie die Reaktionskaskade den Baldwin-Regeln entsprechen kann, wäre die intermediäre Addition eines Nucleophils (\rightarrow **146**) in einer vinylogenen Michael-artigen Addition an das konjugierte Doppelbindungssystem. Dabei würde ein sp^3 -Zentrum entstehen und nach Enolisierung könnten in einer Favorskii-ähnlichen Elektronenshift-Zyklisierungskaskade beide Dreiringe in einem Schritt durch die favorisierten *3-(enolexo)-exo-trig*-, bzw. *3-exo-tet*-Ringschlüsse gebildet werden (nach Hydrolyse des PMP-Imins \rightarrow **44**). Insbesondere der vermeintliche *3-endo-trig*-Ringschluss könnte als zweistufiger Prozess aus Addition eines Nucleophils und anschließender Eliminierung als Nucleofug erklärt werden.

Auch wenn Carbokationen den Baldwin-Regeln nicht folgen und dieses Argument durchaus für die These von Reeves *et al.* sprechen würde, so bleibt zu beachten, dass die Vitamin B₆-Cofaktoren PLP und PMP hauptsächlich Reaktionen mit Elektronenüberschussverbindungen, wie Carbanionen, katalysieren, indem sie als *electron sink factor* wirken (vgl. Kapitel 1.4). Insbesondere in der chinoiden Form des PMP-Imins **145** sollte dieser Effekt zum Tragen kommen. Da bei AmbF_Px das Lysin im aktiven Zentrum durch Valin ersetzt ist, wäre es möglich, dass der chinoiden Übergangszustand besonders stabilisiert wird, wie es auch von anderen Lysin-Austausch-Mutanten bekannt ist.^[102] Ebenso spricht das gehäufte Auftreten saurer Aminosäuren im aktiven Zentrum dafür, dass der Cofaktor dazu dient ein anionisches, bzw. elektronenreiches Intermediat zu stabilisieren (vgl. Kapitel 3.3.2).

Nach der doppelten Zyklisierung mit dem Polyenshift entlang des konjugierten Doppelbindungssystems bleibt die Ringöffnung des Cyclopropanons unter Umlagerung zur verzweigten Carbonsäure **45**. Es ist möglich, dass die Hydrolasedomäne neben der hydrolytischen Regeneration des Cofaktors auch diese Reaktion maßgeblich katalysiert.

Unter diesen Annahmen könnten die Ungereimtheiten der Reeve'schen Hypothese unter Einbindung der vorhandenen, sequenzbasierten Daten erklärt und gelöst werden.

Für die Durchführung der Versuche bedeutet dies einerseits, dass die Frage nach dem Cofaktor geklärt werden muss. Auf der anderen Seite bedeutet es, dass mit einem enzymologisch-aktiven Substratsurrogat wie dem D-Pantetheinyl- β -ketothioester **96** und den isolierten Domänen H und Px die Cyclopropanierung *in vitro* nachgestellt werden könnte.

Zu beachten ist dabei insbesondere die Vielzahl möglicher Variablen, die Einfluss auf den Erfolg oder Misserfolg der *in vitro*-Versuche haben können. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass sekundäre Effekte, wie die im Experiment fehlende Implementierung der Domänen ins Modul, überwiegen können. Weiter wird der Nachweis intermediärer Reaktionen, wie der Bindung eines Nucleophils, welches im Anschluss als Nucleofug agiert, auf enzymologischen Weg nur schwer zu erbringen sein. Hier lassen sich Hinweise hauptsächlich durch strukturelle und computergestützte Untersuchungen ziehen.

3.3.2 BESTIMMUNG DER DOMÄNENGRENZEN UND BIOINFORMATIK

Da bisher nur wenig Informationen über das Modul AmbF aufgrund Vergleiche mit anderen Proteinen vorhanden sind, wurden insbesondere die Domänen H und Px mit verschiedenen bioinformatischen Internet-basierten Programmen untersucht. Die erhaltenen Informationen sollten hauptsächlich zur Bestimmung der Domänengrenzen genutzt werden.

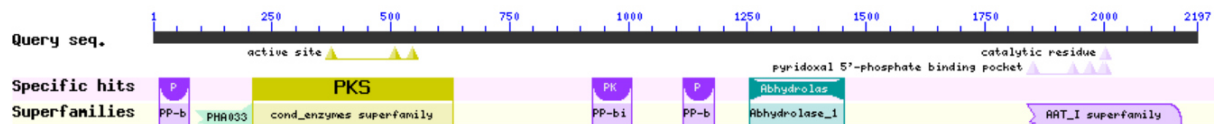


Abbildung 26. Graphische Zusammenfassung der Suche nach konservierten Domänen in AmbF mithilfe der Datenbank des NCBI.^[159,160]

Zuerst wurde der Eintrag von AmbF (ABK32260.1) in der NCBI-Datenbank für konservierte Domänen (CDD) auf möglicherweise neu in die Datenbank eingepflegte Domärentypen hin untersucht.^[159,160] Dabei wurden die bereits im AmbF-Eintrag annotierten Domänen (ACP1 – 3, KS, α/β -Hydrolase und Px-Domäne aus der Aspartataminotransferase (AAT)-Überfamilie) wiedergefunden (Abbildung 26). Neu eingepflegte Sequenzen bzw. Domärentypen wurden hingegen nicht zugeordnet.

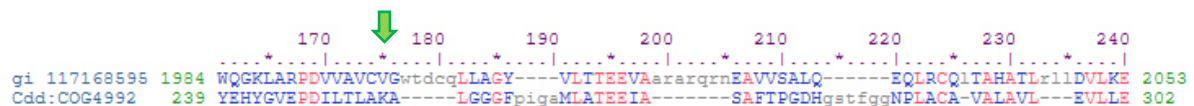


Abbildung 27. Ausschnitt aus dem Vergleich des CDD-Referenzproteins COG4992 mit der AmbF_Px-Domäne (oben). Konservierte Reste die sich in AmbF_Px wiederfinden sind rot, das – fehlende – Lysin im aktiven Zentrum mit einem grünen Pfeil gekennzeichnet.

Obwohl viele der konservierten Reste (Abbildung 27, rot), die sich im Referenzprotein wiederfinden, vorhanden sind, trägt AmbF_Px an der eigentlich am stärksten konservierten Stelle statt eines Lysins ein Valin, welches durch seine unfunktionalisierte Seitenkette nicht in der Lage ist aktiv, in einen katalytischen Zyklus mit PLP einzugreifen.^[159,160] Wie bereits diskutiert ist es wahrscheinlich, dass die Aminotransferaseaktivität entsprechend deutlich verringert ist. Auf der anderen Seite untermauert es die These eines PMP-abhängigen chinoiden Übergangszustands, welcher von anderen Lysin-Austauschmutanten besonders stabilisiert wird.^[102]

Zusätzlich zu den Vergleichen auf Sequenzebene wurden für die H- und Px-Domäne Strukturhomologiemodelle mit dem PHYRE²-Algorithmus erstellt, welche in einem gewissen Rahmen Vorhersagen über die Struktur der Proteine zulassen.^[161] Dabei sollte beachtet werden, dass insbesondere bei ungewöhnlichen Proteinen, wie der Px-Domäne, mit potentiell ungewöhnlicher Struktur fehlende Vergleichsstrukturen stark ins Gewicht fallen können. Aus diesem Grund ist es nicht möglich mit einem Homologiemodell eine ähnliche Informationsdichte und Aussagekraft wie durch eine Röntgenkristallstruktur zu erzielen. Es ist aber gut als Ansatzpunkt für das Setzen von Domänengrenzen geeignet. Dies wird durch die Möglichkeit auf voll ausgeprägte Sekundärstrukturen und Strukturelementen aus Vergleichsstrukturen und den Berechnungen zu achten gewährleistet.

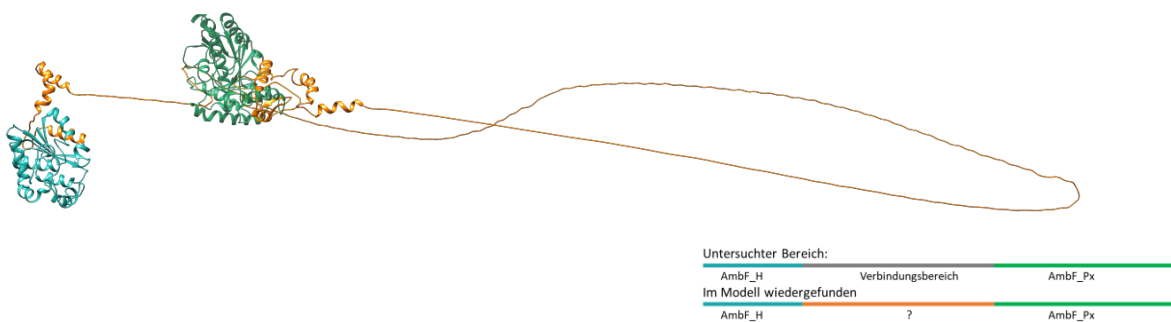


Abbildung 28. Strukturhomologiemodell der AmbF_HP_X-Didomäne. Die AmbF_H- (blau) und Px-Domäne (grün) nach Reeves *et al.* werden durch einen großen Bereich mit z. T. nicht-zugeordneter Struktur (orange) verbunden. Erstellt mit PHYRE² und visualisiert mit UCSF CHIMERA.^[161,162]

Das Modell der AmbF_HP_X-Didomäne zeigte einen größtenteils nicht zugeordneten Bereich zwischen den Domänengrenzen (Abbildung 28, orange). Größere Zwischenabschnitte zwischen zwei Domänen sind zwar keine Seltenheit bei modularen PKS, sollten hier jedoch funktionelle Einheiten vorhanden sein, so fehlen diese bei Verwendung der Einzeldomänen, wie sie in der NCBI-Datenbank (NCBI: ABK32260) hinterlegt sind.^[56,163] Während die H-Domäne bereits bei den ersten Versuchen eine gute Löslichkeit zeigte, war dies für die Px-Domäne nicht der Fall.^[164] Dies kann u. a. auf falsche Domänengrenzen hindeuten. Darum wurde davon ausgegangen, dass ein Teil der eigentlichen Px-Domäne oder eine sonstige funktionelle Einheit zwischen AmbF_H und AmbF_Px liegt. Das Fehlen dieses Teils kann die korrekte Ausbildung der nativen Form behindern und damit die Aggregation des Proteins begünstigen.

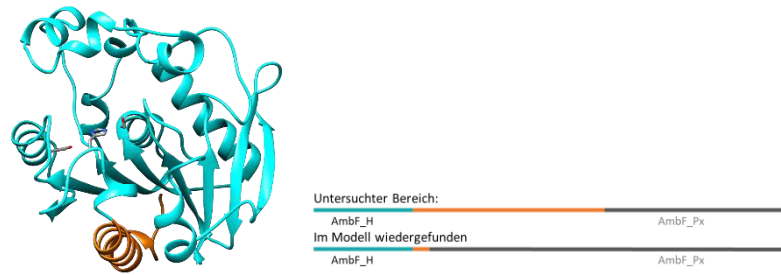


Abbildung 29. Strukturhomologiemodell der Domäne AmbF_H mit der eingezeichneten katalytischen Triade. Der Teil, der in den Verbindungsbereich ragt ist orange gekennzeichnet. Erstellt mit PHYRE² und visualisiert mit UCSF CHIMERA.^[161,162]

Die Hydrolasedomäne AmbF_H ließ sich mit 98% Abdeckung bei >90% Zuverlässigkeit gut an die in den Datenbanken vorhandenen Strukturen angleichen (Abbildung 29). Obwohl die Abdeckung hoch war, wurde aber nur ein kleiner Teil des Verbindungsbereichs der H-Domäne zugeordnet. Im Vergleich zu anderen Hydrolasen scheint also bei der in der Datenbank hinterlegten Sequenz noch ein kurzer Teil des C-Terminus gefehlt zu haben. Ein Umstand dem auch bereits bei der vorherigen Bestimmung der Domänengrenzen in unserer Arbeitsgruppe Rechnung getragen wurde.^[164]

UniProt	100	118	...	200	209	237
[AmbF_H]	V E G V R Q S L G L S S V L V G Y S F G			P T L I V A G A E D R Y V P T I H A E R L A R N P N A T L H I V E S A G H F L G		
<i>Chitinophaga pinensis</i> C7PTU6	M Y K L D N E T K L D S Y D V L G W S D G			P V L V M A C E H D V I K E A H T R L I A A S I P G A E L V I I K N A S H Y A P		
<i>Nostoc punctiforme</i> B21ZH4	V A A L I N H L A I D K V H L V G H S M G			P T L V L V C K Q D I L T P L K F S Q Q L A Q S I E N A E L V V L E G G G H C E L		
<i>Caldanaerobacter subterraneus</i> Q8RC86	T A A L V A E L G F K K V H V L G V S M G			P T L I M A C K D D K W V P Y E N A L L L H S K I E N S E T E L F S N A G H M F F		
Archaeon GZfos32E7 Q64AD0	I E A L F Q K E I R Q A H L L G F S M G			P T L I I S R E D I F T P L A I S E Q I H Q S I H S S Q W K I L E G V G H N L Y		

Abbildung 30. Ausschnitt des Sequenzvergleichs der AmbF_H-Domäne und den ersten vier Vergleichssequenzen. Die hoch konservierten Reste der katalytischen Triade (S118, D209, H237) sind rot gekennzeichnet. Erstellt mit PHYRE².^[161]

Die katalytische Triade, die im Modell gut zu erkennen ist, findet sich auch an den typischen, konservierten Stellen in der Sequenz wieder, wie ein Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich von PHYRE² zeigt (Abbildung 30). Entsprechend der nucleophilen Aminosäure in der Triade kann AmbF_H den Serinhydrolasen zugeordnet werden.

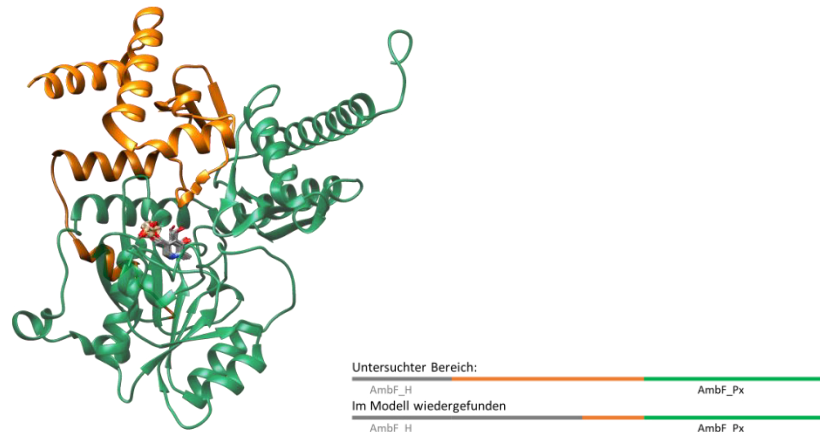


Abbildung 31. Strukturhomologiemodell der Domäne AmbF_Px mit erweitertem *N*-Terminus (orange) und PLP als Cofaktor im Zentrum. Erstellt mit PHYRE² und 3DLIGANDSITE, dargestellt mit UCSF CHIMERA.^[161,162,165]

In der PHYRE²-Analyse der Sequenz des Endes von AmbF_H (1454) bis zum Ende des Moduls (2197) finden sich durch Vergleich zu den besten Strukturhomologen andere Domänengrenzen als bei Julien *et al* (Abbildung 31).^[163] Diese reichen 120 Aminosäuren weiter in den Verbindungsbereich (Position in AmbF: 1719 – 2167). Gegenüber den Grenzen von Dr. Hemmerling ist der *N*-Terminus um 44 Aminosäuren länger.^[164]

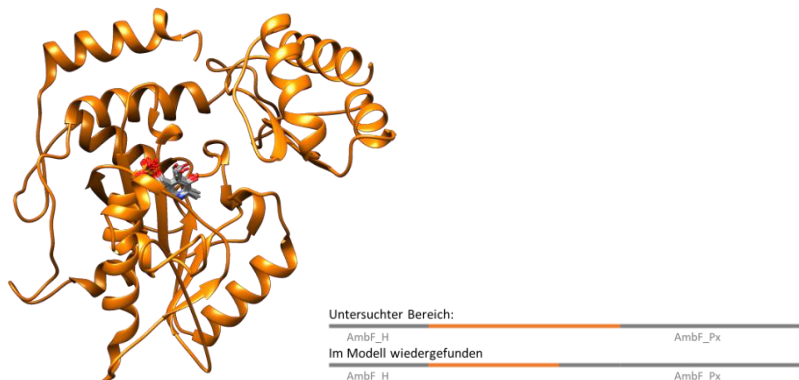


Abbildung 32. Strukturhomologiemodell des Verbindungsbereichs von AmbF_H und _Px mit PLP als Cofaktor im Zentrum. Erstellt mit PHYRE² und 3DLIGANDSITE, dargestellt mit UCSF CHIMERA.^[161,162,165]

Da der Verbindungsbereich keiner der bisherigen Strukturen zugeordnet werden konnte, wurde dieser mittels PHYRE² gesondert untersucht. Dabei fand sich eine kleine (Sub)Domäne (230 aa, 1472 – 1701), die den Aminotransferasen zugeordnet wurde (Abbildung 32). Als Cofaktor wurde von dem Programm 3DLIGANDSITE PLP bestimmt.^[165] Es bleibt aber weiter unklar, welche Rolle dieser Proteinabschnitt spielt. Vermutlich ist dieser Bereich die *small domain* wie oft in Aminotransferasen zu finden.^[98]

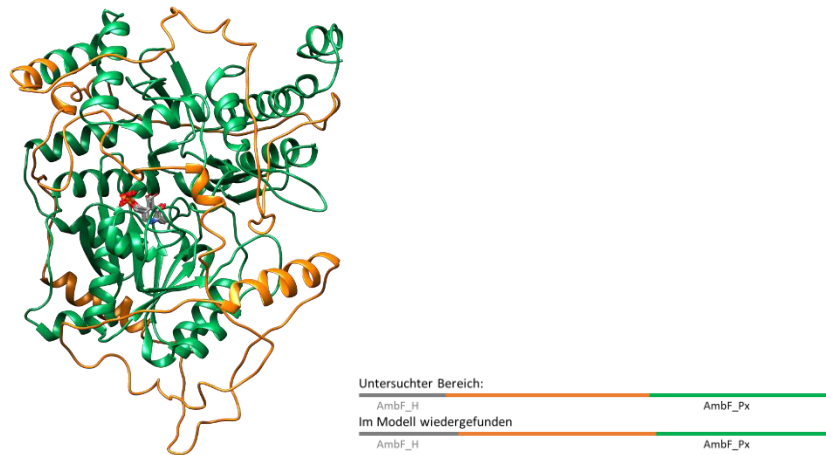


Abbildung 33. Modell des Verbindungsbereichs und AmbF_Px. Erstellt mit PHYRE² und 3DLIGANDSITE, visualisiert mit USCF CHIMERA.^[161,162,165]

Ein gemeinsames Modell war nur unter Verwendung des *intensive*-Modus möglich, der aber auch sehr fehleranfällig ist, da er sich im Gegensatz zum *normal*-Modus nicht auf bekannte Strukturen beschränkt. Entsprechend niedrig ist auch die Verlässlichkeit bei der Vorhersage der Tertiärstruktur. In dem Modell ist die Px-Domäne (Abbildung 33, grün) zentral von dem Verbindungsbereich (orange) eingehüllt. Dieser konnte nur mit einer geringen Zuverlässigkeit modelliert werden. Gemäß den Berechnungen scheint der orange Bereich mit der Px-Domäne zu interagieren oder eigentlich Teil dieser zu sein, so dass es lohnend erscheint das entsprechende Fusionsprotein zu untersuchen.

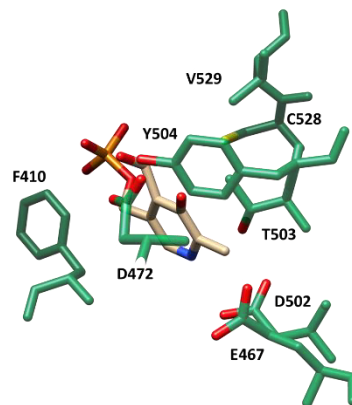


Abbildung 34. Modell des aktiven Zentrums von AmbF_Px. Erstellt mit PHYRE² und 3DLIGANDSITE, visualisiert mit USCF CHIMERA.^[161,162,165]

Der Blick auf das PLP-Bindungszentrum, wie es von 3DLIGANDSITE bestimmt wurde, offenbart charakteristische Aminosäuren der PLP-Bindungsstelle wie den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin, welche für ein π -stacking mit dem Pyridinring verantwortlich sind, den sauren Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure in Position 467, resp. 502 welche über Säure-Base-Wechselwirkungen mit dem Stickstoff des Pyridins interagieren und Threonin in Position 503, welches gewöhnlich eine H-Brücke zum Phosphat des PLPs oder zur Carboxylgruppe des Aminosäuresubstrats bildet (Abbildung 34).^[109,166] Auffällig sind die Asparaginsäure in Position 467 und Glutaminsäure in Position 472, welche möglicherweise für eine Stabilisierung des primären Amins PMP sorgen. Das im Vergleich zu anderen Aminotransferasen erhöhte Vorkommen saurer Aminosäuren im aktiven Zentrum spricht dafür, dass der Cofaktor insbesondere als *electron sink factor* fungiert, da dies durch die Protonierung des Pyridinstickstoffs erheblich bevorzugt wird.^[107] Am augenfälligsten ist natürlich das Fehlen von Lysin in Position 529, welches gewöhnlich das PLP kovalent bindet und in diesem Fall stattdessen durch die unreaktive Aminosäure Valin ersetzt ist. Die Aminosäuren die sich für gewöhnlich so nicht in Aminotransferasen finden, sind jeweils in Regionen mit niedriggeordneter Tertiärstruktur, was insofern Sinn ergibt, als dass hier am häufigsten Mutationen vorkommen können. Dies liegt daran, dass die Struktur so nur geringfügig verändert wird.^[98,104] Dadurch ist es evolutionär eventuell vereinfacht worden die Aktivität einer Aminotransferase so zu modulieren, dass sie nunmehr für eine untypische Biotransformation verwendet werden kann.

Die nur bedingt belastbaren Ergebnisse der Strukturhomologiemodelle wurden zusätzlich durch Sequenzvergleiche mittels BLAST+ des *European Bioinformatics Institute* gestützt.^[167] Hier wurden unter den ersten Treffern ausschließlich untypische PLP-/PMP-abhängige Proteine gefunden. So neben einem sehr ähnlichen Protein aus einem anderen, nicht näher definierten *S. cellulosum*-Stamm, Enzyme bzw. Domänen aus *Pseudomonas* spp. mit Serin statt Lysin im aktiven Zentrum und zusätzlich Sequenzen aus methylo trophen Bakterien mit Threonin anstelle des Lysins. Zu diesen gehört unter anderem TobE_Px (UniProt C5B3B9), welches maßgeblich an der Bildung der Toblerole (**85**) beteiligt ist.^[108] All diese Proteine sind scheinbar Domänen aus PKS(/NRPS?)-Modulen die mindestens auch eine α,β -Hydrolase und bei den methylo trophen Organismen eine Flavin-abhängige Monooxygenase beinhalten. Bei Verwendung der „Reeves-Sequenz“ wurden hingegen nur übliche Aminotransferasen, also solche die

Transaminierungen katalysieren, gefunden. Dies spricht ebenfalls dafür, dass es sich lohnen sollte in den künftigen Versuchen die erweiterte Domäne zu verwenden. Es ist in der Tat sogar wahrscheinlich, dass es sich hier um die Kombination der *large domain* und der *small domain* handelt, wie es in vielen Typ I Aminotransferasen der Fall ist. Dann wäre der erweiterte *N*-Terminus für die Aktivität und Stabilität nicht nur förderlich, sondern essentiell.^[98,168]

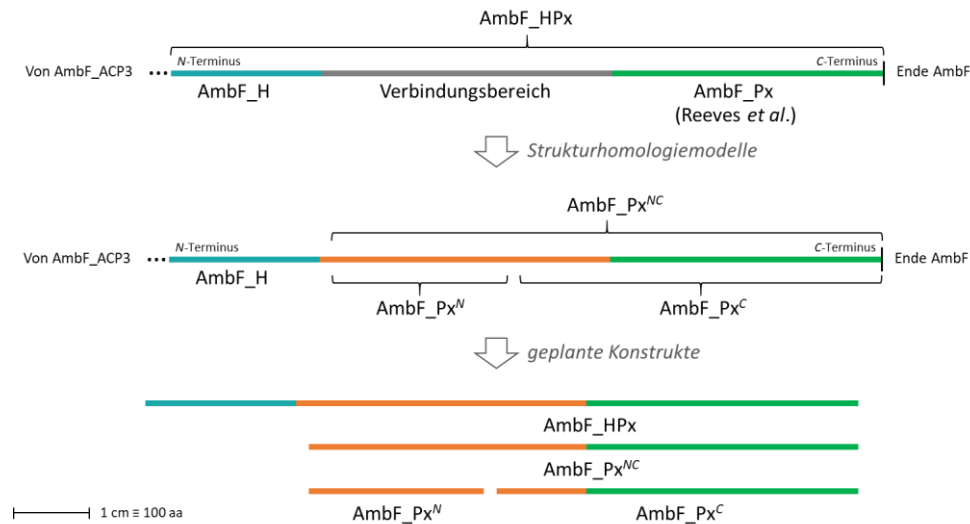


Abbildung 35. Schematische Darstellung der Findung und Planung der Konstrukte in dieser Arbeit.

Im Folgenden wird die *N*-terminale AmbF_Px-(Sub)Domäne als AmbF_Px^N (1471 – 1701) und der revidierte *C*-terminale Part als AmbF_Px^C (1719 – 2167) bezeichnet, das Fusionsprotein entsprechend AmbF_Px^{NC} (1471 – 2167, Abbildung 35). Die Benennung AmbF_Px wurde für das vorher von F. Hemmerling verwendete Konstrukt beibehalten.

Für die praktischen Arbeiten war neben der AmbF_HP_x-Didomäne auch die (Sub)Domänen AmbF_Px^N und AmbF_Px^C sowie das Fusionsprotein AmbF_Px^{NC} geplant.

3.3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN

Das Ziel der molekularbiologischen Arbeiten war die Gewinnung der AmbF-Domänen bzw. Didomänen denen eine maßgebliche Rolle am Ringschluss zugesprochen wird.

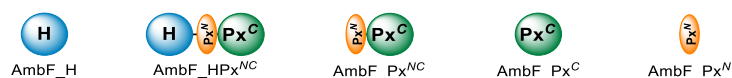


Abbildung 36. Zielproteine aus dem Modul AmbF. Die Benennung erfolgt nach dem in 3.3.2 eingeführten System.

Im Einzelnen sind das die Hydrolasedomäne AmbF_H und die PLP-/PMP-abhängige Px-Domäne. Nach Möglichkeiten sollten die Domänen getrennt sowie als Fusionsprotein heterolog in *E. coli* produziert werden (Abbildung 36). Die Px-Domäne AmbF_Px wurde im Zuge der bioinformatischen Arbeiten mit neuen Domänengrenzen in einen N- und einen C-terminalen Part geteilt (vgl. Kapitel 3.3.2). Diese (Sub)Domänen sollten ebenfalls einzeln bzw. fusioniert hergestellt werden. Dafür mussten die Genabschnitte von einem passenden Templat amplifiziert und in Expressionsvektoren kloniert werden. Die Vektorplasmide sollten dann für die heterologe Proteinproduktion in *E. coli* dienen.

PCR und Klonierungsarbeiten

Die Konstrukte aus *ambF_HP_x*, *ambF_H* und *ambF_Px* (ähnlich Reeves *et al.*) und dem pET28a(+)-Expressionsvektor waren durch die Vorarbeiten von Dr. Franziska Hemmerling bereits im Arbeitskreis vorhanden.^[164]

Für die Amplifizierung mittels PCR und spätere Klonierung von *ambF_Px^N*, *ambF_Px^{NC}* und *ambF_Px^C* wurde das Plasmid pET28a(+)-*ambF_HP_x* als Templat verwendet.

Die Polymerasekettenreaktion diente der Vervielfältigung eines gewünschten Genabschnitts aus einer kleinen Ausgangsmenge Templat-DNA. Die DNA wurde dabei in einem ersten Schritt in die Einzelstränge geteilt (Denaturierung). Benötigt wurden dann Oligonukleotide die über eine möglichst spezifische Erkennungssequenz komplementär an diese binden können (Hybridisierung) und den zu amplifizierenden Teil von der restlichen DNA des Templats abgrenzen. Ebenfalls wurden Nukleotide (dNTPs) mit denen die thermophile DNA-Polymerase einen neuen DNA-Strang ausgehend vom Oligonukleotid aufbauen konnte bedarf (Elongation). Der neue Strang dient im neuen Zyklus wieder als Templat, so dass die Ausbeute mit jedem Zyklus exponentiell ansteigt.

Um die Genabschnitte für die Klonierungsarbeiten aus dem pET28a(+)-*ambF_HP_x*-Plasmid zu erhalten, wurde die PCR mit der sehr genauen PHUSION™ HIGH FIDELITY-DNA-Polymerase von ThermoFischer® Scientific durchgeführt. Als effektive Hybridisierungstemperaturen erwiesen sich die Mittelwerte aus den Schmelzpunkten der beiden verwendeten Oligonukleotide. Alle verwendeten Oligonukleotide trugen auch die Sequenzen für die Schnittstellen

der später verwendeten Restriktionsenzyme NdeI und EcoRI. Die Elongationszeiten richten sich nach der Länge des zu amplifizierenden Abschnitts.

Tabelle 5. Parameter der PCR-Reaktion. Verwendet wurde die PHUSION™ HIGH FIDELITY-DNA-Polymerase (0.02 U/μL) in GC-Puffer, dNTPs (je 200 μM) und die jeweiligen Primer (0.5 μM). Als Templat diente pET28a(+)_ambF_HPx.

Amplifikat	Größe [kpb]	T _{Hybridisierung} [°C]	t _{Elongation} [s]	Zyklen [1]
<i>ambF_Px^N</i>	0.7	70	26	35
<i>ambF_Px^{NC}</i>	2.2	69	80	35
<i>ambF_Px^C</i>	1.5	66	55	35

Die PCR wurde entsprechend der in Tabelle 5 angegebenen Parametern durchgeführt. Die Amplifikate wurden mit dem NUCLEOSPIN™ GEL AND PCR CLEAN-UP-Kit (*Macherey-Nagel*) nach Herstellerangaben gereinigt um Nukleotide, Templat-DNA und Polymerasen zu entfernen.

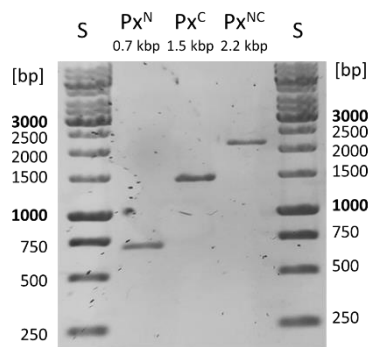


Abbildung 37. Agarosegel (1%, gefärbt mit Midori Green) der PCR-Produkte *ambF_Px^N* (718 bp), *ambF_Px^C* (1489 bp) und *ambF_Px^{NC}* (2206 bp). M = Molekulargewichtsstandard.

Mittels Agarosegelelektrophorese wurde die Homogenität der Amplifikate überprüft. Die Detektion erfolgte durch In-Gel-Färbung mit 0.5 Vol.-% MIDORI GREEN ADVANCE (*Nippon Genetics*), einem Farbstoff der als DNA-Komplex bei Anregung mit UV-Licht grün fluoresziert. Alle Produkte zeigten sich dabei als einzelne, homogene Bande (Abbildung 37).

Die Restriktion, die dazu diente passende Enden zwischen den Amplifikaten und dem Leervektor zu schaffen, wurde entsprechend der eingefügten Schnittstellen mit den beiden Restriktionsendonukleasen NdeI und EcoRI durchgeführt. Zusätzlich wurden die PCR-Produkte mit DpnI umgesetzt, welches methylierte DNA spaltet. Damit werden Reste der *E.*

coli isolierten Templat-DNA gespalten, während die nicht-methylierten PCR-Amplifikate nicht umgesetzt werden. Dadurch sollten falsch-positive Klone vermieden werden.

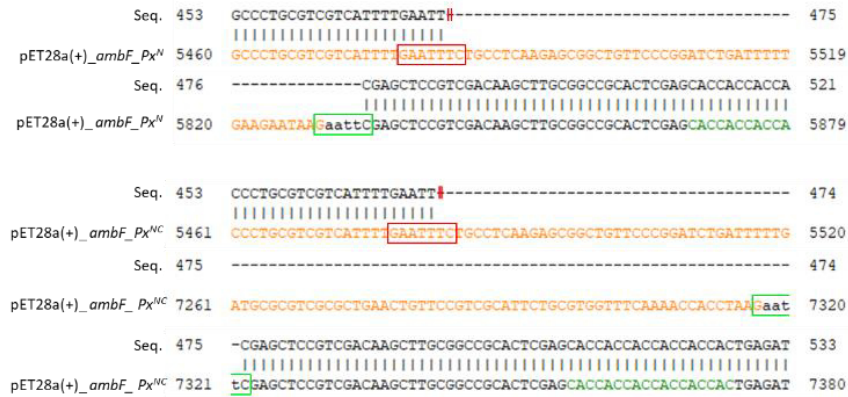


Abbildung 38. Sequenzierungsergebnisse (Seq.) von pET28a(+)_ambF_Px^N (oben) und pET28a(+)_ambF_Px^{NC} (unten) bei jeweils 30 min Restriktionsdauer. In beiden Fällen wurden die Gene an der codierenden Stelle GAATTC (roter Kasten, bzw. Markierung) anstatt der geplanten EcoRI-Restriktionsschnittstelle GAATTC (grüner Kasten) geschnitten.

Bei einer Reaktionszeit von 30 min wurden die Gene *ambF_Px^{NC}* und *ambF_Px^N* statt wie gewünscht an der Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRI (GAATTC, Abbildung 38, grüne Markierung) auch an der Zielgen-codierenden Sequenz GAATTC (Abbildung 38, rot) gespalten. Bei Verkürzung auf 15 min trat diese Nebenreaktion nicht mehr auf.

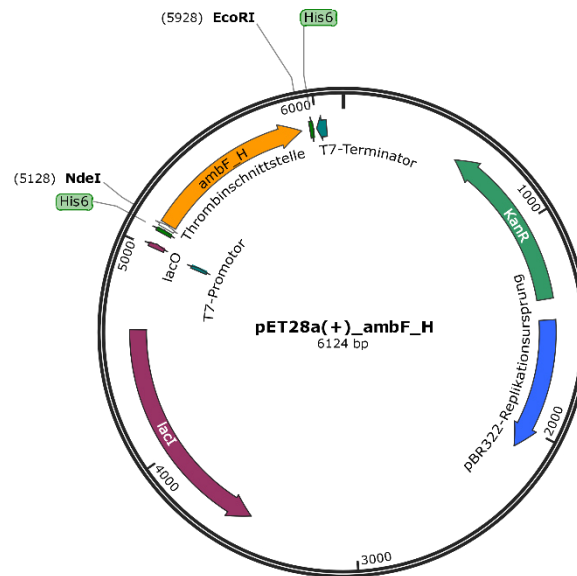


Abbildung 39. Darstellung des Plasmids pET28a(+)_ambF_H als Vektorkarte. Erstellt mit SnapGene® Viewer (GSL Biotech) und Serial Cloner (Serial Basics).

Die amplifizierten Gene wurden in den pET28a(+)-Vektor kloniert. Dieser zählt zu den Expressionsplasmiden und ist also für die heterologe Genexpression in *E. coli* optimiert (Abbildung 39). Die pET28a(+)-Vektorplasmide erlaubten es die Gene in *E. coli* zu transformieren und durch eine damit gleichzeitig eingebrachte Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin (Kan^R) die Klone zu selektieren. Durch den speziellen Replikationsursprung aus dem pBR322-Plasmid konnte der Vektor mit einer hohen Replikationszahl in *E. coli* vervielfältigt werden. Die Ligation der geschnittenen Amplifikate und des Leervektors wurden mit der T4-Ligase durchgeführt. Nach mehreren Versuchen wurde das Verhältnis von 1:7 bei 8 °C für 15 h verwendet.

Nach der Transformation in chemisch-kompetente Zellen des Klonierungsstamms *E. coli* OneShot™ Top10 wurden die Kolonien durch Kolonie-PCR auf die Anwesenheit der Gene hin untersucht. Dabei wurden kleine Mengen des Zellmaterials in einer Test-PCR mit T7-Primern (s. Tabelle 12) eingesetzt und nach einem thermischen Aufschluss mit der Taq-DNA-Polymerase vervielfacht. Positiv getestete Kolonien wurden anschließend weiter angezüchtet und für die Plasmidisolierung verwendet. Die erhaltenen Plasmide wurden mittels Kit gereinigt und der erfolgte Einbau der Zielgene durch Testrestriktion verifiziert. Durch Isolierung aus den jeweiligen Top10™-Zellen konnten die Plasmide der Gene *ambF_Px^N*, *ambF_Px^{NC}* und

ambF_Px^C im Expressionsvektor pET28a(+) für die spätere Verwendung im Rahmen der heterologen Expression erhalten werden. Die Identität wurde mittels Sequenzierung bestätigt.

Heterologe Proteinproduktion ausgewählter AmbF-Domänen

Allgemeine Beschreibung

Die Genexpression und damit Proteinbiosynthese wurde durch Induktion des Lactose-abhängigen T7-Expressionssystems mit dem nicht-metabolisierbaren Lactosemimetikum IPTG gestartet. So sollte das gewünschte Protein sehr selektiv in großen Mengen produziert werden, da nur der Genabschnitt zwischen dem T7-Promotor und -Terminator von der spezifischen und sehr aktiven T7-RNA-Polymerase transkribiert wird. Die Expression der zelleigenen Gene wird derweil stark gemindert. Durch die Verwendung des pET28a(+)-Vektors konnte ein *N*-terminaler Hexahistidin (His₆)-Tag an das Protein angebracht werden. Dieser sollte die verhältnismäßig einfache Reinigung des Zielproteins durch Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie an einem Ni²⁺-beladenen Säulenmaterial ermöglichen.

Für die heterologe Genexpression wurden die jeweiligen pET28a(+)-Plasmide üblicherweise in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) durch Transformation in chemisch-kompetente Zellen eingebracht. Die Selektion erfolgte durch Inkubation auf Kanamycin-haltigen 2TY-Nährböden. Die Kulturen zur Proteinproduktion wurden bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,4 – 0,8 in 2TY-Flüssignährmedium inkubiert und die Genexpression mit einer variablen Menge IPTG induziert. Nach Inkubation bei 15 – 30 °C für 4 – 48 h wurde die Suspension zentrifugiert und die Zellen in FPLC-Waschpuffer mit 0,1 mM des Proteaseinhibitors PMSF mit Ultraschall aufgeschlossen. Anschließend wurden Lysat und Zelldebris durch Zentrifugation getrennt. Der Überstand wurde für die Reinigung im (semi)präparativen Maßstab verwendet. Reinigungen mittels IMAC wurden unter nativen Bedingungen durchgeführt und Imidazol-haltige Eluate im Anschluss durch Gelfiltration und gegebenenfalls Konzentration behandelt, um die gebrauchsfertigen Proteinlösungen zu erhalten. Die Analytik der Proteinfraktionen, des rohen Zelllysats und Debrisrückstands erfolgte mit SDS-PAGE. Die Identität der Zielproteine wurde durch Protein-MS/MS nach tryptischen Verdau bestätigt.

AmbF_H

Im Rahmen der Enzymaktivitätstests war das erste Ziel eine enzymkatalysierte Reaktion nachzuweisen. Darum sollten die Arbeiten zuerst mit der HPx-Domäne und der Px-Domäne durchgeführt werden. Der H-Domäne, von der auszugehen ist, dass sie erst die nachfolgenden Hydrolysereaktionen katalysiert, wurde entsprechend eine nachrangige Priorität zugeordnet. Im Rahmen einer Kooperation wurde AmbF_H aber für strukturelle Untersuchungen von Dr. Christopher D. Fage (University of Warwick, UK) verwendet. Sie konnte kristallin in ihrer nativen Form und als Selenomethioninderivat erhalten werden. Von letzterem gelang es am Synchrotron der DIAMOND LIGHT SOURCE eine Röntgenkristallstruktur aufzunehmen. Da die Rechte auf die, bislang unpublizierten, Ergebnisse bei Dr. Fage liegen, können die Struktur und die Bedingungen der Experimente zum Zeitpunkt dieser Dissertation hier nicht wiedergegeben werden.

AmbF_Px nach Lit.^[164]

Der erste Versuch zur Expression von *ambF_Px* wurde nach dem allgemeinen Vorgehen im Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Die Expression wurde mit 0.5 mM IPTG gestartet und die Zellen bei 16 °C für 17.5 h inkubiert. Nach Aufschluss der sedimentierten Zellen wurde das Lysat durch Ni-NTA-FPLC mit einem Imidazolgradienten von 0 – 250 mM gereinigt.

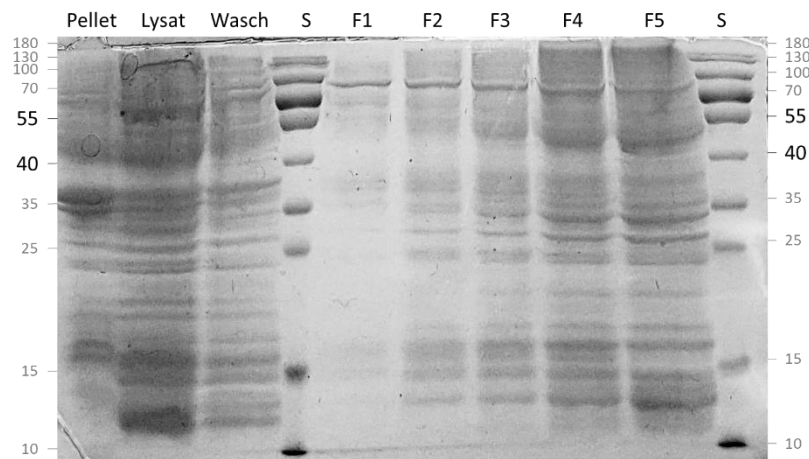


Abbildung 40. SDS-PAGE (12%, gefärbt mit Coomassie Blue R-250) des Versuchs zur Expression von *ambF_Px* (*E. coli* BL21(DE3), 0.5 mM IPTG, 16 °C, 17.5 h). S = Molekulargewichtsstandard, Pellet = sedimentiertes Zelldebris, Lysat = Überstand nach Zellaufschluss, FX = Fraktion nach Ni-NTA-FPLC. M(AmbF_Px) = 50 kDa.

Das Ergebnis unterscheidet sich kaum von den Vortests durch Dr. Hemmerling.^[164] Bei der SDS-PAGE lag eine der stärkeren Bande zwischen dem Bereich 40 – 55 kDa (Abbildung 40). Dieses Protein schien sich bei der IMAC nur wenig angereichert zu haben, zeigte sich in F4 und F5 allerdings als dominierende Bande. Sollte es sich bei diesem Protein um AmbF_Px gehandelt haben, dann war dieses allerdings so stark verunreinigt, dass man in den Enzymaktivitätstests bestenfalls auf eine geringe Aktivität hätte hoffen können.

Da die Möglichkeit bestand, dass sich das Protein unlöslich als Einschlusskörper im Zelldebris befand, wurde mit derselben Zellcharge eine Solubilisierung durch Denaturierung und Rückfaltung versucht. Dafür wurde das Sediment nach Zellaufschluss gewaschen und dann in Denaturierungspuffer inkubiert. Der Überstand, in dem sich das jetzt lösliche, denaturierte AmbF_Px befinden sollte, wurde dialysiert, um durch die langsam absinkende Harnstoffkonzentration die Rückfaltung zum nativen Protein zu initiieren.

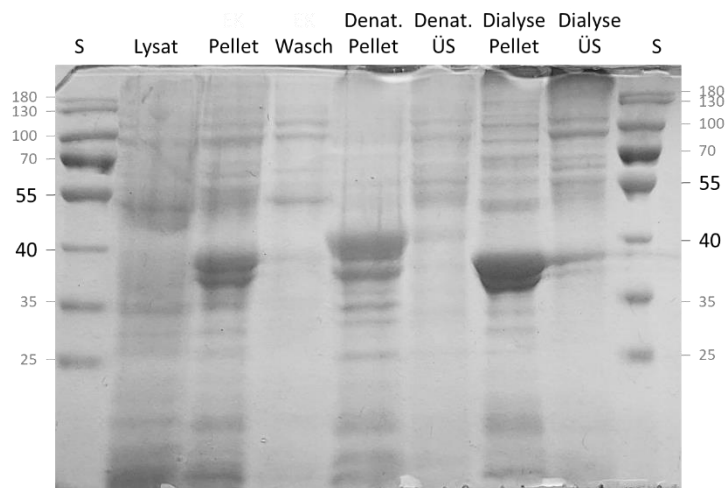


Abbildung 41. SDS-PAGE (12%, Coomassie Blue R-250) des Rückfaltungsexperiments mit AmbF_Px. S = Molekulargewichtsstandard. Lysat = Lysat nach Zellaufschluss (verworfen), Pellet = sedimentiertes Zelldebris, Wasch = Überstand nach dem Waschschrift des Pellets, Denat. Pellet = unlösliche Bestandteile des Zelldebris nach Denaturierung, Denat. ÜS = Überstand nach Denaturierung des Zelldebris, Dialyse Pellet = unlösliche Bestandteile nach Dialyse, Dialyse ÜS = Überstand nach Dialyse. $M(\text{AmbF_Px}) = 50 \text{ kDa}$.

Bereits im Pellet war keine stärkere Bande im Bereich um 50 kDa sichtbar, sodass es unwahrscheinlich war durch Denaturierung und Rückfaltung lösliches AmbF_Px erhalten zu können, was sich durch die fehlende Band im Überstand nach der Renaturierung bestätigte (Abbildung 41). Eine Verbesserung könnte möglicherweise durch die Verwendung eines

PLP/PMP-haltigen Rückfaltungspuffers oder einer gezielten Produktion von AmbF_Px als Einschlusskörper erreicht werden. Jedoch wurde dies wegen der wenig vielversprechenden Vorergebnisse nicht weiter verfolgt.^[169]

Eine andere Möglichkeit die Löslichkeit von heterolog hergestellten Proteinen zu erhöhen ist die Coexpression mit Chaperonen. Diese können *in vivo* die korrekte Faltung von Proteinen unterstützen.^[170]

Tabelle 6. Verwendete Plasmide der Firma *TAKARA Bio Inc.* und die darauf codierten Chaperone, deren Molekulargewichte und die benötigten Induktoren.

Plasmid	GroEL [60 kDa]	GroES [10 kDa]	DnaK [70 kDa]	DnaJ [40 kDa]	GrpE [56 kDa]	Tig [22 kDa]	Induktion
pG-KJE8	✓	✓	✓	✓	✓	✗	L-Arabinose, Tetracyclin
pG-Tf2	✓	✓	✗	✗	✗	✓	L-Arabinose
pKEJ7	✗	✗	✓	✓	✓	✗	L-Arabinose

Die Plasmide der Firma *TAKARA Bio Inc.* bieten eine Auswahl möglicher Kombinationen gut etablierter Chaperone. Um alle zur Verfügung stehenden Chaperone zu testen, wurden die drei Plasmide pKJE8 (*groEL-groES-dnaK-dnaJ-grpE*), pG-Tf2 (*groEL-groES-tig*) und pG-KEJ7 (*dnaK-dnaJ-grpE*) verwendet (Tabelle 6).

Eine hohe Transformationseffizienz sollte dadurch erreicht werden, dass *E. coli* BL21(DE)-Zellen, die bereits das pET28a(+)_{ambF_Px} trugen, durch die Behandlung mit einem CaCl₂-haltigen Puffer bei tiefen Temperaturen erneut in ihre chemisch-kompetente Form überführt wurden. In diese konnte dann das jeweilige Chaperonplasmid eingebracht werden. Da diese die Gene für eine Resistenz für Chloramphenicol tragen, konnte auf Kanamycin- und Chloramphenicol-haltigen Nährböden selektiert werden.

Die Expression der Chaperone wurde bereits ab Ansetzen der Kulturen durch Zugabe von L-Arabinose (bei pG-Tf2 und pKJE7), bzw. zusätzlich Tetracyclin (pG-KEJ8) induziert. Anschließend wurde die Expression von *ambF_Px* mit final 0.1 mM IPTG gestartet. Es wurde wie üblich mit den Kulturen verfahren und die Lysate mittels Ni-NTA-FPLC gereinigt. Die

Fractionen mit den höchsten UV-Absorptionen wurden jeweils vereinigt und durch Gel-filtration in einen Imidazol-freien Puffer überführt.

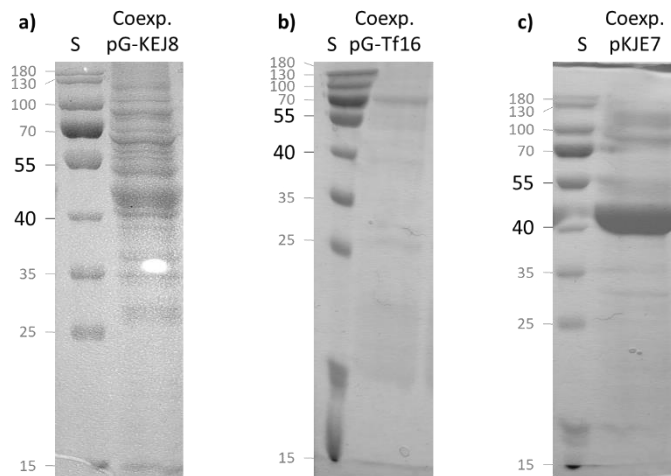


Abbildung 42. SDS-PAGE (12%, Coomassie Blue R-250, gleiche Probenvolumina) der vereinigten FPLC-Fractionen nach der Coexpression von *ambF_Px* und den Chaperonen (*E. coli* BL21(DE3), 2.5 ng/mL Tet [nur pG-KEJ8], 500 µg/mL Ara, 0.1 mM IPTG, 16 °C, 20 h). **a)** Coexpression mit pG-KEJ8, **b)** Coexpression mit pG-Tf2, **c)** Coexpression mit pKJE7, S = Molekulargewichtsstandard. M(AmbF_Px) = 50 kDa, M(GroEL) = 60 kDa, M(GroES) = 10 kDa, M(DnaK) = 70 kDa, M(DnaJ) = 40 kDa, M(GrpE) = 56 kDa, M(Tig) = 22 kDa.

Nur bei Coexpression von *ambF_Px* mit den Chaperonen der Plasmide pG-KEJ8 und pKJE7 zeigte die SDS-PAGE eine Bande im Bereich zwischen 40 und 55 kDa, die sich aber nur bei pKJE7 homogen darstellte (Abbildung 42).

Um die Identität zu überprüfen wurde die Gelbande ausgeschnitten und nach einem tryptischen Verdau mittels Protein-MS/MS untersucht.

Tabelle 7. Ergebnis der Protein-MS/MS-Messung des Coexpressionsversuchs von *ambF_Px* und pKJE7.

Rang	Name	Intensität [1]	Spektren	Anzahl spez. Peptide	Abdeckung [%]
1	DnaJ	102847445	685	88	73
2	AmbF_Px	1039813	40	22	55

Aus dieser Messung ging hervor, dass das gewünschte Protein AmbF_Px zwar vorhanden war, der überwiegende Teil der Probe allerdings aus dem Chaperon DnaJ bestand (Tabelle 7). Gefolgt werden die beiden Proteine nur durch Hintergrundkontaminanten wie Keratin.

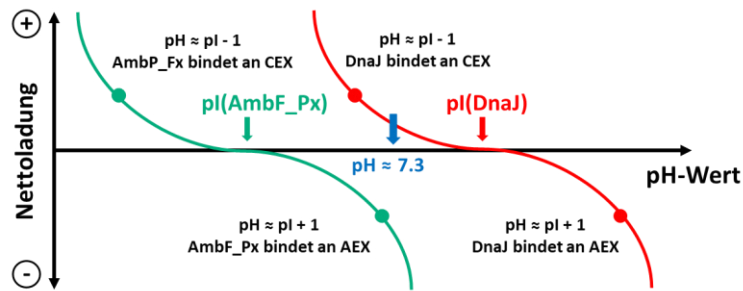


Abbildung 43. Schematische Darstellung der Nettoladungen und Bindeverhalten bei der IEX von AmbF_Px (grün) und dem Chaperon DnaJ (rot) und deren pH-Abhängigkeit. Im Bereich um $pH = 7.3$ (blau) ist AmbF_Px negativ, DnaJ positiv geladen.

Aufgrund der starken Verunreinigung sollte ein zweiter Reinigungsschritt durch Ionenaustauschchromatographie (IEX) erfolgen (Abbildung 43). Diese bot sich an, da sich die pI -Werte mit 6.19 (AmbF_Px) und 7.98 (DnaJ) stark genug unterscheiden, um im physiologischen Bereich unterschiedliche Gesamtladungen aufzuweisen.^[171] Bei einem pH -Wert von 7.3 liegt AmbF_Px entsprechend des berechneten isoelektrischen Punktes mit einer negativen Nettoladung vor, während DnaJ noch eine positive Gesamtladung aufweisen sollte. An einem Anionenaustauschharz sollte AmbF_Px folglich binden, DnaJ hingegen nicht. Für die Durchführung wurde ein starker Ionentauscher verwendet, bei dem die Agarose-Matrix mit $-N^+(CH_3)_3$ modifiziert ist. Bei diesen ist die Ladung der Bindestellen vom pH -Wert unabhängig, wodurch sich die beteiligten Faktoren, die die Bindung des Proteins an das Harz beeinflussen, nurmehr auf die Konzentration der im Puffer gelösten konkurrierenden Ionen bzw. der Nettoladung der Proteine beschränken. Dadurch werden im Allgemeinen eine hohe Beladungskapazität und Selektivität erreicht.

Zur Reinigung an der FPLC-Anlage wurde ein Triethanolaminpuffer ($pH = 7.30$, 20 mM) verwendet. Über eine Steigerung der NaCl-Konzentration im Puffer von 0 auf 1 M wurden die Proteine entsprechend der Bindungsstärke eluiert.

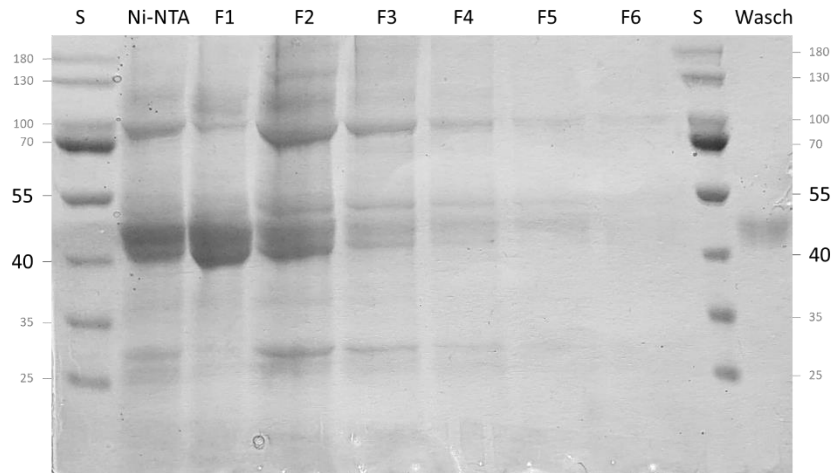


Abbildung 44. SDS-PAGE (12%, Coomassie Blue R-250) nach Anionenaustauschchromatographie. S = Molekulargewichtsstandard, Ni-NTA = vereinigte Fraktionen nach Ni-NTA-FPLC, FX = Fraktion nach AEX-FPLC. $M(\text{AmbF_Px}) = 50 \text{ kDa}$.

In Fraktion 1 scheinen sonstige Verunreinigungen zwar abgenommen zu haben, ein zufriedenstellendes Ergebnis wurde dennoch nicht erreicht (Abbildung 44).

Bei klassischen Aminotransferasen ist bekannt, dass sie als Cofaktor-freie *apo*-Enzyme leicht aggregieren können, weswegen die Expression häufig in Anwesenheit von PLP durchgeführt wird.^[172] Auch der Aufschluss- und Reinigungspuffer sollte den Cofaktor enthalten, da der Einbau reversibel erfolgt und die Dissoziation zu *apo*-Enzym und Cofaktor zu einem Verlust der aktiven Faltung führen kann.^[173]

Darum wurde eine Versuchsreihe gestartet, bei der PLP während der Expression und/oder des Aufschlusses verwendet wurde. Die Wahl fiel auf PLP, da nicht bekannt war, welcher der Vitamin B₆-Cofaktoren in das Protein integriert wird, PLP kommerziell erhältlich ist und PMP auch *in vivo* in *E. coli* in ausreichenden Mengen aus PLP gebildet werden sollte.

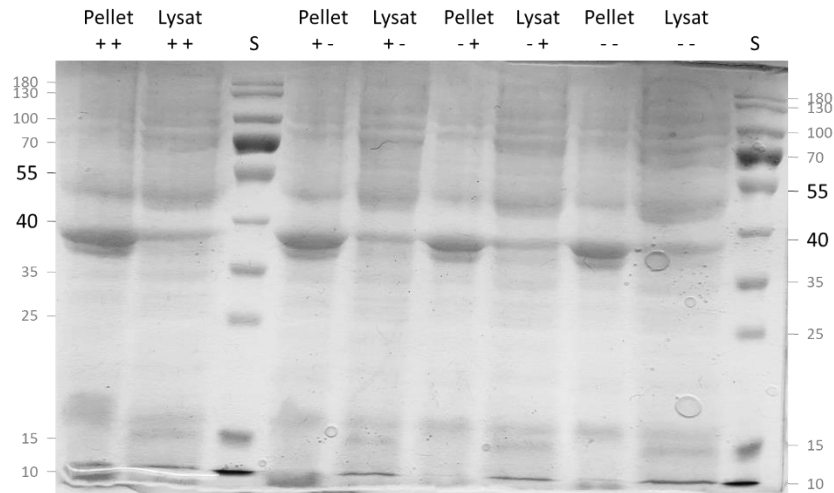


Abbildung 45. SDS-PAGE (12%, Coomassie Blue R-250) der Versuchsreihe zur Expression von *ambF_Px* in PLP-haltigen Puffer (*E. coli* BL21(DE3), 0.5 mM IPTG, 50 μ M PLP, 16 °C, 18 h). S = Molekulargewichtsstandard, Pellet = sedimentiertes Zelldebris, Lysat = Zellysate, + = mit PLP, - = ohne PLP; 1. Stelle: Expression, 2. Stelle: Zellaufschluss. M(AmbF_Px) = 50 kDa

Vor der Inokulation wurde dem 2TY-Medium PLP (10 μ M) zugesetzt. Ab der Induktion der Expression mit IPTG (0.5 mM) wurde die PLP-Konzentration auf final 50 μ M erhöht und bei 16 °C über Nacht inkubiert. Für den Zellaufschluss wurde der FPLC-Waschpuffer mit PLP (100 μ M) versetzt. Der Einfluss sollte durch Vergleichsversuche ohne PLP bei der Expression, resp. im Aufschlusspuffer untersucht werden. Allerdings waren zwischen den einzelnen Ansätzen keine Unterschiede und keine Verbesserungen zu vorherigen Versuchen erkennbar (Abbildung 45). Das deutet entweder darauf hin, dass der Einbau des Cofaktors nicht ausreichend stattfand oder die Stabilität und Löslichkeit dadurch nicht erhöht wurde. Da aus der Summe der Negativergebnisse und den Erkenntnissen aus den bioinformatischen Analysen aber eher von einem sonstigen, intrinsischen Problem ausgegangen wurde, wurden keine weitere Versuche zu AmbF_Px unternommen.

Reklonierte AmbF_Px-Domänen

Die Expression aller drei neu klonierten Domänen *ambF_Px^{NC}*, *ambF_Px^{NC}* und *ambF_Px^{NC}* wurde in *E. coli* BL21(DE3) getestet. Unter keiner der verschiedenen Bedingungen (15 °C, über Nacht/30 °C, 3 h; 2TY-/Autoinduktionsmedium; mit/ohne PLP) konnten positive Ergebnisse erzielt werden. Von den drei Konstrukten wurde aus Zeitgründen anschließend nur die Expression von *ambF_Px^{NC}* weiterverfolgt.

Um die Expression möglichst gut kontrollierbar zu machen, wurde der *E. coli*-Expressionsstamm Tuner™(DE3) verwendet. Dieser ist eine *lacY* (Lactosepermease)-Deletionsmutante, wodurch IPTG nicht mehr aktiv transportiert wird, sondern gleichmäßig in alle Zellen diffundiert. Durch die Reduktion der Abhängigkeit auf die IPTG-Konzentration sollte eine homogene Induktion bei gut reproduzierbaren Bedingungen erreicht werden können.^[174]

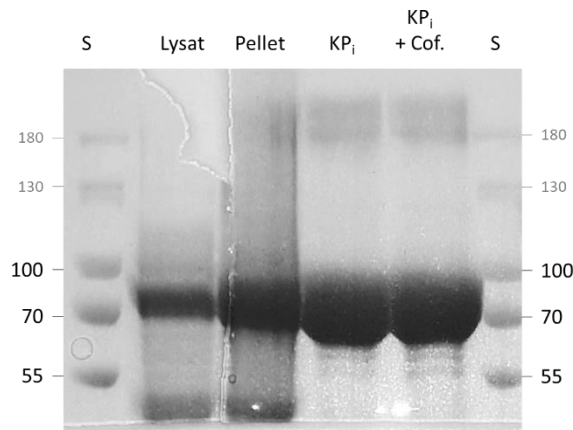


Abbildung 46. SDS-PAGE (8%, Coomassie Blue R-250) des Expressionsansatzes von *ambF_Px^{NC}* (*E. coli* Tuner™(DE3), 0.5 mM IPTG, 25 μ M PLP, 25 μ M PMP, 16 °C, 36 h). S = Molekulargewichtsstandard, Lysat = Zellysate, Pellet = sedimentiertes Zelldebris, KP_i = vereinigte Fraktionen nach FPLC-Reinigung und Umpuffern in KP_i-Puffer, KP_i + Cof. = KP_i-Fraktion mit je 100 μ M PLP und PMP. M(AmbF_Px^{NC}) = 82 kDa.

Um ausreichend Material für die enzymologischen Tests zu erhalten sollte mit möglichst wenig Optimierungsaufwand *AmbF_Px^{NC}* in einer ausreichenden Menge und Reinheit erhalten werden. Darum wurde von Beginn an ein Wachstumsmedium mit PLP und selbst synthetisierten PMP (je 25 μ M) verwendet und nach Induktion mit IPTG (0.5 mM) 36 h bei 16 °C inkubiert. Nach dem Zellaufschluss und der Reinigung mittels FPLC wurde das Protein in KP_i-Puffer ohne und mit PLP/PMP (je 100 μ M) umgepuffert. In der SDS-PAGE stellte sich *AmbF_Px^{NC}* (M = 82 kDa) als starke, beinahe homogene Bande im Bereich zwischen 70 kDa und 100 kDa dar (Abbildung 46). Ein kleines Stück dieser Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und für die Protein-MS/MS verwendet.

Tabelle 8. Ergebnis der Protein-MS/MS-Messung des Expressionsversuchs von *ambF_Px^{NC}*.

Rang	Name	Intensität [1]	Spektren	Anzahl spez. Peptide	Abdeckung [%]
1	<i>AmbF_Px^{NC}</i>	73601058	535	64	76

Die Messung bestätigte die Identität des Proteins (Tabelle 8), ohne dass Verunreinigungen in nennenswerten Mengen vorhanden waren.

Mit den gewählten Expressionsbedingungen ließ sich das Ziel $AmbF_Px^{NC}$ herzustellen leicht erreichen. Da das Protein relativ rein war, wurden keine weiteren Optimierungsversuche unternommen.

AmbF_HP_x

AmbF_HP_x war das Protein, dass die beste Erfolgchance in den Enzymaktivitätstests versprach, da alle funktionellen Einheiten vorhanden sein sollten. Daneben war bei der Didomäne von allen Konstrukten die Wahrscheinlichkeit ihre native Faltung zu erhalten und damit aktiv und löslich vorzuliegen am größten.

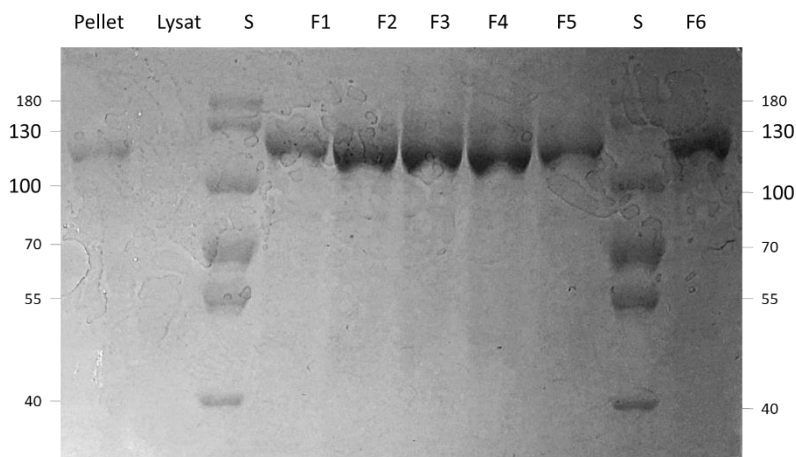


Abbildung 47. SDS-PAGE (8%, Coomassie Blue R-250) des Expressionsversuchs von *ambF_HP_x* in *E. coli* BL21(DE3) (0.5 mM IPTG, 50 μ M PLP, 16 °C, 36 h). S = Molgewichtsstandard, Pellet = sedimentiertes Zelldebris, Lysat = Zellysate, FX = Fraktionen nach Ni-NTA-FPLC, KP_i = vereinigte Fraktionen in KP_i-Puffer. $M(AmbF_HP_x) = 109$ kDa.

Im ersten Ansatz wurde die Expression in einem 2-TY-Medium mit PLP (50 μ M) durch die Zugabe von IPTG (0.5 mM) induziert. Es wurde bei 16 °C für 36 h inkubiert und im Anschluss die sedimentierten Zellen in FPLC-Waschpuffer mit PLP (100 μ M) aufgeschlossen. Die jeweiligen FPLC-Fraktionen hatten durchweg eine einzelne, homogene Bande im Bereich der Molmasse von AmbF_HP_x ($M = 109$ kDa, Abbildung 47). Die Fraktionen F2 – 4 wurden vereinigt und durch GPC in KP_i-Puffer mit PLP (100 μ M) als Reaktionspuffer überführt.

Tabelle 9. Ergebnisse der Protein-MS/MS von AmbF_HP_x aus *E. coli* BL21(DE3).

Rang	Name	Intensität [1]	Spektren	Anzahl spez. Peptide	Abdeckung [%]
1	AmbF_HP _x	172920187	992	72	63

Die Analyse der Proteinprobe aus dem SDS-PAGE-Gel ließ keine Zweifel an der Identität von AmbF_HP_x offen. Auch Verunreinigungen kamen nicht in nennenswerten Mengen vor (Tabelle 9).

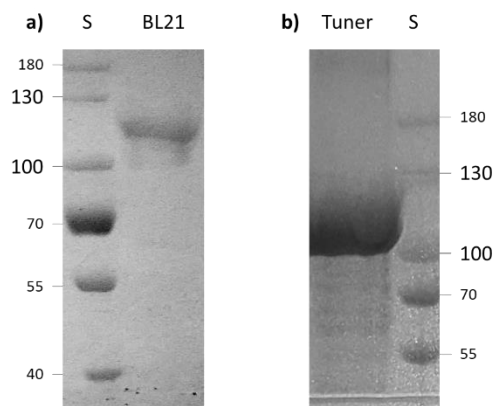
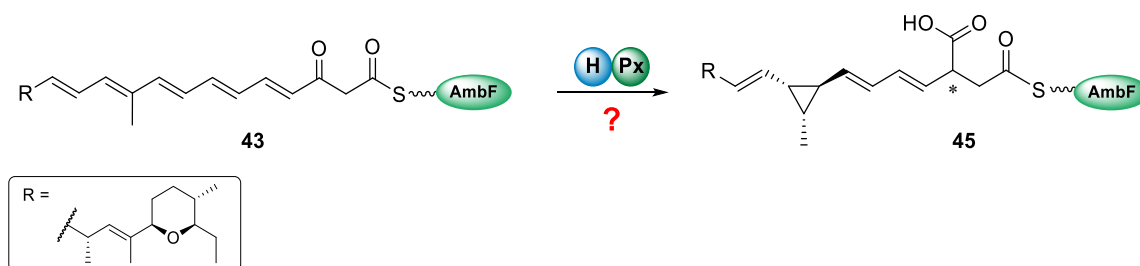


Abbildung 48. SDS-PAGE (8%, Coomassie Blue R-250, gleiche Probenvolumina) der Expressionstests von *ambF_HP_x* in *E. coli* BL21(DE3) (a), bzw. *E. coli* TunerTM(DE3) (b). Bedingungen: a) 0.5 mM IPTG, 50 μ M PLP, 16 °C, 36 h, b) 0.5 mM IPTG, 25 μ M PLP, 25 μ M PMP, 16 °C, 36 h. S = Molekulargewichtsstandard, BL21 = vereinigte Fraktionen nach Ni-NTA-FPLC bei Expression in BL21(DE3), Tuner = vereinigte Fraktionen nach Ni-NTA-FPLC bei Expression in TunerTM(DE3). M(AmbF_HP_x) = 109 kDa.

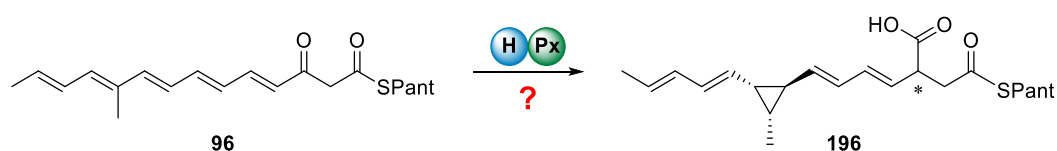
Mit Verwendung des *E. coli*-Stamms TunerTM(DE3) und einer Mischung aus PLP und PMP (je 25 μ M) konnte im Vergleich zu BL21(DE3) augenscheinlich ein leicht verbessertes Ergebnis erzielt werden (Abbildung 48). Da TunerTM(DE3) aber v.a. gut reproduzierbare Ergebnisse liefern soll, sollten künftige Versuche mit diesem Stamm ausgeführt werden.

3.3.4 ENZYMAKTIVITÄTSTESTS



Schema 62. Ziel der Enzymaktivitätstests, die Aufklärung des Mechanismus der Reaktion von **43** zu **45**.

Das Ziel der enzymologischen Arbeiten war die Aufklärung des Cyclopropanierungsmechanismus innerhalb der Ambruticin-Biosynthese und der Rollen der Hydrolase-, bzw. PMP-abhängigen Domäne bei der postulierten Reaktion des Pentaens **43** zur Divinylcyclopropylverbindung **45** (Schema 62).



Schema 63. Geplante *in vitro*-Enzymreaktion am vereinfachten Substrat **96**.

Für die Versuche wurde das von **43** abgeleitete D-Pantetheinyl- β -ketopentaenthioat **96** genutzt (Schema 63). Anhand der Analyse dessen Reaktionsprodukte sollte evaluiert werden, inwieweit die Hypothese zur Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments zutrifft. Dafür wurde das Multifunktionslesegeräts für Mikrotiterplatten VARIOSCAN® LUX von *Thermo Fisher Scientific* verwendet, da sich Änderungen in der Struktur aufgrund des konjugierten π -Systems gut photospektroskopisch verfolgen lassen sollten. Das Gerät erlaubte nicht nur photospektrometrische und -skopische Messungen, sondern ermöglichte auch die automatisierte Inkubation bei variablen Temperaturen, Schüttelprogrammen und geplanter Zugabe von Reagenzien. Damit ließ sich der Beginn und der Verlauf der enzymologischen Reaktionen optimal steuern und analysieren. Isolierte Produkte sollten mit UPLC-MS untersucht werden. Das PLP (**69**) wurde von *Sigma-Aldrich* erworben, das PMP (**70**) wurde in Anlehnung an Lit.^[175] aus Pyridoxamin mittels Phosphorylierung mit Metaphosphorsäure und gezielter Hydrolyse von

Polyphosphatnebenprodukten hergestellt und durch Säulenchromatographie an Cellulose gereinigt.

Vorversuche

Im Vorfeld mussten die Parameter bestimmt werden, mit denen die ersten Versuche durchgeführt werden sollten. Insbesondere der Puffer kann einen starken Einfluss auf die Reaktion haben, da der pH-Wert bei Enzymreaktionen oft eine kritische Rolle spielt und Puffer-substanzen im großen Überschuss eingesetzt werden müssen. In früheren Arbeiten haben sich für Reaktionen mit Aminotransferasen insbesondere leicht basische Tris-basierte Puffer als gut geeignet herausgestellt.^[176] Allerdings besteht bei dem primären Amin Tris die Möglichkeit mit PLP sowie dem Substrat **96** ein Imin zu bilden, was einen unvorhersagbaren Effekt auf die Reaktion haben könnte. Darum wurden die Reaktionen in Phosphatpuffer (KPi-Puffer) durchgeführt, da bei diesem eine Iminbildung ausgeschlossen ist. In der Regel wurde derselbe Ansatz auch mit HEPES-Puffer durchgeführt. Da die Ergebnisse sich aber nicht ausschlaggebend von denen mit Phosphatpuffer unterschieden, sind diese der Übersichtlichkeit halber nicht mit aufgeführt.

Die Wahl der Cofaktoren fiel neben PMP und PLP auf die drei Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure und Alanin, da diese einer Vielzahl an Aminotransferasen als Aminodonor dienen (vgl. Kapitel 1.4). Da die Frage, ob AmbF_Px das PMP selbst durch Transaminierung aus PLP generiert offen ist, wurde dem Faktor Aminosäure allerdings ohnehin nur eine geringe Bedeutung zugemessen und meist direkt eine Mischung aus PMP und PLP oder nur PMP sowie den drei Aminosäuren verwendet. Die Aminosäuren dienten dabei als „Absicherung“, sollte PMP doch verbraucht und nachgebildet werden müssen.

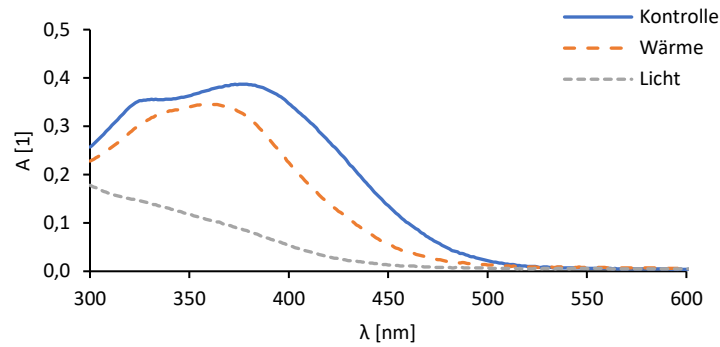


Abbildung 49. UV/vis-Spektren des Substrats **96** in Phosphatpuffer (2 mM; 2 Vol.-% DMSO, pH = 7.60, 50 mM KPi) als frisch angesetzte Lösung (blau), nach 20 h bei 37 °C (orange) und 20 h unter künstlicher Beleuchtung (grau).

Um im Vorfeld mögliche Fehlerquellen ausfindig zu machen, wurde die Stabilität des Substrats **96** unter Reaktionsbedingungen untersucht. Hierfür wurde es in Phosphatpuffer mit 2 Vol.-% DMSO gelöst (blau) und bei 37 °C im Dunkeln bzw. bei RT unter Neonlicht für 20 h inkubiert. Wie zu sehen, wichen beide Absorptionsspektren stark von der Kontrolle ab (Abbildung 49). Insbesondere unter Lichteinwirkung schien sich das Substrat stark verändert zu haben. Da es kein messbares Absorptionsmaximum im untersuchten Bereich gab, war es aber nicht möglich Aussagen über die Art der photochemischen Nebenreaktion zu treffen. Dennoch offenbart sie ein großes inhärentes Problem der Enzymaktivitätstests am Photometer, da das Substrat bei der Messung zwangsläufig Licht ausgesetzt ist. Aber auch bereits die Inkubation im Dunkeln hat erkennbar zu einer Abnahme der Absorption geführt, welche vermutlich auf der Zersetzung des Substrats gründet. Damit wird bereits an dieser Stelle eine Fehlerquelle für die nachfolgenden Tests ersichtlich, welche sich leider nicht umgehen ließ. Einzig eine rasche Umsetzung könnte die Nebenreaktionen vernachlässigbar machen.

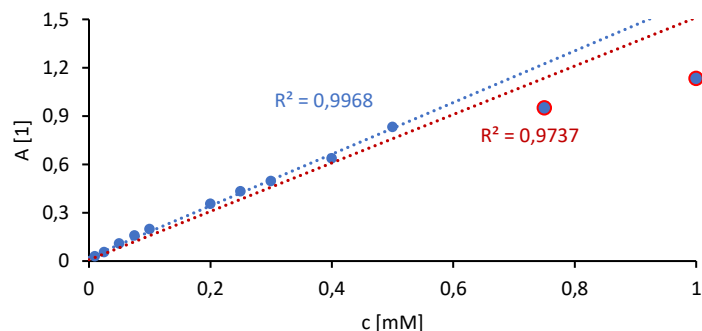


Abbildung 50. Messkurven der Konzentrationsbestimmung von **96** in KPi -Puffer (pH = 7.60, 50 mM KPi , 150 mM NaCl, 5 Vol.-% Glycerin) mit 5 Vol.-% DMSO. Die blau markierte Regressionsgerade bezieht nur Werte für $c \leq 0.5$ mM ein, die rot markierte über den gesamten Bereich bis 1 mM.

Ein weiteres Problem wird bei der Konzentrationsbestimmung des Substrats **96** im Reaktionspuffer deutlich (Abbildung 50). Obwohl die Lösungen noch beinahe klar waren, spricht die schlechte Linearität bei $c > 0.5$ mM für eine geringe Löslichkeit des Substrats, selbst bei Verwendung von 5 Vol.-% DMSO als Cosolvenz. Dadurch kann nur eine geringe Absolutausbeute (bspw. bei 0.5 mM max. 0.25 mg/mL **196**) erreicht werden. Da chemoenzymatische Reaktionen oft schwer skalierbar sind, kann das die Analysierbarkeit enorm erschweren. Zusätzlich wird durch eine niedrige Substratkonzentration auch die Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt, was aufgrund der konkurrierenden Nebenreaktionen zusätzlich problematisch ist. Zur Kompensationen wurden in den Versuchen möglichst hohe Enzymkonzentrationen eingesetzt.

Enzymologische Versuche

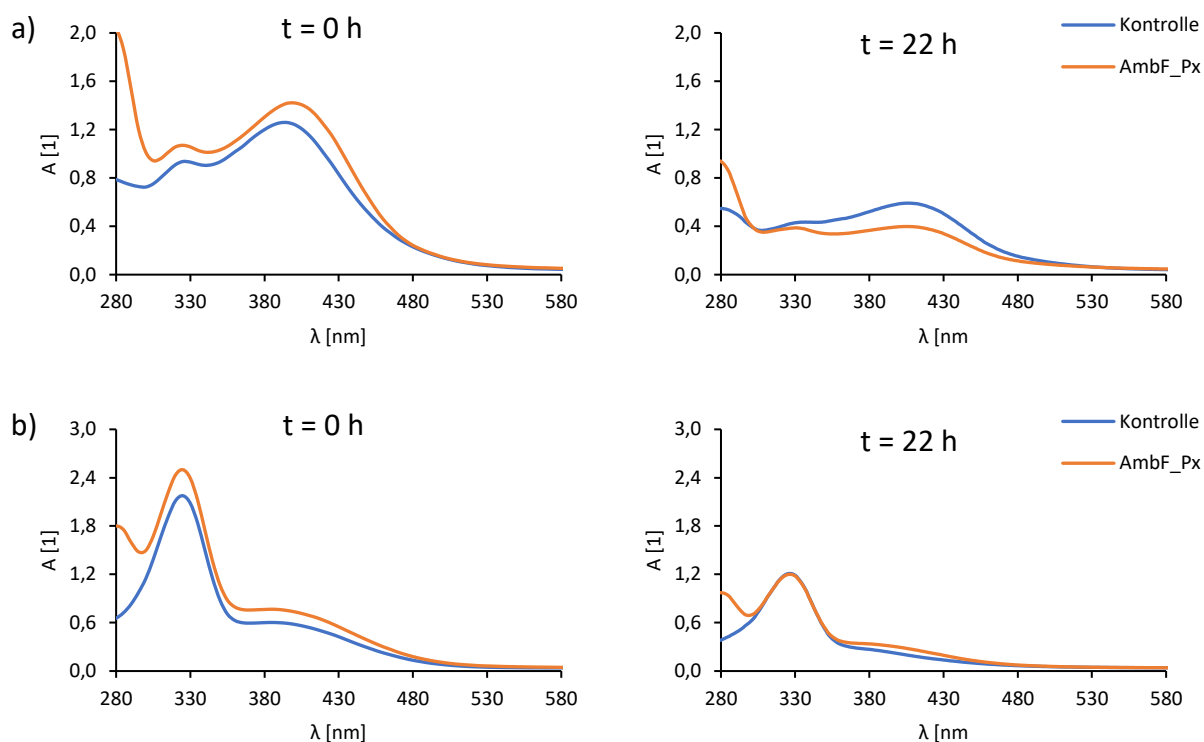


Abbildung 51. Absorptionsspektren der Versuchsansätze zur Umsetzung von **96** mit AmbF_Px (orange) und der Kontrolle ohne Protein (blau) zu Beginn und nach 22 h Inkubationszeit.

Reagenzien und Bedingungen: a) 0.5 mM **96**, 0.5 mM PLP (**69**), je 3.3 mM Asp, Glu, Ala, 3.4 mg/mL AmbF_Px, KPi-Puffer (pH = 7.60, 50 mM KPi, 150 mM NaCl, 5 Vol.-% Glycerin), T = 25 °C; b) 0.5 mM **96**, 1.0 mM PMP (**70**), je 3.3 mM Asp, Glu, Ala, 3.4 mg/mL AmbF_Px, KPi-Puffer (pH = 7.60, 50 mM KPi, 150 mM NaCl, 5 Vol.-% Glycerin), T = 25 °C.

Erste Versuche fanden mit AmbF_Px (nach Lit.^[164]) statt, welches durch Coexpression mit dem pKJE7-Chaperonset hergestellt wurde und stark mit dem Chaperon DnaJ verunreinigt war (s.

Kapitel 3.3.3). Im Vergleich zwischen den Ansätzen mit (Abbildung 51, orange) und ohne (blau) AmbF_Px traten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Lage der Absorptionsmaxima zutage. Es ist also davon auszugehen, dass außer der Zersetzung des Substrats allenfalls eine spontane, jedoch keine katalysierte Reaktion stattfand.

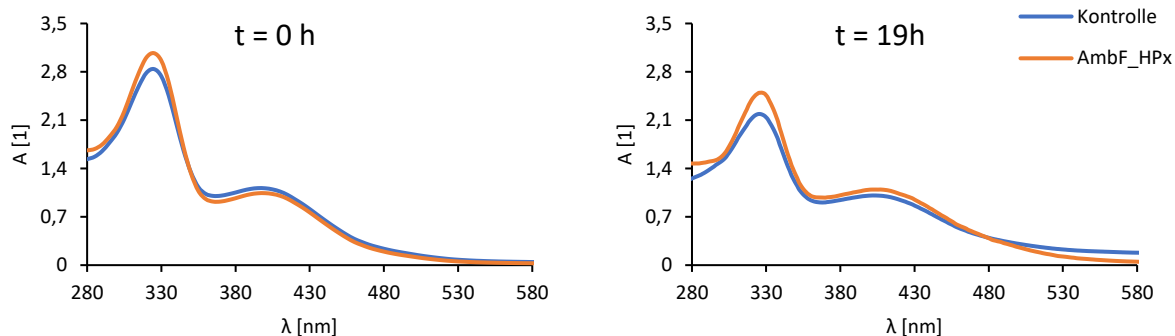


Abbildung 52. Absorptionsspektren der Versuchsansätze zur Umsetzung von **96** mit AmbF_HP x (orange) und der Kontrolle ohne Protein (blau) zu Beginn und nach 20 h Inkubationszeit.

Reagenzien und Bedingungen: 0.5 mM PLP (**69**), 1.0 mM PMP (**70**), 10 mM **96**, je 3.3 mM Asp, Glu, Ala, 3.4 mg/mL AmbF_Px, KPi-Puffer (pH = 7.50, 50 mM KPi, 150 mM NaCl, 5 Vol.-% Glycerin), T = 25 °C.

Bei der Reaktion von **96** mit AmbF_HP x ließ sich ebenfalls kein Unterschied zwischen der Kontrollprobe ohne Protein (Abbildung 52, blau) und der Probe mit AmbF_HP x (orange) ausmachen. Auch hier war kein Produkt durch die Katalyse mit AmbF_HP x entstanden, welches mithilfe der photospektroskopischen Messung detektiert hätte werden können.

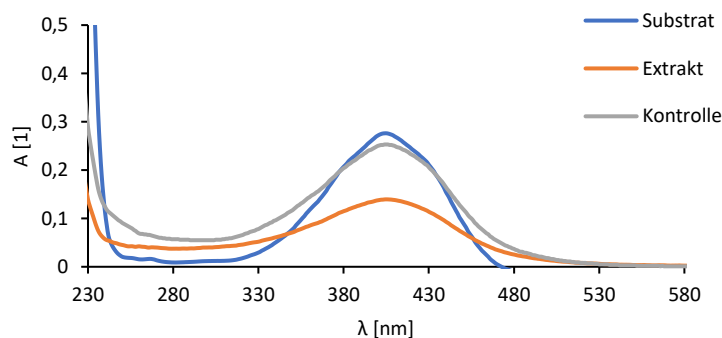


Abbildung 53. Absorptionsspektren des Substrats **96** in MeCN/iPrOH 1:1 (blau), des Extrakts aus dem Kontrollansatz ohne Protein (grau) und mit AmbF_HP x (orange).

Parallel wurden dieselben Ansätze unter Lichtausschluss und analogen Bedingungen durchgeführt. Aber auch in deren Extrakten, welche durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit MeCN/iPrOH 1:1 und Phasentrennung durch Aussalzen mit NaCl erhalten wurden, konnte kein aussagekräftiges Signal im Bereich von 230 – 250 nm detektiert werden, welches auf das

postulierte Produkt schließen lassen könnte (Abbildung 53). Auch in der massenspektrometrischen Analyse ließ sich keine Verbindung außer des Substrats sicher nachweisen.

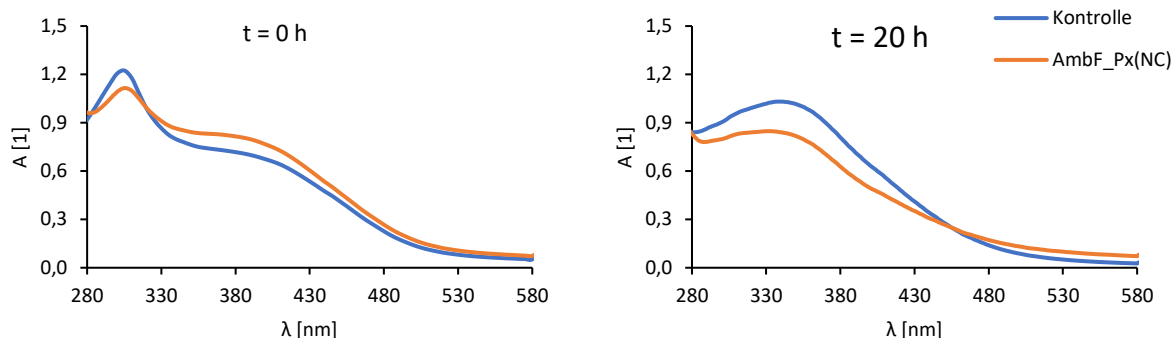


Abbildung 54. Absorptionsspektren der Versuchsansätze zur Umsetzung von **96** mit AmbF_Px^{NC} (orange) und der Kontrolle ohne Protein (blau) zu Beginn und nach 20 h Inkubationszeit.

Reagenzien und Bedingungen: 0.1 mM PLP (**69**), 0.1 mM PMP (**70**), 10 mM **96**, je 3.3 mM Asp, Glu, Ala, 9 μM AmbF_Px^{NC}, KPi-Puffer (pH = 7.5, 50 mM KPi, 150 mM NaCl, 5 Vol.-% Glycerin), T = 25 °C

Dasselbe Ergebnis wurde auch mit AmbF_Px^{NC} erhalten. Auch hier gab es keinen Unterschied zwischen der Kontrollprobe ohne (Abbildung 54, blau) und dem Ansatz mit Protein (orange). Ebenso konnten in der UPLC/MS-Analyse nur Reste des Substrats nachgewiesen werden.

Fazit

Die Enzymaktivitätstests waren weder für AmbF_Px, AmbF_HPx noch AmbF_Px^{NC} erfolgreich. In keinem der Ansätze konnte ein Hinweis auf die Bildung des postulierten oder eines sonstigen mit den angewandten Methoden charakterisierbaren Produkts erhalten werden, welches auf eine katalysierte, spezifische Umsetzung des Substrats **96** hindeutet.

Mögliche Ursachen sind die starke Hintergrundreaktion durch Zersetzung des Substrats, die geringe Löslichkeit und die damit einhergehende Aktivitätsminderung und erschwerte Analyse-möglichkeit. Ebenso ist es möglich, dass die Reaktionsbedingungen oder die -komponenten nicht optimal gewählt waren. Da Optimierungsarbeiten nicht mehr durchgeführt werden konnten, lässt darüber keine Aussage treffen.

Zur Verbesserung könnten eben diese Bedingungen variiert werden. Auch sollte evaluiert werden, ob Reaktionskomponenten wie andere Aminosäuren oder aber auch kommerziell erworbenes PMP geeigneter sind. Aus dem Pantetheinthioester **96** könnte chemoenzymatisch das

entsprechende CoA-Derivat, bzw. das beladene ACP hergestellt werden, welche in der Regel zu höheren Aktivitäten führen. Auch sollten noch andere Analyse- und Aufarbeitungsmethoden getestet werden. Durch parallele Mehrfachansätze könnte die Menge an Rohprodukt gesteigert werden, so dass dieses per NMR-Spektroskopie untersucht und ggf. einzelne Stoffe daraus isoliert werden können. Mittels Löslichkeitsvermittler wie biokompatible Detergenzien wie Digitonin oder mit anderen Cosolvenzien wäre es unter Umständen möglich höhere Substratkonzentrationen zu erreichen. Auf Ebene der verwendeten Domänen könnte gegebenenfalls noch einmal eine Untersuchung der Grenzen und eine entsprechende Anpassung stattfinden. Letztlich ist wie häufig bei PKS-Domänen auch nicht ausgeschlossen, dass die Umgebung der einzelnen Domänen einen Einfluss auf das Ergebnis haben könnte. So könnte die Verwendung des kompletten Moduls AmbF, ggf. in Kombination mit *knock out*-Varianten einzelner Domänen getestet werden.

Auch wenn die Versuchsergebnisse noch nicht vielversprechend waren, ist damit der Weg zu weiteren Experimenten geebnet.

3.4 STUDIEN ZUR STEREOSELEKTIVITÄT VON MYCKR_B

Typ I Polyketidsynthasen bieten aufgrund ihres modularen Aufbaus im Rahmen des *PKS engineering* ein interessantes Forschungsfeld für die Anwendung in artifiziellen Biosynthesen. Dabei ist die Stereoselektivität der Domänen einen entscheidenden Parameter für die Planung. Hier spielen insbesondere die KR-Domänen eine herausragende Rolle, da diese die Bildung zweier Stereozentren aus einem prochiralen Molekül steuern können. Gleichzeitig gibt es eine große Anzahl unterschiedlicher KRs mit unterschiedlichen Stereoselektivitäten, sodass aus dem gleichen prochiralen Edukt sämtliche Produkte mit allen möglichen Stereokonfigurationen erhalten werden können.^[63] Während die Stereoselektivität von KR-Domänen mit kleineren Substraten, z.B. Di-, Tri- und Tetraketide mit *N*-Acetylcysteamin als Thiokomponente, gut erforscht ist, mangelt es an Beispielen mit komplexeren Substratsurrogaten. Der Hauptgrund mag dabei die schwierige Synthese sein. Dadurch fehlen Informationen dazu, wie resilient die Stereoselektivität einer KR-Domäne gegenüber strukturellen Veränderungen der Vorläufer ist. Dies ist allerdings essenziell, um ein *PKS engineering* mit guter Erfolgswahrscheinlichkeit zu erreichen. Auch ist noch unklar, wie groß tatsächlich der Anteil ist den Protein-Protein-Wechselwirkungen in PKS im Vergleich zu den Interaktionen von Protein und Substrat

ausmachen. Darum ist es nötig neben den einfachen, kleineren Substraten auch hochrealistische Substratsurrogate einzusetzen, die späteren Biosynthesestufen entsprechen.^[177] Zur Demonstration dieser Relevanz sollte die Spezifität bei der Reduktion eines β -Ketothioats durch die Ketoreduktase MycKR_B untersucht werden.

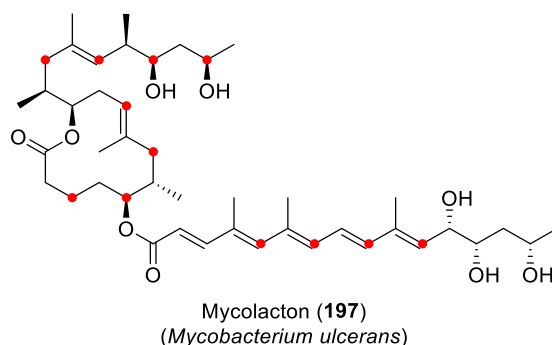
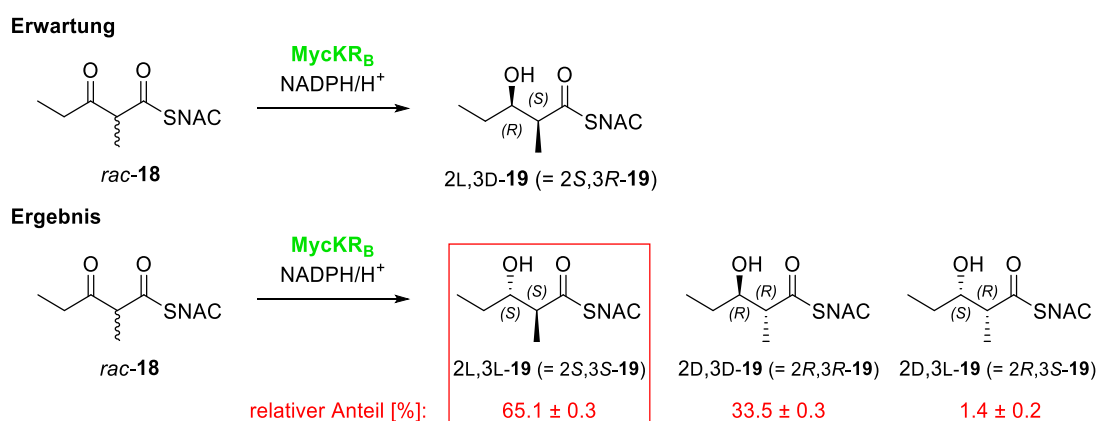


Abbildung 55. Struktur von Mycolacton. Reduktionspositionen von MycKR_B sind rot markiert.^[178]

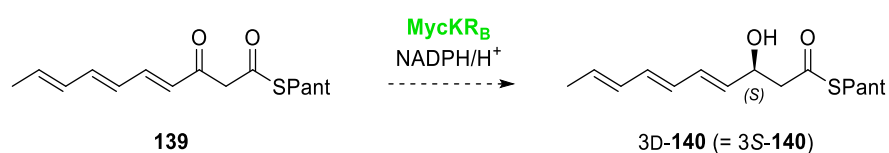
Die Domäne MycKR_B katalysiert die NADPH-abhängige Reduktion von 3-Oxoverbindungen im Rahmen der Biosynthese des bakteriellen Toxins Mycolacton (**197**, Abbildung 55). Im Gegensatz zu meisten anderen Typ I-PKS-Ketoreduktasen hat sie aber ein breites Spektrum natürlicher Substrate. Insgesamt findet sie sich in der Mycolacton-PKS an 15 Modulen, wobei sie in 13 Reduktionen katalysiert. Aus allen MycKR_B-Substraten, unter denen auch vier (mehrfach) ungesättigte β -Ketoverbindungen zu finden sind, wird stets die 3D-Konfiguration des β -Alkohols gebildet.^[178]



Schema 64. Versuch von Weissman *et al.* zur Reduktion von 2L-**18** mit MycKR_B.^[62]

Bei einer *in vitro*-Untersuchung an dem Substratsurrogat *rac*-**18** von Weissman *et al.* wurde hauptsächlich die 2L,3L-Konfiguration und zu kleineren Teilen das 2D,3D-Isomer erhalten (Schema 64). Das erwartete Produkt 2L,3D-**19** war in der Produktmischung hingegen nicht

vorhanden. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Spezifität der MycKR_B im natürlichen Kontext auf die Integration in den Multienzymkomplex, der die Substratorientierung vorgibt, zurückzuführen sei.^[64] Die Konsequenz dieser Schlussfolgerung ist, dass dadurch die Vorhersagbarkeit der Selektivitäten von PKS-Domänen wie KRs eminent erschwert wäre. Der eigene Arbeitsansatz dieser Dissertation, der die Verwendung von isolierten Domänen beinhaltet, wäre entsprechend wenig erfolgsversprechend. Weissman *et al.* verwendeten allerdings ein diketidisches Substrat, welches also einer frühen Stufe entspricht. Dies könnte zu einer verringerten Substrat-Protein-Wechselwirkung und damit einhergehenden Selektivitätsverlust geführt haben. Ein langkettiges Substrat wurde hingegen nicht eingesetzt.



Schema 65. Geplante Reduktion des Substratsurrogats **139**.

Darum sollte mit der Reduktion von **139** die Hypothese überprüft und gestützt werden, dass natürliche Spezifitäten maßgeblich durch die Strukturen der Substrate bestimmt werden (Schema 65). Bei diesem Substratsurrogat wird durch das konjugierte π -System und den Pantetheinthioester ein hohes Maß an Identität zu den MycKR_B-Substraten erreicht. Wenn die Annahme richtig ist, sollte es möglich sein daraus das 3D-konfigurierte Produkt **140** zu erhalten.

3.4.1 DURCHFÜHRUNG DER SELEKTIVITÄTSTESTS

Für die Umsetzung von **139** konnte bereits auf arbeitskreisinterne Erfahrungen für Reduktionen mit MycKRB zurückgegriffen werden.^[138] Die Bedingungen wurden jedoch noch einmal deutlich verändert, um eine möglichst praktikable Umsetzung bei hohen Ausbeuten zu gewährleisten.

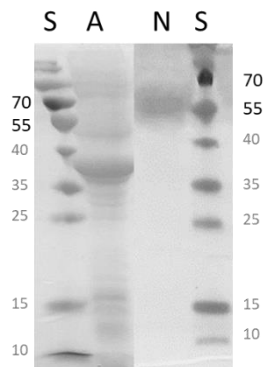


Abbildung 56. SDS-PAGE der MycKR_B-Expressionsprodukts vor (links) und nach (rechts) Optimierung der Bedingungen. S = Molekulargewichtsstandard, A = Eluat vor Optimierung, N = Eluat nach Optimierung. M(MycKR_B) = 53 kDa.

Da das Protein unter den vorher verwendeten Bedingungen stark verunreinigt war, wurden diese im Vorfeld der Experimente optimiert. Dabei wurde die Inkubationstemperatur von 16 °C auf 20 °C gesteigert. Um die Ni-IMAC-Säule selektiv mit His₆-MycKR_B sättigen zu können, wurden anstatt 1 – 2 g Zellpellet >5 g aufgeschlossen und für die Reinigung eingesetzt. Gleichzeitig wurde ein Imidazol-haltiger Waschpuffer verwendet, welcher unselektiv gebundene Verunreinigungen weiter reduzierte. Mit diesen Maßnahmen konnte die Reinheit des MycKR_B deutlich erhöht werden (Abbildung 56).

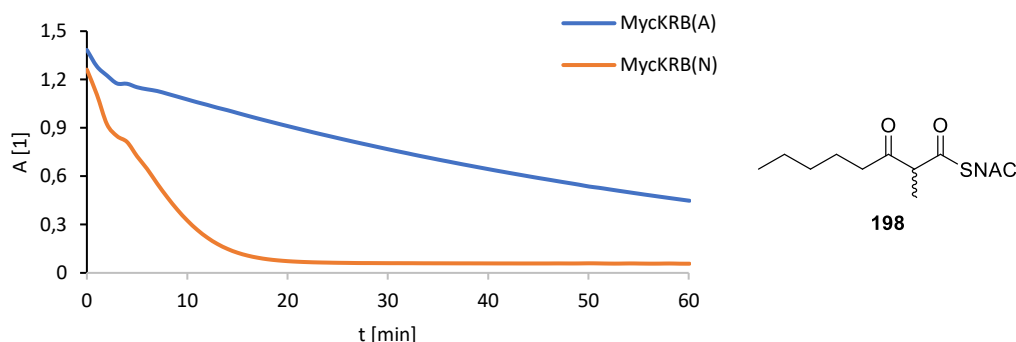
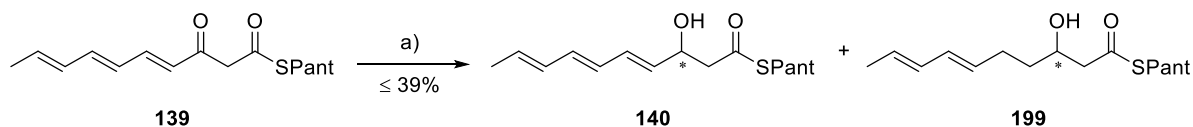


Abbildung 57. Abnahme der Absorption bei $\lambda_{\max}(\text{NADPH}) = 340 \text{ nm}$ für die Reduktion von **198** mit dem noch stark verunreinigten MycKR_B (MycKR_B(A)) und dem nach optimierten Bedingungen erhaltenen Produkt (MycKR_B(N)).

Reagenzien und Bedingungen: HEPES-Puffer (pH = 7.50, 150 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 Vol% Glycerin, 3 Vol.-% DMSO), 1 mM NADPH (0.2 Äquiv.), 5.0 mM **198** (1.0 Äquiv.), 5.0 μM MycKR_B, 30 °C.

In einem photometrischen Aktivitätstest mit dem Substratsurrogat **198** wurde in Korrelation zur höheren Reinheit auch eine signifikant höhere Umsatzgeschwindigkeit festgestellt (Abbildung 57).



Schema 66. Reduktion von **139** mit MycKR_B/NADPH.

Reagenzien und Bedingungen: a) NADPH (4 mM), MycKR_B (5 μM), HEPES-Puffer (pH = 7.2), 3 Vol.-% DMSO, 30 °C

Mit dem reinen MycKR_B konnte ein Protokoll für die enzymatische Reduktion von **139** mit NADPH entwickelt werden. Die größten Hürden waren dabei die niedrige Löslichkeit des Substrats und die Bildung eines Nebenprodukts. Da bei nicht vollständig gelöstem **139** vermehrt Nebenprodukte gebildet wurden, wurde ein DMSO-haltiger Puffer verwendet, in dem das Edukt vorgelöst wurde. Die Nebenreaktion fiel umso stärker aus, je mehr Äquivalente des Reduktionsmittels NADPH verwendet wurden. So war der prozentuale Anteil von **199** im Rohprodukt 44% bei 4.1 Äquiv. NADPH, aber nur 23% bei 1.3 Äquiv. NADPH. Für einen Kompromiss zwischen Nebenreaktion und vollständiger Umsetzung wurden für die folgenden Versuche 1.33 Äquiv. NADPH eingesetzt. Es wurden 28.1 mg (63.8 μmol) **139** verwendet, um genug Material für die nachfolgenden Schritte zur Aufklärung der absoluten Konfiguration und Selektivität zur Verfügung zu haben. Nach Aufarbeitung wurden insgesamt 11.0 mg des Rohprodukts erhalten, was einer Ausbeute von max. 39% entsprach.

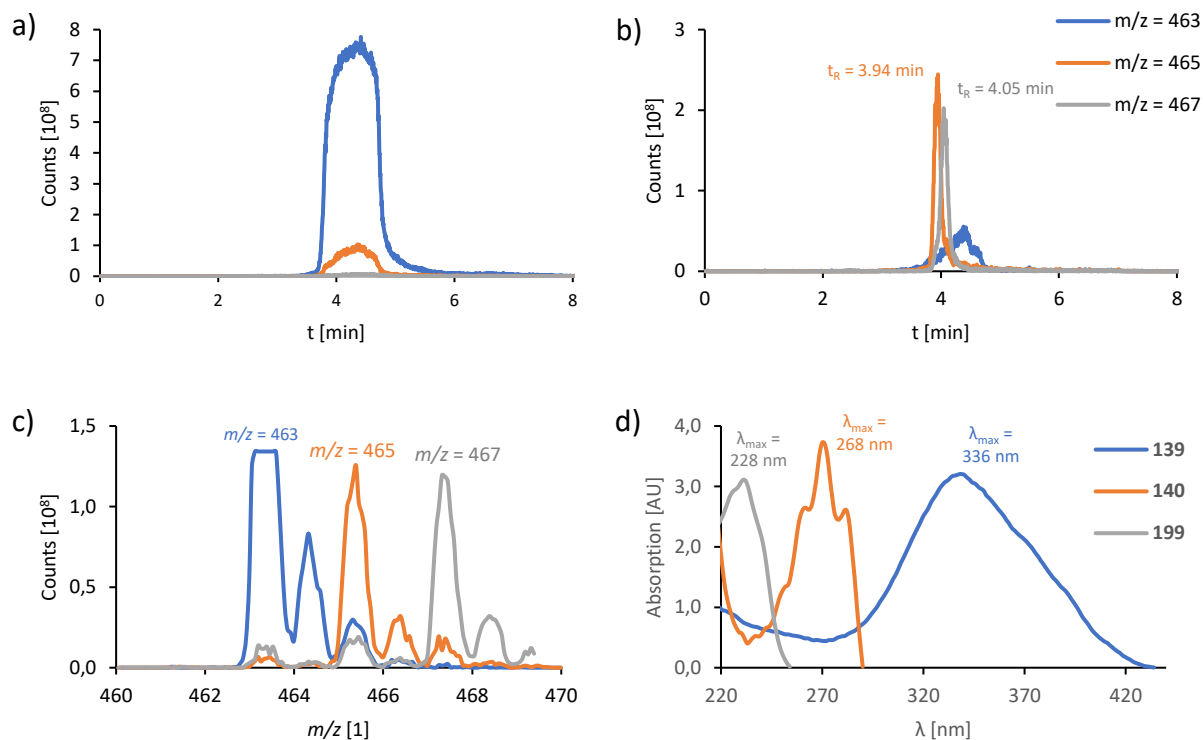
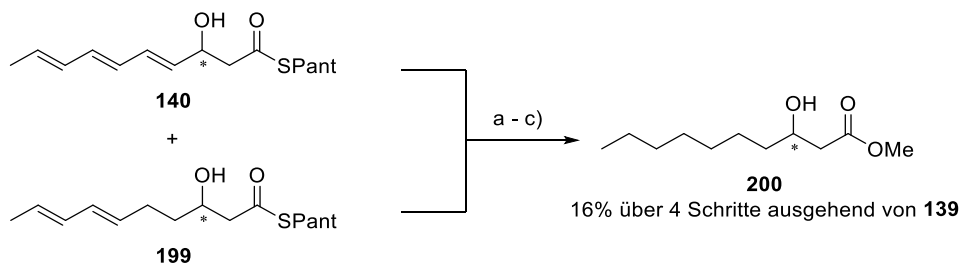


Abbildung 58. Oben: UPLC-MS-Chromatogramme vor (a) und nach (b) der Umsetzung von **139** mit MycKR_B und NADPH. Unten: Hauptsignale des Substrats **139** (blau), des Produkts **140** (orange) und des Nebenprodukts **199** (grau) der Massenspektren (c) und UV/vis-Spektren (d).

Nach Aufarbeitung wurde das Rohprodukt mittels UPLC-UV/vis-MS untersucht (Abbildung 58, oben). Daraus konnten Schlüsse zur Struktur von **199** gezogen werden (Abbildung 58, unten). So gab es im Chromatogramm einen zum Hauptprodukt leicht verschobener Peak ($t_R = 4.05$ min). Die größte Intensität hatte dabei im Massenspektrum eine Verbindung mit $[M + Na]^+ = 467$ Da, was einer molaren Masse entspricht, die um 2 Da größer als die des Hauptprodukts **140** ist. Auch war hier die max. Absorption bei 228 nm, also um 40 nm niedriger als bei **140**. Das und die Proportionalität von Bildung zu Reduktionsäquivalenten spricht dafür, dass eine Doppelbindung zu einer Einfachbindung reduziert wurde. Da die Verbindung nicht in ausreichenden Mengen für eine vollständige Charakterisierung erhalten werden konnte, kann die Struktur nicht mit Sicherheit bestimmt werden. Es ist jedoch am wahrscheinlichsten, dass die Doppelbindung in Position C-4,C-5 reduziert wurde.

3.4.2 DERIVATISIERUNG UND BESTIMMUNG DER ABSOLUTEN KONFIGURATION

Da **199** chromatographisch nicht abgetrennt werden konnte, musste es derivatisiert werden, um die Stereoselektivität an einem gemeinsamen Produkt von **140** und **199** zu bestimmen, das optimalerweise literaturbekannt sein sollte.



Schema 67. Derivatisierung des MycKR_B-Reduktionsrohprodukts zum literaturbekanntem β -Hydroxyester **200**.

Reagenzien und Bedingungen: a) 0.5 M LiOH aq., THF/H₂O 2:1, RT, 90 min; b) TMSCHN₂, MeOH/PhH 2:1, RT, 2 h; c) H₂ (1 atm), Pd/C (20 Mol-%), EtOAc, RT, 90 min.

Dafür wurde der Thioester mit LiOH aq. verseift und die erhaltene Carbonsäure mit TMSCHN₂ verestert. Der einschließlich der enzymatischen Reduktion mit 32% Ausbeute über drei Schritte erhaltene Methyl ester wurde in 50%iger Ausbeute an Pd/C zum Methyl-3-hydroxydecanoat (**200**) hydriert. Die Referenz *rac*-**200** für die gaschromatographische Analyse des Enantiomerenüberschuss wurde von T. Ross durch eine Reformatzky-Reaktion von Octanal synthetisiert.

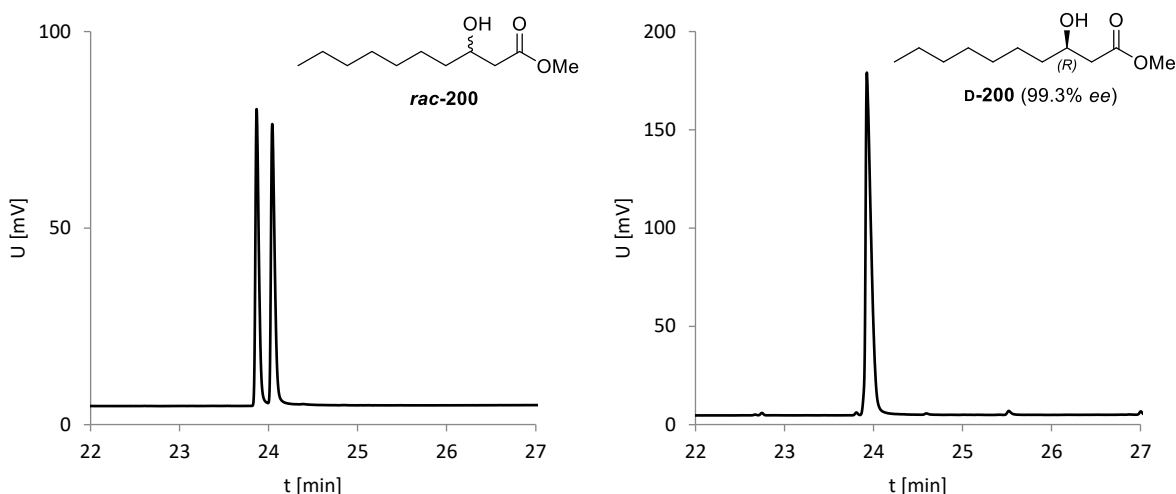
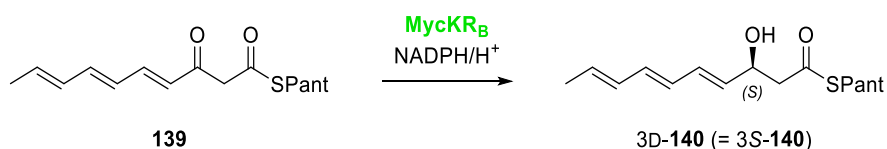


Abbildung 59. Chromatogramme der GC an chiraler Phase. Links die racemische Referenz und rechts das MycKR_B-Reaktionsprodukt D-200 mit einem *ee* > 99.3%.

Der Drehwert des erhaltenen Esters entsprach mit $[\alpha]_D = -12.5$ ($c = 0.13$) sehr gut dem Literaturwert (Lit.^[179]: $[\alpha]_D = -11.5$ ($c = 0.82$)) für den *R*-, bzw. D-konfigurierten Ester. Mittels Gaschromatographie an chiraler Phase konnte ein Enantiomerenüberschuss > 99.3% gemessen werden (Abbildung 59). T. Ross konnte durch Veresterung des sekundären Alkohols mit dem chiralen Derivatisierungsreagenz 9-AMA die absolute Konfiguration bei einem *ee* > 95% bestätigen.



Schema 68. Ergebnis des Stereoselektivitätstests von MycKR_B mit dem Trien **139**. Es wurde ausschließlich das 3D-konfigurierte Produkt gebildet.

Damit konnte gezeigt werden, dass MycKR_B bei der Reduktion eines komplexen Substrats wie **139** hoch stereospezifisch das D-konfigurierte Produkt bildet und damit wie erwartet den B-Typ der Ketoreduktasen zuzuordnen ist. Auch wurde so demonstriert, dass die Struktur des Substrats einen entscheidenden Einfluss auf die Stereoselektivität hat. Die Verwendung isolierter Domänen ist also durchaus repräsentativ, wenn auf eine hohe Strukturhomologie der Surrogate zum natürlichen Substrat geachtet wird.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Aufklärung der Ambruticin-Biosynthese.

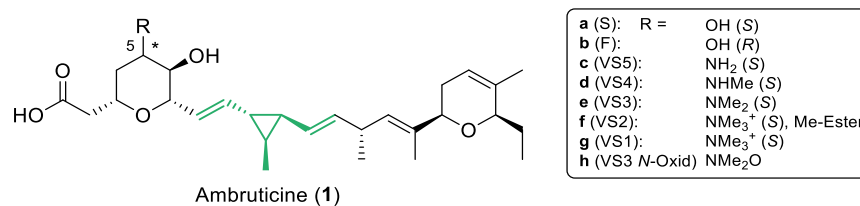
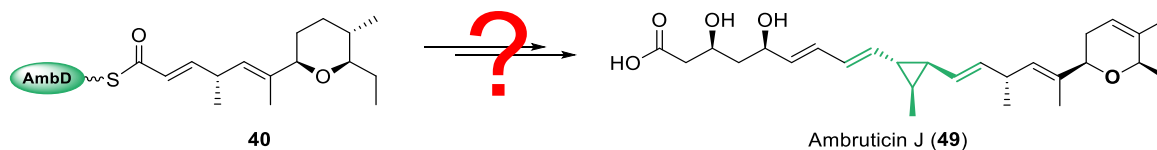


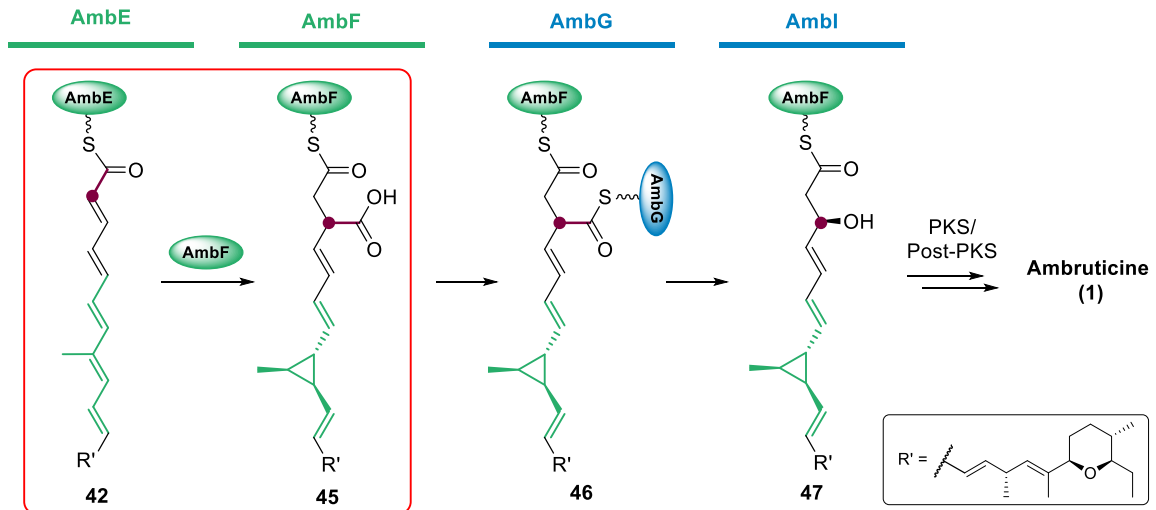
Abbildung 60. Die allgemeine Struktur der Ambruticine (**1a-h**).^[29] Das Mittelfragment ist grün hervorgehoben.

Die Ambruticine (**1**) sind Polyketidnaturstoffe aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* So ce10, welche über einen sehr selektiven Mechanismus fungizid wirken. Dies macht sie als neuartige Antimykotika interessant. Ein Umstand, der dem kommerziellen Nutzen aber im Wege steht, ist die hohe strukturelle Komplexität (Abbildung 60). Diese Komplexität wird durch eine außergewöhnliche Biosynthese erreicht.



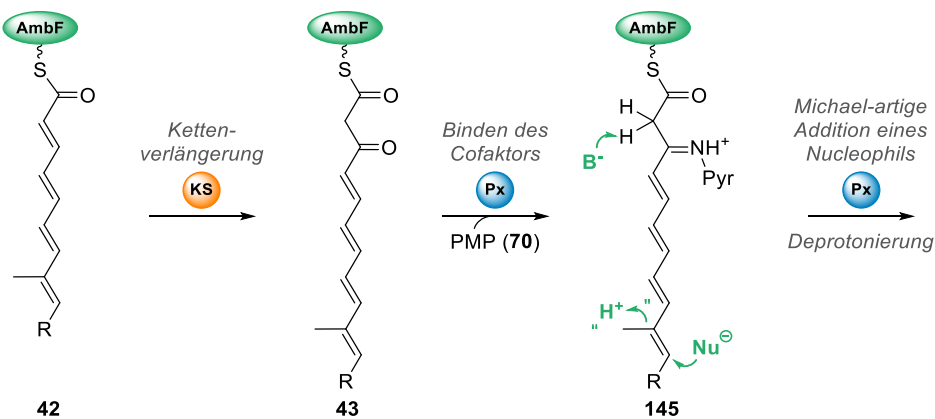
Schema 69. Auszug aus der Ambruticin-Biosynthese. Die Schritte zwischen Intermediat **40** und **49** liegen noch im Dunkeln.

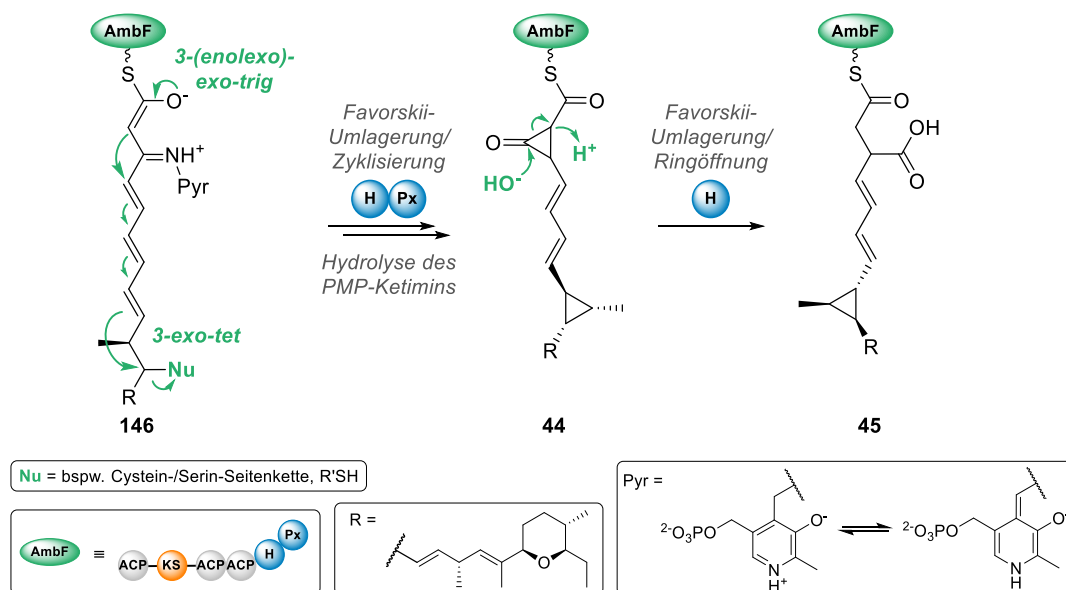
Aktuell stützen sich die Annahmen zu deren Ablauf v.a. auf die Genclusteranalyse und die Isolierung von Intermediaten aus *knockout*-Experimenten durch Reeves *et al.* und die Studien von Hahn *et al.*^[31,84,85,137] Der Ablauf der Biosynthese des mittleren Divinylcyclopropyl-Fragments ist allerdings noch unklar. Nur die Eckpunkte, das ACP-gebundene Intermediat **40** aus Modul 5 (AmbD) und das bereits abgespaltene Ambruticin J (**49**), sind bisher bekannt (Schema 69).



Schema 70. Teil der Biosynthese von **1** nach Reeves *et al.* und Hahn *et al.*^[82] Markiert ist das Divinylcyclopropan (grün) und das Kohlenstoffatom, welches sich in Markierungsexperimenten als Überbleibsel der Decarboxylierung einer formalen Acetat-Einheit (magenta) zeigt. Die AmbF-katalysierten Reaktionen (roter Kasten) sind das Thema dieser Arbeit.

Die aktuelle Hypothese von Hahn *et al.* ist, dass AmbF die Bildung des Cyclopropan katalysiert, gefolgt von AmbG welches die Entfernung einer Kohlenstoffeinheit durch AmbI ermöglicht.^[82] Die vorliegende Arbeit ist der Versuch Licht in das Dunkel der Bildung des Divinylcyclopropyl-Mittelfragments durch AmbF zu bringen (Schema 70, roter Kasten). Dieses Ziel sollte durch einen interdisziplinären Ansatz aus Strukturbiologie, Molekularbiologie und Enzymologie mit hochrealistischen Substraten erreicht werden.





Schema 71. Eigene Arbeitshypothese zur Bildung des Ambruticin-Mittelfragments durch AmbF.

Es wurde eine neue Hypothese zu den AmbF-katalysierten Reaktionen aufgestellt, welche auf den chemischen Eigenschaften der Substrate, dem Vergleich mit anderen Biosynthesen und den strukturellen Besonderheiten von AmbF beruht (Schema 71).

Nach der Bildung des β -Ketopolyens **43** in Verlängerungsreaktion mit einer noch unbekanntem *trans*-AT erfolgt die Bildung des Imins **145** mit dem Cofaktor PMP (**70**). Dieser erleichtert als *electron sink factor* die nachfolgenden Reaktionen. In einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus findet dann der Ringschluss zum Cyclopropan durch einen Elektronenshift entlang des konjugierten π -Systems statt (über **146** \rightarrow **44**). Das dabei simultan gebildete Cyclopropanon in **44** wird dann durch die Hydrolase-Domäne in einer Favorskii-artigen Umlagerung zur verzweigten Carbonsäure **45** geöffnet.

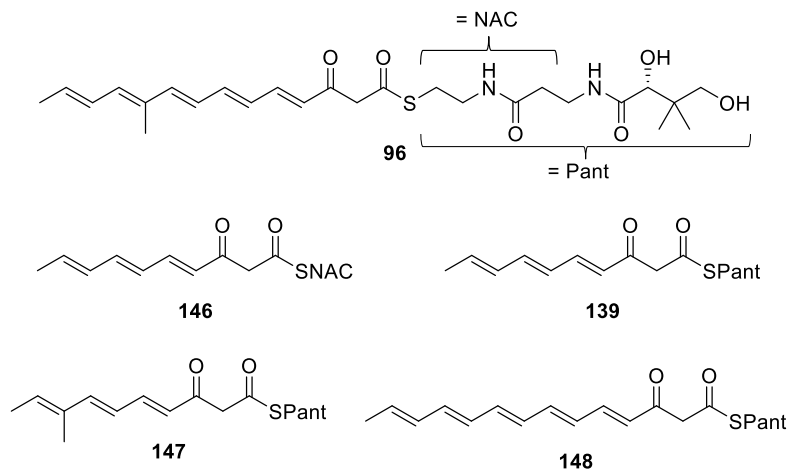
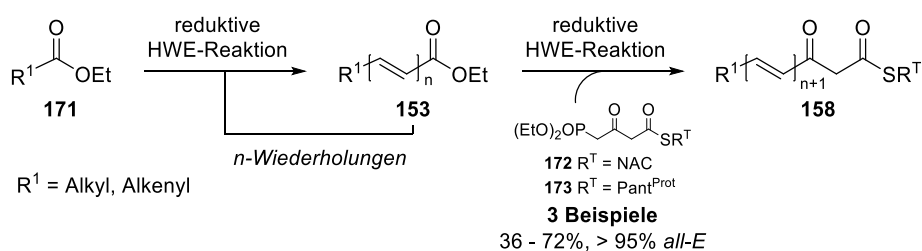


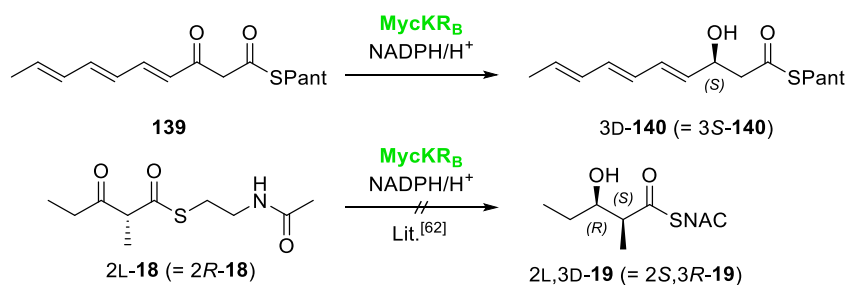
Abbildung 61. Mehrfach ungesättigte Surrogate des Substrats **43** die im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert wurden.

Zur Überprüfung der postulierten Biosynthese wurden möglichst realistische Surrogate vom ACP-gebundenen Substrat **43** synthetisiert (Abbildung 61).



Schema 72. Allgemeines Schema zur optimierten Synthese der β -Ketothioester **158** mittels rHWE-Reaktionen.

Nach ausgiebigen Optimierungsarbeiten wurde ein Protokoll für die Synthese von mehrfach ungesättigten β -Ketothioaten entwickelt (Schema 72). Mit diesem können diese schnell, flexibel und mit guten Ausbeuten sowie hervorragenden Selektivitäten dargestellt werden.^[177]



Schema 73. Untersuchung der Substratspezifität von MycKR_B hochrealistischer Substrate.^[62]

In einer ausgegliederten Untersuchung zur Stereoselektivität der Ketoreduktasedomäne MycKR_B aus der Mycotoxin-Biosynthese wurde der große Praxisnutzen der Synthese und der damit hergestellten Substrate unter Beweis gestellt (Schema 73). Hier wurde gezeigt, dass *in vitro*-Experimente präziser die natürliche Selektivität abbilden, wenn charakteristische Strukturelemente in den Surrogaten vorhanden sind.^[62,177,180] Das bekräftigt wiederum den Ansatz dieses Projekts in den *in vitro*-Versuchen zu den AmbF-Domänen möglichst realistische Substrate wie **96** einzusetzen.

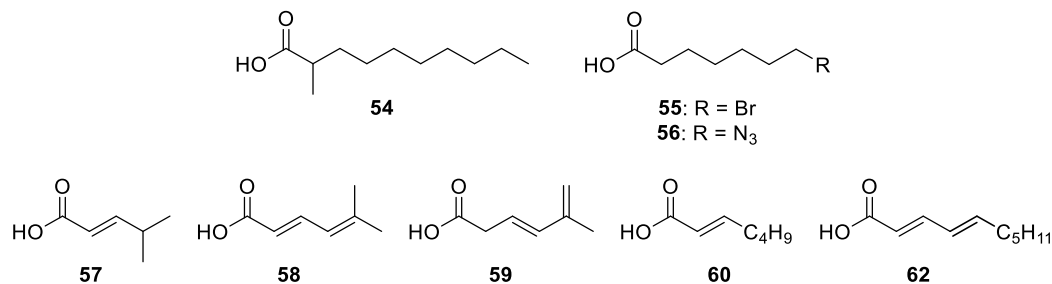


Abbildung 62. Strukturen der synthetisierten AmbG Substrate.

Für die Charakterisierung von AmbG wurden verschiedene Carbonsäuren synthetisiert (Abbildung 62). Aus der Substratselektivität und bioinformatischen Analyse lässt sich schließen, dass AmbG eine FAAL-ACP-Didomäne mit einer außergewöhnlich breiten Substrattoleranz ist. Damit konnte die Hypothese, dass die Ambruticin-Biosynthese über die Aktivierung der verzweigten Thioestercarbonsäure **45** abläuft gestützt werden.^[85]

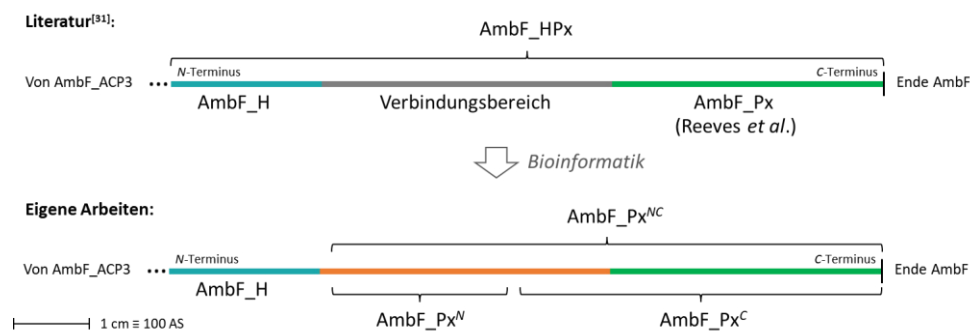
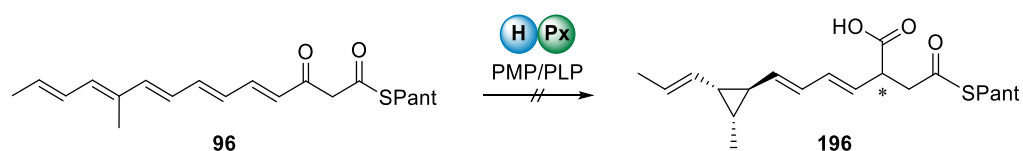


Abbildung 63. Ergebnisse der *in silico*-Untersuchungen von AmbF.

Durch bioinformatische Untersuchungen, insbesondere durch Strukturhomologiemodelle, wurden die Domänengrenzen der an der Zyklisierung beteiligten Domänen aus AmbF neu bestimmt (Abbildung 63). Auch wurde gezeigt, dass die Px-Domäne aus einer kleinen (Px^N)

und einer großen Subdomäne (Px^C) besteht, während in der Literatur nur ein C-terminaler Teil der großen Subdomäne angegeben wird.^[31]

Diese neuen Sequenzen wurden erfolgreich in pET28a(+)-Expressionvektoren kloniert. Während die heterologe Proteinproduktion der Px-Domäne in den von Reeves *et al.* gesetzten Grenzen scheiterte, konnte sowohl die HPx-Domäne, als auch die neu eingegrenzte Px^{NC}-Domäne in *E. coli* löslich hergestellt werden.



Schema 74. Enzymologische *in vitro*-Versuche mit AmbF-Domänen und dem Substratsurrogat **96**.

In den Aktivitätstests zu den AmbF-Domänen H und Px konnte keine enzymatische Aktivität mit dem Substratsurrogat **96** nachgewiesen werden. In künftigen Experimenten sollten allerdings beispielsweise noch weitere Reaktionsbedingungen oder ein erweitertes Substratspektrum getestet werden. Mit dieser Arbeit wurde das Fundament gelegt, auf dem weitere Versuche zur Aufklärung der Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments aufgebaut werden können.

5 SUMMARY

The present thesis deals with the elucidation of the ambruticin biosynthesis.

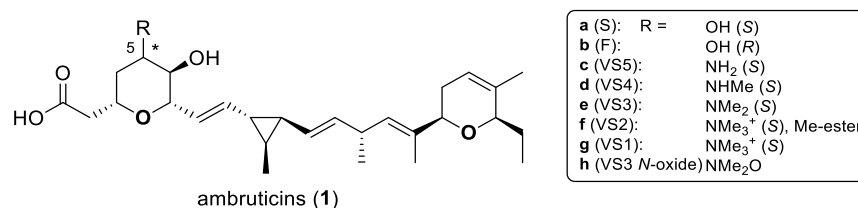
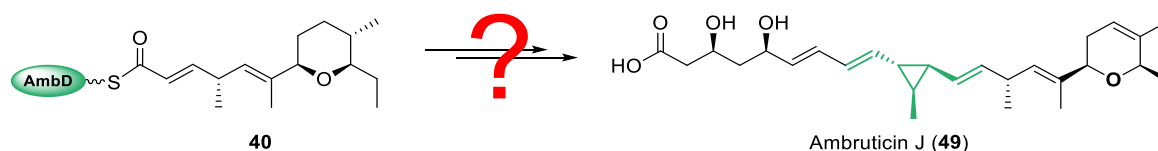


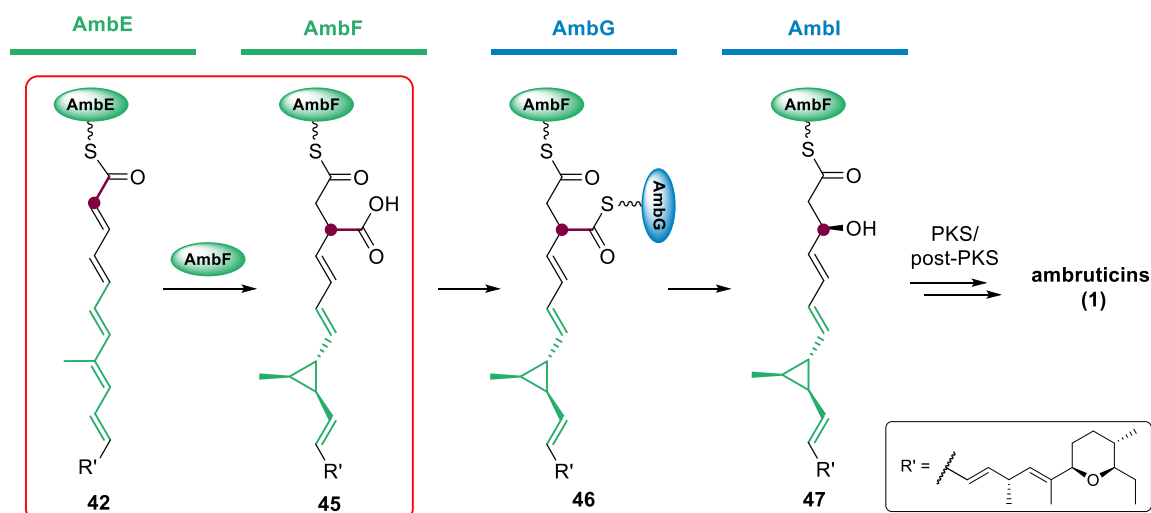
Figure 64. The ambruticins (1a-h).^[29]

Ambruticins (**1**) are polyketide natural products from the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce10, which is fungicidal by a unique mechanism. This arouses interest as novel antimycotic. However, the structural complexity makes industrial synthesis difficult (figure Figure 64). This complexity is based on an extraordinary biosynthesis.



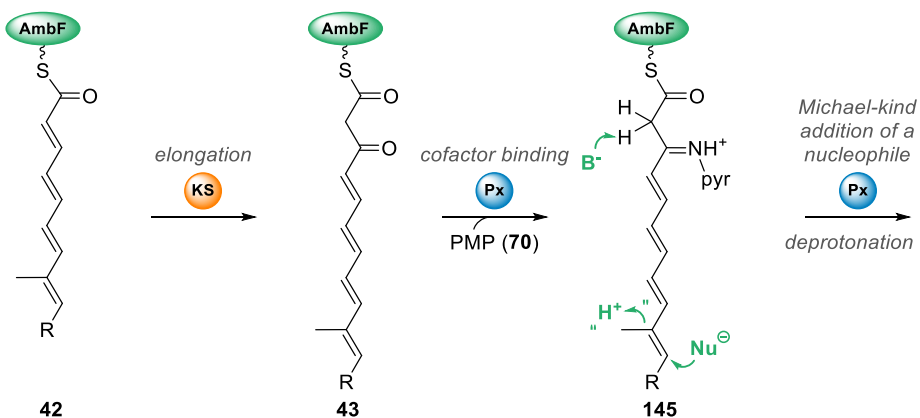
Scheme 75. The steps between the ambruticin intermediates **40** and **49** are still enigmatic.

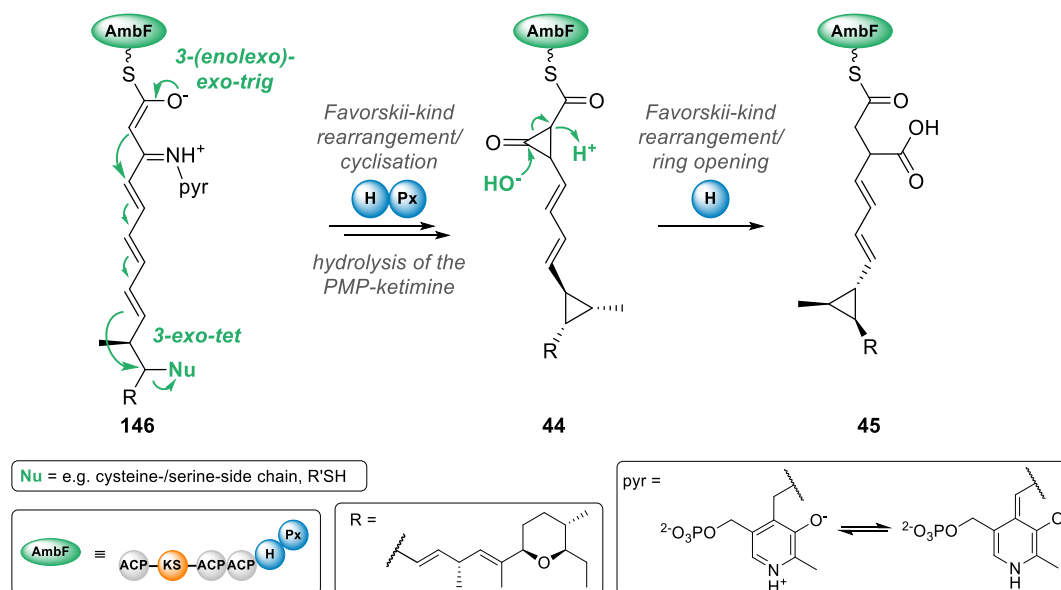
The proposed biosynthetic mechanism is evolved from gene cluster analysis, the isolation of intermediates from knockout strains by Reeves *et al.* and enzymological studies by Hahn *et al.*^[31,84,85,137] However the biosynthesis of the middle divinylcyclopropyl fragment is currently completely unknown (scheme Scheme 75, green). Only the surrounding cornerstones, the ACP-bound intermediate **40** from module 5 (AmbD) and ambruticin J (**49**), are known so far.



Scheme 76. Excerpt from the ambruticin (**1**) biosynthesis according to and Hahn *et al.*^[82] The middle fragment is marked in green and the remnant carbon atom of a formal acetate unit, in magenta.

The current hypothesis by Hahn *et al.* is that AmbF catalyzes the formation of the cyclopropane, subsequently AmbG enables the removal of a carbon moiety by AmbI.^[82] The present work was an attempt to enlighten the formation of the divinylcyclopropyl middle fragment by AmbF (scheme Scheme 76, red box). This should be achieved by an interdisciplinary approach from structural biology, molecular biology, and enzymology with highly realistic substrate surrogates.





Scheme 77. Hypothesis on the formation of the ambruticin middle fragment by AmbF.

A new hypothesis on the AmbF-catalyzed reactions was put forward, based on the chemical properties of the substrates, the comparison with recently reported biosyntheses and structural peculiarities of AmbF (scheme Scheme 77).

After an elongation of **42** to the β -ketopolyene **43** via a trans-AT the formation of an imine (**145**) with the cofactor PMP (**70**) takes place, facilitating the subsequent reactions as an *electron sink factor*. The cyclopropane is built via an addition-elimination mechanism by an electron shift along the conjugated π -system (via **146** \rightarrow **44**). The simultaneously formed cyclopropanone **44** is then opened to the branched carboxylic acid **45** in a Favorskii-kind rearrangement by the hydrolase domain.

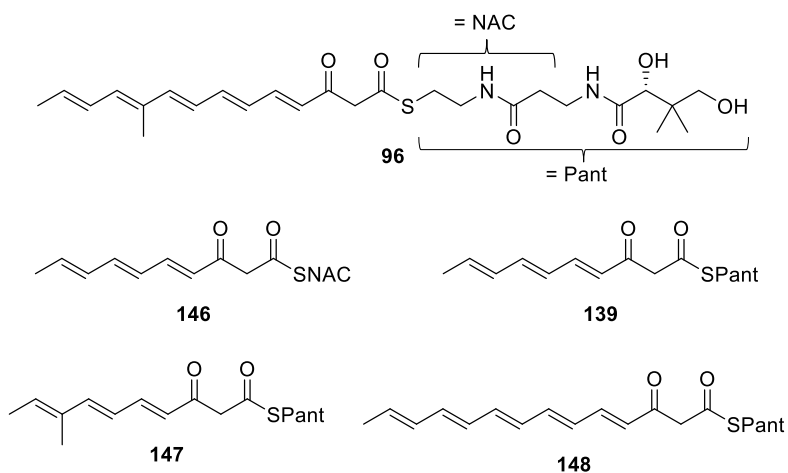
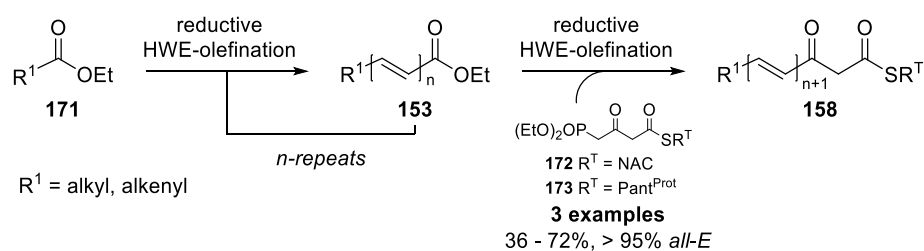


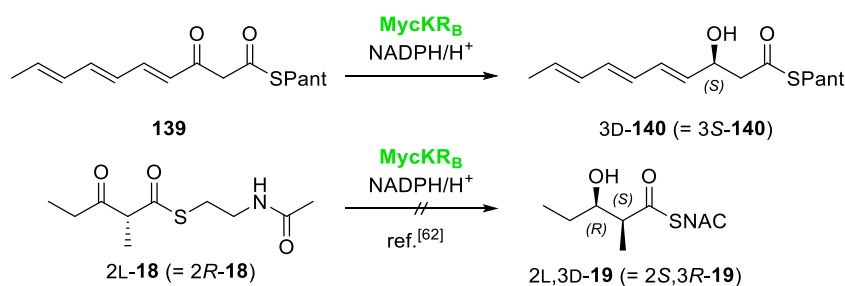
Figure 65. Polyunsaturated surrogates of the substrate **43**.

To examine the postulated biosynthesis highly realistic surrogates of the ACP-bound substrate **43** were synthesized (figure Figure 65)



Scheme 78. General scheme of the syntheses of β -keto thioesters **158** by rHWE-reaction.

Through extensive optimization work, a protocol for the synthesis of polyunsaturated β -keto-thioesters could be developed. (scheme Scheme 78). It provides access to these compounds in a facile, versatile and step-economic manner with good overall yields and excellent stereoselectivities.^[177]



Scheme 79. Examination of the substrate selectivity of MycKR_B utilizing highly realistic substrate surrogates.^[62]

In an outsourced study on the stereoselectivity of ketoreductase domain MycKR_B from mycotoxin biosynthesis, the great benefit of the synthesis was demonstrated (scheme Scheme 79). Here it was shown that *in vitro* experiments more precisely reflect the natural selectivity when characteristic structural elements are present in the surrogates.^[62,177,180] This strengthens the approach of this project using most adapted substrates like **96** for the *in vitro* assays of the AmbF domains.

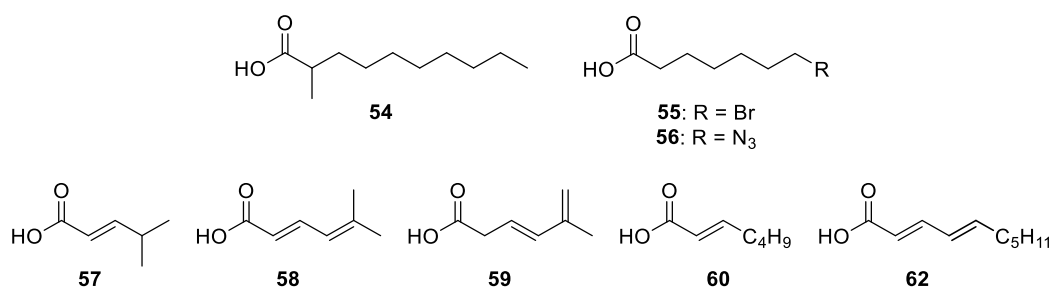


Figure 66. Structures of the AmbG substrates.

Various carboxylic acids were synthesized for the characterization of AmbG (figure Figure 66). From substrate selectivity and bioinformatic analysis, it was concluded that AmbG is a FAAL-ACP didomain with exceptionally broad substrate tolerance. This supported the hypothesis that ambruticin biosynthesis proceeds via activation of the branched thioester carboxylic acid **45**.^[85]

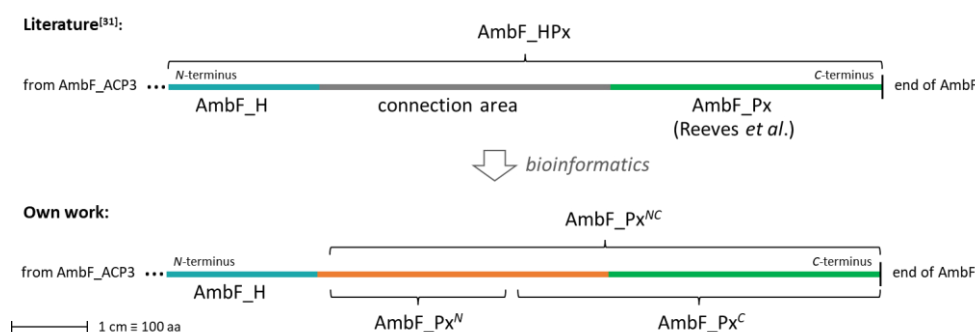
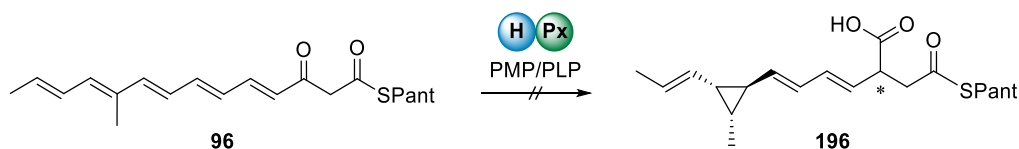


Figure 67. Results of the *in silico* investigation of AmbF.

The boundaries of the AmbF domains were redetermined by bioinformatic analysis (figure Figure 67). It was shown that the Px domain consists of a small (Px^N) and a large (Px^C) subdomain, while only a C-terminal part of the large subdomain is reported in literature.^[31]

These new sequences were successfully cloned into expression vectors. While the heterologous protein production of the Px domain according to domain boundaries defined by Reeves *et al.* failed, both the HPx and the newly assigned Px^{NC} domain were obtained soluble from *E. coli*.



Scheme 80. Enzymologic *in vitro* tests of the AmbF domains with the substrate surrogate **96**.

In the activity tests no significant enzymatic effect of the AmbF domains H and Px on the substrate surrogate **96** was observed (scheme Scheme 80). In future experiments, for example,

other reaction conditions or an extended range of substrates can be tested as well as using the entire AmbF module. However, this work laid the foundation for further experiments to elucidate the biosynthesis of the ambruticin middle fragment.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 BIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE ARBEITEN

6.1.1 ARBEITSMATERIALIEN

Puffer und Medien wurden mit Chemikalien der Firmen *Alfa Aesar*, *ABCR*, *Carl Roth*, *Fisher Scientific*, *Fluka*, *Grüssing*, *Honeywell*, *Sigma-Aldrich*, *Thermo Fisher Scientific* und *VWR Chemicals* hergestellt. Deionisiertes Wasser wurde mit der Wasserreinigungsanlage B30 (*Adrona*) hergestellt. Soweit nicht anders angegeben handelt es sich um wässrige Lösungen.

Das verwendete Verbrauchsmaterial stammte von den Firmen *Brand*, *Braun*, *Carl Roth*, *Greiner Bio-One*, *Macherey Nagel*, *Merck* und *Sarstedt*. Verwendete Enzyme und der verwendete SDS-PAGE-Molekulargewichtsstandard wurden von *Thermo Fisher Scientific* erworben.

Die Hersteller und Markennamen von Reaktions- oder Reinigungskits finden sich in den jeweiligen Vorschriften.

6.1.2 ORGANISMEN UND PLASMIDE

Die für diese Arbeit verwendeten *E. coli*-Zellen wurden von *Merck Bioscience* - NOVAGEN (BL21(DE3), Tuner™(DE3)), bzw. *ThermoFisher® Scientific* - INVITROGEN (One Shot™ TOP 10) bezogen.

Tabelle 10. Verwendete Organismen.

Stamm	Genotyp (Herstellerangabe)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)
<i>E. coli</i> Tuner™(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm lacYI</i> (DE3)
<i>E. coli</i> One Shot™ TOP 10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>

Die Plasmide mit den Genen aus Modul 8 der Ambruticin-PKS (*AmbF*) wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Franziska Hemmerling (pET28a(+)_{ambF}_Px, pET28a(+)_{ambF}_H und

pET28a(+)_ambF_HP x)^[164] oder aus diesen durch Klonierung selbst erstellt (pET28a(+)_ambF_P x^N , pET28a(+)_ambF_P x^C und pET28a(+)_ambF_P x^{NC}). Das Plasmid pET28a(+)_mycKRB wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Marius Schröder erstellt.^[138]

Der Leervektor für die Klonierungsarbeiten wurde von *Merck Bioscience* - NOVAGEN bezogen. Für die Coexpression mit Chaperonen wurde das Chaperonplasmidset von *Takara Bio Inc* mit den Plasmiden pG-KJE8 (*dnaK-dnaJ-grpE-groES-groEL*), pGro7 (*groES-groEL*), pKJE7 (*groES-groEL*), pG-Tf2 (*groES-groEL-tig*) und pTf16 (*tig*) verwendet.

Tabelle 11. Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Tag	Promotor	Referenz/ Bezugsquelle
pET28a(+)_ambF_P x	Kan	N-term. His ₆	T7	Hemmerling ^[164]
pET28a(+)_ambF_H	Kan	N-term. His ₆	T7	Hemmerling ^[164]
pET28a(+)_ambF_HP x	Kan	N-term. His ₆	T7	Hemmerling ^[164]
pET28a(+)_ambF_P x^N	Kan	N-term. His ₆	T7	-diese Arbeit-
pET28a(+)_ambF_P x^C	Kan	N-term. His ₆	T7	-diese Arbeit-
pET28a(+)_ambF_P x^{NC}	Kan	N-term. His ₆	T7	-diese Arbeit-
pET28a(+)_mycKRB	Kan	N-term. His ₆	T7	Schröder ^[138]
pET28a(+) [Leervektor]	Kan	–	T7	<i>Merck Bioscience</i> - NOVAGEN
pG-KJE8	Cm	–	<i>araB, P_zt-1</i>	TAKARA Bio Inc.
pKJE7	Cm	–	<i>araB</i>	TAKARA Bio Inc.
pG-Tf2	Cm	–	<i>P_zt-1</i>	TAKARA Bio Inc.

6.1.3 OLIGONUKLEOTIDE

Die für die PCR verwendeten Oligonukleotide wurden von *Sigma-Aldrich* in *desalted*-Qualität bezogen. Die Schmelzpunkte der Oligonukleotide wurden mit dem Programm SERIAL CLONER von *SerialBasics*^[181] berechnet.

Tabelle 12. Verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung (Restriktionsschnittstelle)	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]
<i>Px^N_fwd</i> (NdeI)	ATCGTCATATGACCGCACCAGCCCGT	71.0
<i>Px^N_rev</i> (EcoRI)	GCACCGAATTCTTATTCTTCCGGCTGACG	71.8
<i>Px^C_fwd</i> (NdeI)	GTAGCCATATGATGGCAGGTCCTGC	69.1
<i>Px^C_rev</i> (EcoRI)	CGGCTGAATTCTTAGGTGGTTTTGAAACC	69.0
<i>T7_fwd</i>	TAATACGACTCACTATAGGG	54.3
<i>T7_rev</i>	GCTAGTTATTGCTCAGCG	53.8

6.1.4 PUFFER UND MEDIEN

Alle Nährmedien und Puffer wurden vor Verwendung autoklaviert. Lösungen hitzelabiler Substanzen wurden über 0.45 µm CA-Spritzenfilter oder über 0.45 µm CN-Membranfilter sterilfiltriert.

Tabelle 13. Verwendete Nährmedien:

Bezeichnung	Zusammensetzung
2TY-Medium	16 g/L Trypton 10 g/L Hefeextrakt 5 g/L NaCl
2TY-Agar	2TY-Medium 15 g/L Agar
SOC-Medium	20 g/L Trypton 5 g/L Hefeextrakt 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 25 mM MgCl ₂ 10 g/L Glucose pH = 7.0

Tabelle 14. Stammlösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ampicillin (Amp)	50 mg/mL in ddH ₂ O
Chloramphenicol (Cm)	34 mg/mL in iPrOH
Kanamycin (Kan)	60 mg/mL in ddH ₂ O
Tetracyclin (Tet)	5 mg/mL in ddH ₂ O
L-Arabinose (Ara)	50 mg/mL in ddH ₂ O
IPTG	1 M in ddH ₂ O
PMSF	100 mM in ddH ₂ O
PLP	100 mM, bzw. 5 mM in ddH ₂ O
PMP	100 mM, bzw. 5 mM in ddH ₂ O
PA·2 HCl	250 mM in ddH ₂ O
RNase	10 mg/mL in ddH ₂ O

Tabelle 15. Puffer zur Herstellung chemisch-kompetenter Zellen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Kompetenzpuffer I	50 mM CaCl ₂ 10 mM KOAc pH = 6.2
Kompetenzpuffer II	50 mM CaCl ₂ 10 mM KOAc 200 mL/L Glycerol pH = 6.2

Tabelle 16. Puffer zur Plasmidisolierung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Puffer I	50 mM Tris 10 mM EDTA pH = 8.0

Puffer II	200 mM NaOH 10 g/L SDS
Puffer III	3 M KOAc pH = 5.5

Tabelle 17. Puffer für die FPLC-Proteinreinigung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Aufschlusspuffer	30 mM Tris·HCl 500 mM NaCl 10% (w/v) Glycerol pH = 7.5
Ni-NTA-Waschpuffer	30 mM Tris·HCl 500 mM NaCl 10% (w/v) Glycerol 20 mM Imidazol pH = 7.5
Ni-NTA-Elutionspuffer	30 mM Tris·HCl 500 mM NaCl 10% (w/v) Glycerol 500 mM Imidazol pH = 7.5
SAX-Waschpuffer	20 mM TEA pH = 7.30
SAX-Elutionspuffer	20 mM TEA 1 M NaCl pH = 7.30

Tabelle 18. Lösungen für die SDS-PAGE.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Probenpuffer (4×)	20 mM DTT

Kapitel 6: Experimenteller Teil

	200 mM Tris·HCl 20% (w/v) Glycerol 8% (w/v) SDS 0.8% (w/v) Bromphenolblau
5% Sammelgel	17% (v/v) Acrylamid-Bisacrylamid-Lsg. (19:1, 30%) 62.5 mM Tris·HCl (pH = 6.8) 0.1% (w/v) SDS 0.1% (v/v) TMEDA 0.1% (w/v) APS
8% Trenngel	27% (w/v) Acrylamid-Bisacrylamid-Lsg. (19:1, 30%) 390 mM Tris·HCl (pH = 8.8) 0.1% (w/v) SDS 0.04% (v/v) TMEDA 0.1% (w/v) APS
12% Trenngel	40% (w/v) Acrylamid-Bisacrylamid-Lsg. (19:1, 30%) 390 mM Tris·HCl (pH = 8.8) 0.1% (w/v) SDS 0.04% (v/v) TMEDA 0.1% (w/v) APS
Tris-Glycin-Puffer (10×)	250 mM TRIS 1.92 M Glycin 1% (w/v) SDS
Fixierlösung	50% (v/v) EtOH 10% (v/v) AcOH
Färbelösung	5% (v/v) EtOH 7.5% (v/v) AcOH 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
Entfärbelösung	25% (v/v) iPrOH 10% (v/v) AcOH

Tabelle 19. Lösungen für die Protein-MS-MS-Analyse

Bezeichnung	Zusammensetzung
MeCN	100% MeCN
NH ₄ HCO ₃	100 mM, bzw. 25 mM NH ₄ HCO ₃ in ddH ₂ O
MeCN/NH ₄ CO ₃ 1:1	50% (v/v) MeCN 50% (v/v) 100 mM NH ₄ HCO ₃
DTT	10 mM DTT in 100 mM NH ₄ HCO ₃
IAA	55 mM Iodacetamid in 100 mM NH ₄ HCO ₃
Trypsin	20% (w/v) Trypsin 0.01% (v/v) HCO ₂ H

Tabelle 20. Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese.

Bezeichnung	Zusammensetzung
TAE-Puffer	40 mM Trisacetat 1 mM EDTA pH = 8.0

Tabelle 21. Lösungen für Enzymaktivitätstests.

Bezeichnung	Zusammensetzung
KP _i -Puffer	50 mM K ₂ HPO ₄ pH = 7.6
KP _i -PLP-Puffer	50 mM K ₂ HPO ₄ 50 μM PLP pH = 7.6
HEPES-Puffer	50 mM HEPES pH = 7.6
MycKR _B -Reaktionspuffer	150 mM HEPES 100 mM NaCl 10 Vol.-% Glycerol

	pH = 7.2
L-Glutamat	100 mM in Reaktionspuffer
L-Aspartat	100 mM in Reaktionspuffer
L-Alanin	100 mM in Reaktionspuffer
Aminosäuremix	je 33.3 mM Glu, Asp und Ala in Reaktionspuffer

6.1.5 GERÄTE

Tabelle 22. Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Kühlzelle (4 °C) TECTOCELL COMPACT	Viessmann
Analysenwaage AES-200-4C	Kern
Chromatographiekühlschrank (15 °C) UNICHROMAT 900	Uniequip
Präzisionswaage EW 200-3NM	Kern
Flüssigkeitschromatograph ACQUITY UPLC®	Waters
Flüssigkeitschromatographiesystem (FLPC) ÄKTA™ PURE	GE Healthcare Life Science
Horizontales Elektrophoresesystem PERFECTBLUE™ MIDI S	Peqlab (VWR)
Horizontales Elektrophoresesystem PERFECTBLUE™ MINI M	Peqlab (VWR)
Horizontales Elektrophoresesystem PERFECTBLUE™ MINI S	Peqlab (VWR)
Inkubationsschüttler THERMO SCIENTIFIC™ MAXQ™	Thermo Fisher Scientific
Kolbenhubpipetten PIPETMAN® Classic	Gilson
Kolbenhubpipetten Research® Plus	Eppendorf
Pipettierhilfe PIPETUS®	Hirschmann
Labornetzgerät PEQPOWER 300	Peqlab (VWR)
Magnetrührer MR HEI-TEC	Heidolph
Mikrowellenofen R322STWE	Sharp
Mikrozentrifuge (1.5/2 mL) MICRO STAR 17R	VWR
Minizentrifuge (0.2/0.5/1.5/2.0 mL) SPROUT®	Heathrow Scientific
Multifunktionslesegerät für Mikrotiterplatten VARIOSCAN® LUX	Thermo Fisher Scientific
pH-Messgerät LAB 855	SI Analytics
Rotationsverdampfer	Heidolph

Kapitel 6: Experimenteller Teil

Sicherheitswerkbank MSC-ADVANTAGE™ 1.8	<i>Thermo Fisher Scientific</i>
Standautoklav SYSTEC V-65	<i>Systec</i>
Stickstoffgenerator NGM-11 LCMS	<i>CMC Instruments</i>
Temperierter Mischer ThermoMixer® C	<i>Eppendorf</i>
Temperierter Mischer ThermoMixer® Comfort	<i>Eppendorf</i>
Thermocycler PEQSTAR	<i>Peqlab (VWR)</i>
Tiefkühlschrank (−20 °C) GNP 2666-20	<i>Liebherr</i>
Trockenschrank UN160	<i>Memmert</i>
Ultraschall-Homogenisator SONOPULS HD 3100	<i>Bandelin Electronic</i>
Ultratiefkühlschrank (−80 °C) U410	<i>Eppendorf</i>
Vakuumkonzentrator CONCENTRATOR PLUS	<i>Eppendorf</i>
Vertikales Elektrophoresesystem PERFECTBLUE™ TWIN M	<i>Peqlab (VWR)</i>
Wasserreinigungsgerät B30	<i>Adrona</i>
Wippschüttler RK-1D	<i>Witeg</i>
Zelldichtemessgerät ULTROSPEC™ 10	<i>Biochrom Harvard</i>

6.1.6 ALLGEMEINE METHODEN

Kultivierung von *E. coli*

Übernachtkulturen (ÜNK) wurden durch Inokulation von 2TY-Medium (6 mL, Tabelle 13) mit dem entsprechenden Antibiotikum (0.1% [v/v] Stammlösung) mit einer einzelnen Kolonie oder einer kleinen Menge Dauerkultur und nachfolgender Inkubation bei 37 °C und 180 rpm im Inkubationsschüttler hergestellt.

Um selektierbare Einzelkolonien aus dicht bewachsenen Petrischalen oder einer Flüssigkultur zu erhalten, wurde ein Verdünnungsausstrich auf 2TY-Agar (Tabelle 13) und anschließender Inkubation bei 37 °C über Nacht durchgeführt.

Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

2TY-Medium (10 mL) mit dem entsprechenden Antibiotikum (0.1% [v/v] Stammlösung) wurden mit einer ÜNK (250 µL) inokuliert und bei 37 °C und 180 rpm für 3 h inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend für 10 min bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde bei 0 °C in Kompetenzpuffer I (10 mL) resuspendiert und 1 h bei 0 °C inkubiert. Es wurde für 10 min bei 3500 rpm und 4 °C zentrifugiert und in Kompetenzpuffer II (1 mL) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte (CO₂(s)-iPrOH) Reaktionsgefäße zu je 50 µL aliquotiert und im Anschluss mit N₂(l) tiefgefroren und bei -80 °C im Ultratiefkühlschrank gelagert.

Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

Chemisch-kompetente Zellen wurden bei 0 °C mit Plasmidlösung (2 µL) versetzt und 30 min bei 0 °C inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 45 s. Der Transformationsansatz wurde 30 min bei 0 °C inkubiert, mit SOC-Medium (500 µL) versetzt und 1 h bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurde bei 3500 rpm und RT für 1 min zentrifugiert und 475 µL des Überstands abgenommen. Das Pellet wurde im restlichen Überstand resuspendiert, auf 2TY-Agar-Nährböden mit dem entsprechenden Antibiotikum (0.1% [v/v] Stammlösung) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden zur Herstellung von ÜNK verwendet.

Herstellung von Dauerkulturen

Es wurde gemäß der allg. Arbeitsvorschrift zur Kultivierung von *E. coli* eine ÜNK hergestellt und 750 µL der Kultur 1:1 mit 50% Glycerol versetzt. Die Mischung wurde im Ultratiefkühlschrank auf -80 °C gekühlt und bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Plasmidisolation

Plasmidisolation durch alkalische Lyse

Es wurde gemäß der allg. Arbeitsvorschrift für die Kultivierung von *E. coli* eine ÜNK hergestellt und 3 mL der Kultur bei 3500 rpm für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Sediment erneut zentrifugiert und Reste des Mediums entfernt. Das Pellet wurde in Puffer I (200 µL) mit RNase (2 µL, final 100 ng/µL) resuspendiert, und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von Puffer II (200 µL) wurde 2 min bei RT inkubiert, mit Puffer III (200 µL) versetzt und durch dreimaliges vorsichtiges Invertieren vermischt. Es wurde ein Tropfen CHCl_3 zugegeben und 5 min bei 0 °C inkubiert. Die Phasen wurden durch Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C für 3 min getrennt, die wässrige Phase abgenommen und mit iPrOH (350 µL) versetzt. Nach Zentrifugation für 20 min bei 13000 rpm und 4 °C wurde das Pellet mit EtOH (70 Vol.-%, 400 µL) gewaschen und anschließend im Vakuumkonzentrator bei 30 °C und vermindertem Druck getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in ddH₂O (40 µL) gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C im Tiefkühlschrank gelagert.

Plasmidisolation mittels Kit

Die Plasmidisolation mittels QIAPREP SPIN MINIPREP Kit (*Qiagen*) erfolgte nach Herstellerangaben.

Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte nach Lit.^[182] am Multifunktionslesegerät für Mikrotiterplatten VARIOSCAN® LUX auf einer µDROP™-Platte (*Thermo Fisher Scientific*, nominale Pfadlänge = 0.051 cm) durch die Messung der Absorption bei $\lambda = 260\text{ nm}$. Die Reinheit wurde mithilfe der Koeffizienten A_{260}/A_{280} (Verunreinigung mit Proteinen), bzw. A_{260}/A_{230} (Verunreinigung mit Zuckern, Salzen und Phenolen) bestimmt.

Sequenzierung der Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde mit den Primern *T7_fwd*, bzw. *T7_rev* für pET28a(+)-Plasmide, bzw. für pET28a(+)-*ambF_Px^{NC}* mit den Primern *Px^N_rev* und *Px^C_fwd* (Tabelle 12) sequenziert. Die Konzentrationen und Verhältnisse wurden gemäß Richtlinien der jeweiligen Firma von *Eurofins Genomics GmbH*, bzw. *Microsynth AG* eingestellt.

Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion zur Amplifizierung der Fragmente *Px^N*, *Px^C* und *Px^{NC}* aus pET28a(+)-*HPx* erfolgte mit der THERMO SCIENTIFIC™ PHUSION™ HIGH-FIDELITY DNA-Polymerase und den entsprechenden Puffern (*Thermo Fisher Scientific*). Die verwendeten Reagenzien und Enzyme sind in Tabelle 23 gezeigt.

Tabelle 23. Für die PCR verwendete Reagenzien.

Reagenz (c(Stammlösung))	c(final)	V [μ L]
GC-Puffer (5 \times)	1 \times	10
dNTPs (10 mM, á 2.5 mM)	200 μ M (á 50 μ M)	1
Primer fwd (10 μ M)	0.5 μ M	2.5
Primer rev (10 μ M)	0.5 μ M	2.5
Template-DNA (250 ng/ μ L)	25 ng/ μ L	5
Polymerase (2 U/ μ L)	0.02 U/ μ L	0.5
ddH ₂ O		ad 50

Das allgemeine Temperatur- und Zeitprogramm ist in Tabelle 24 gezeigt. Die Dauer der Amplifikation wurde der Länge des Fragments (1.5 kbp/min) angepasst, als Temperatur zum Binden der Primer wurde der Mittelwert der Schmelzpunkte der jeweils verwendeten Primer gewählt.

Tabelle 24. Allgemeines Temperatur-/Zeitprogramm der PCR.

Schritt	T [°C]	t [s]	Zyklen
Init. Denaturierung	98	60	–
Denaturierung	98	30	
Hybridisierung		30	35
Elongation	72	40/kbp	
Finale Elongation	72	600	–
Lagerung	4	∞	–

Reinigung von PCR-Amplifikaten

Die Reinigung der PCR-Amplifikate erfolgte mit dem NUCLEOSPIN™ GEL AND PCR CLEAN-UP-Kit (*Macherey-Nagel*) nach Herstellerangaben.

Restriktionshydrolyse des Leervektors

Zur Restriktionshydrolyse wurden die THERMO SCIENTIFIC™ FASTDIGEST™ Restriktionsenzyme EcoRI und NdeI (*Thermo Fisher Scientific*) mit den entsprechenden Puffern verwendet. Die Konzentration des Leervektors wurde gemäß der allg. Arbeitsvorschrift bestimmt und auf 100 ng/μL angepasst. Die Kontrolle der Reaktionsansätze erfolgte abschließend mittels Agarosegelelektrophorese.

Tabelle 25. Für die Restriktionshydrolyse des Leervektors verwendete Reagenzien.

Reagenz (c(Stammlösung))	c(final)	V [μL]
FD-Puffer (10×)	1×	10
Leervektor (variabel)	100 ng/μL	Variabel
FASTDIGEST™ NdeI	1/20	5
FASTDIGEST™ EcoRI	1/20	5
ddH ₂ O		ad 100

Der Restriktionsansatz (Tabelle 25) wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Restriktionsenzyme wurden im Anschluss bei 80 °C für 5 min deaktiviert.

Restriktionshydrolyse der PCR-Amplifikate

Zur Restriktionshydrolyse wurden die THERMO SCIENTIFIC™ FASTDIGEST™ Restriktionsenzyme EcoRI, NdeI sowie DpnI (*Thermo Fisher Scientific*) mit den entsprechenden Puffern verwendet. Die Konzentration des Amplifikats wurde gemäß der allg. Arbeitsvorschrift zur Messung der DNA-Konzentration bestimmt. Die Reaktionsmischung (Tabelle 26) wurde bei 37 °C für 15 min inkubiert und die Restriktionsendonukleasen anschließend bei 80 °C für 5 min deaktiviert. Die Kontrolle der Reaktionsansätze erfolgte abschließend mittels Agarosegelelektrophorese.

Tabelle 26. Für die Restriktionshydrolyse der PCR-Amplifikate verwendete Reagenzien.

Reagenz (c(Stammlösung))	c(final)	V [μ L]
FD-Puffer (10 \times)	1 \times	5
Amplifikat (variabel)	20 ng/ μ L	Variabel
FASTDIGEST™ DpnI	1/50	1
FASTDIGEST™ NdeI	1/20	2.5
FASTDIGEST™ EcoRI	1/20	2.5
ddH ₂ O		ad 50

Ligation des Leervektors und der Amplifikate

Für die Ligation wurde die THERMO SCIENTIFIC™ T4-DNA-Ligase und die dazu gehörigen Puffer (*Thermo Fisher Scientific*) verwendet. 100 ng des Leervektors nach Restriktionshydrolyse wurden im Verhältnis von 1:7 mit dem Insert zur Reaktion gebracht. Das Verhältnis wurde dabei anhand der Länge der jeweiligen Komponenten berechnet. Der Reaktionsansatz (Tabelle 27) wurde bei 8 °C für 15 h inkubiert und die verwendete Ligase anschließend bei 80 °C für 5 min deaktiviert.

Tabelle 27. Für die Ligation verwendete Reagenzien.

Reagenz (c(Stammlösung))	c(final)	V [μ L]
T4-Ligase-Puffer (10 \times)	1 \times	2
Leervektor linear (100 ng/ μ L)	5 ng/ μ L	1
Insert	Variabel	Variabel
T4-DNA-Ligase (5 U/ μ L)	0.125 U/ μ L	0.5
ddH ₂ O		ad 20

Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob die einzelnen Klone das gewünschte Gen tragen, wurden Kolonie-PCR unter Verwendung von THERMO SCIENTIFIC™ *Taq*-DNA-Polymerase und den dazugehörigen Puffern und Cofaktoren (*Thermo Fisher Scientific*) durchgeführt. Als Primer wurden entweder sequenzspezifische Oligonukleotide oder die Primer *T7_fwd* und *T7_rev* verwendet. Dafür wurde mit einer Pipettenspitze eine kleine Menge der Einzelkolonie in ein PCR-Reaktionsgefäß übertragen und in Mastermix M1 (8.65 μ L, Tabelle 28) suspendiert. Der Reaktionsansatz wurde im Thermocycler vorinkubiert (Tabelle 29) und anschließend mit Mastermix M2 (1.25 μ L) und der *Taq*-DNA-Polymerase (0.1 μ L, final 0.05 U/ μ L) versetzt.

Tabelle 28. Reagenzien für die Kolonie-PCR.

Reagenz (c(Stammlösung))	c(final)	V [μ L]
Mastermix M1		
Taq-Puffer + KCl (10 \times)	1 \times	1
MgCl ₂ (50 mM)	2 mM	0.4
ddH ₂ O		ad 8.65
Mastermix M2		
dNTPs (10 mM, á 2.5 mM)	0.2 mM (á 0.05 mM)	0.2
Primer fwd (10 μ M)	0.5 μ M	0.5
Primer rev (10 μ M)	0.5 μ M	0.5
ddH ₂ O		ad 1.25
Polymerase		
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ μ L)	0.01 U/ μ L	0.1 μ L

Die Amplifizierung fand im Thermocycler statt (Tabelle 29). Die Dauer der Amplifikation wurde der Länge des Fragments (0.67 kbp/min) angepasst, als Temperatur zum Binden der Primer wurde der Mittelwert der Schmelzpunkte der jeweils verwendeten Primer gewählt.

Tabelle 29. Temperaturprogramm der Kolonie-PCR.

Schritt	T [°C]	t [s]	Zyklen
Aufschluss			
Vorbereitung	20	120	–
Denaturierung	95	300	–
Lagerung	18	∞	–
Amplifizierung			
Init. Denaturierung	95	180	–
Denaturierung	95	30	30
Hybridisierung		30	
Elongation	72	90/kbp	
Finale Elongation	72	600	–
Lagerung	4	∞	–

Abschließend wurden die Proben mittels Agarosegelelektrophorese auf die Anwesenheit der Amplifikate hin überprüft.

Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen Trennung der DNA-Fragmente wurden Agarosegele (1% [w/v] in TAE-Puffer) in einem horizontalen Elektrophoresesystem (PERFECTBLUE™ MIDI S, MINI M ODER MINI S, *Peqlab (VWR)*) verwendet. Zur Sichtbarmachung der DNA wurde der noch warmen Agaroselösung der nicht-karzinogene Fluoreszenzfarbstoff MIDORI GREEN (*Nippon Genetics*) in einer Konzentration von 0.01 Vol.-% zugegeben. Die Probe wurde mit 6× THERMO SCIENTIFIC™ DNA LOADING DYE oder 6× THERMO SCIENTIFIC™ TRITRACK (*Thermo Fisher Scientific*) versetzt. Als Größenstandard diente der GENE RULER 1 KB (*Thermo Fisher Scientific*). Die Spannung und Dauer der Elektrophorese sind bei den jeweiligen Gelbildern angegeben. Die Banden wurden nach Trennung durch UV-Licht detektiert.

Heterologe Genexpression in *E. coli*

Zur heterologen Genexpression wurde 2TY-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (0.1% [v/v]) mit 2% (v/v) ÜNK inokuliert und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0.6 inkubiert. Es wurde mit IPTG (0.1 – 1% [v/v]) induziert und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Bei Verwendung der Plasmide mit den Px-Genen aus *ambF* wurde dem Medium zusätzlich PLP, PMP und/oder PA·HCl zugesetzt. Bei Cotransformation mit TAKARA-Chaperon-Plasmiden wurde die Hauptkultur vor Inkubation mit 0.1% (v/v) Tet und 1% (v/v) Ara versetzt. Nach erfolgter Inkubation wurde 15 min bei 4000 rpm und 4 °C sedimentiert. Soweit sie nicht unmittelbar verwendet wurden, wurden die Pellets bei –20 °C gelagert.

Ultraschall-Zellaufschluss

Pelletierte *E. coli*-Zellen wurden in Aufschlusspuffer (10 mL je 1 g Pellet) resuspendiert und mithilfe der Ultraschallsonde SONOREX RK 106 (*Bandelin*) bei 45% Amplitude für 15 min bei 0 °C mit 30 s-Pulsen und anschließenden 30 s-Wartezeit lysiert. Die Zelltrümmer wurden bei 10000 rpm und 4 °C für 30 min sedimentiert, das Lysat mit einer Spritze abgenommen und über einen 0.45 µm CA-Spritzenfilter filtriert.

Proteinreinigung mittels FPLC

Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Nach Aufschluss der Zellen wurden rekombinante Proteine mit einem *N*-terminalen His₆-Tag mit einem FPLC ÄTKA PURE™-System (*GE Healthcare*) an 5 mL HISTRAP™ FF-Ni-NTA-Affinitätssäulen (*GE Healthcare*) gereinigt. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 17 gelistet.

Nach Äquilibrieren wurde die filtrierte Probe aus einer 50 mL-Probenschleife mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Nach Waschen mit Waschpuffer (5 mL/min) bis zu einer Absorption <50 mAu wurde bei einem Gradienten von 0 bis 100% Elutionspuffer (5 mL/min, 5 CV) und anschließend 100% Elutionspuffer (2 CV) in 1 mL-Fractionen eluiert.

Anionenaustauschchromatographie

Bei rekombinanten Proteinen welche sich signifikant im pI von den Verunreinigungen unterscheiden wurde eine Reinigung mit einem FPLC ÄKTA PURE™-System an 5 mL HiTRAP™ Q FF-Anionenaustauschsäulen (*GE Healthcare*) vorgenommen. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 17 gelistet.

Nach Äquilibrieren der Säule mit ddH₂O (15 mL/min, 5 CV) und TEA-Waschpuffer (15 mL/min, 5 CV) wurde die filtrierte Probe aus einer 50 mL-Probenschleife mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Nach Waschen mit Waschpuffer (5 mL/min) bis zu einer Absorption <50 mAu wurde mit einer Flussrate von 5 mL/min bei einem Gradienten von 0 – 50% Elutionspuffer (5 CV), 51 – 65% Elutionspuffer (3.5 CV) und 66 – 100% (1.5 CV) eluiert. Die Säule wurde anschließend mit 100 – 0% Elutionspuffer (1 CV) gewaschen.

Gelfiltration und Konzentrierung der Proteineluate

FPLC-Eluate wurden an PD-10-Gelchromatographiesäulen (*GE Healthcare*) nach Herstellerangaben in den entsprechenden Puffer überführt. Das Aufkonzentrieren der Proteinproben erfolgte mit AMICON™ ULTRA-15-Membranzentrifugationsfiltern (MWCO = 10 kDa, *Merck Millipore*) nach Herstellerangaben.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Eine abschätzende Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Messung der Absorption bei $\lambda = 280$ nm am Multifunktionslesegerät für Mikrotiterplatten VARIOSCAN® LUX auf einer μ DROP™-Platte (*Thermo Fisher Scientific*). Der Extinktionskoeffizient ϵ_{280} wurde mit dem Onlineprogramm EXPASY PROTPARAM bestimmt.^[171]

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die verwendeten Puffer und Reagenzien sind in Tabelle 18 gelistet. Lysat- oder Eluatproben wurden mit 4× SDS-Probenpuffer versetzt, Pelletproben wurden mit ddH₂O auf das Volumen vor Zentrifugation gebracht, die unlöslichen Partikel resuspendiert und ebenfalls mit 4× SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden bei 95 °C für 10 min im THERMOMIXER®

(Eppendorf) denaturiert. Im vertikalen Elektrophoresesystem PERFECTBLUE™ TWIN M (Peqlab) wurden 8%ige oder 12%ige Trenngel, mit einem oberen Bereich aus einem 5%igem Sammelgel gegossen und das System mit Tris-Glycin-Puffer (1×) befüllt. Die Taschen wurden mit der Probe sowie THERMO FISHER™ PAGERULER™ PRESTAINED PROTEIN LADDER (10–180 kDa, Thermo Fisher Scientific) als Größenstandard beladen. Zur Fokussierung der Proben im Sammelgel wurde für 10 min eine Spannung von 125 V angelegt. Die Trennung erfolgte bei 175 V, wobei die Laufzeit von i.d.R. 90 min entsprechend des Laufverhaltens angepasst wurde. Nach Beendigung wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel in eine Kristallisierschale mit Fixierlösung (Tabelle 18) gegeben. Das Gel und die Lösung wurde in einem Mikrowellenofen (R322STWE, Sharp) zum Sieden erhitzt und anschließend auf einem Wippeschüttler des Typs RK-1D (Witeg) für 5 min geschwenkt. Die Fixierlösung wurde durch eine Coomassie Brilliant Blue R-250-Färbelösung (Tabelle 18) ersetzt. Es wurde erneut erhitzt und für 30 min geschwenkt. Nicht-gebundener Farbstoff wurde entweder mit Entfärbelösung für 30 min – 2 h, oder ddH₂O über Nacht bei RT unter Schwenken bis zur guten Sichtbarkeit der einzelnen Banden entfernt.

Analyse von Proteinen durch MS/MS

Soweit nicht anders erwähnt wurde zur Abtrennung des Überstands eine Tischzentrifuge genutzt. Das zu untersuchende Protein wurde per SDS-PAGE von Verunreinigungen abgetrennt. Die zugehörige Bande wurde ausgeschnitten und in ca. 1 mm² messende Stücke geteilt. In einem Reaktionsgefäß wurden die Gelstücke mit MeCN (500 µL) bei RT für 10 min inkubiert. Das organische Lösungsmittel wurde entfernt, MS-Puffer I (50 µL) zugegeben und 30 min bei 56 °C inkubiert. Bei RT wurden MeCN (500 µL) zugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde entfernt, die Gelstücke mit MS-Puffer II (50 µL) versetzt und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Gelstücke wurden durch wiederholtes Waschen mit MS-Puffer III (100 µL) entfärbt. Es wurde MeCN (500 µL) zugegeben und so lange inkubiert bis die Gelstücke eine weiße Färbung angenommen haben. Das organische Lösungsmittel wurde entfernt und zum tryptischen Verdau der Proteine frisch hergestellter MS-Puffer IV (50 µL) zugegeben. Nach 90 min bei 4 °C wurde weiterer frisch hergestellter MS-Puffer IV (20 µL) zugegeben. Die Probe wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es wurde für 10 min bei

10000 ×g und RT zentrifugiert. Die Probe wurde zur MS/MS-Analyse in ein neues Reagiergefäß überführt.

Die Messung wurde von Dr. A. Di Fonzo am Lehrstuhl von Prof. Steegborn (Universität Bayreuth) an einer PROMINENCE UPLC mit einem TRIPLE TOF 5600+ Massenspektrometer (*Shimadzu*) nach Trennung an einer THERMO SCIENTIFIC™ HYPERSIL™ ODS C-18 (*Thermo Fisher Scientific*) durchgeführt. Die Prozessierung der Daten wurde mit *Byonic™ Protein Metrics* vorgenommen.

6.2 ENZYMAKTIVITÄTSTESTS

6.2.1 QUALITATIVE TESTS ZU AMBF-DOMÄNEN

Die Aktivität der AmbF-Domänen wurde im Rahmen dieser Arbeit rein qualitativ untersucht. Dafür wurden in der Hauptsache photospektrometrische/-skopische Untersuchungen und massenspektrometrische Messungen durchgeführt.

Die photospektrometrischen Untersuchungen fanden mit Hilfe des temperierbaren Multifunktionslesegeräts VARIOSCAN® LUX in 96-well Mikrotiterplatten statt. Die Platten wurden dafür mit der jeweilige Reaktionslösung zu je 100 µL pro Kavität gefüllt, wobei für jede Variation eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Die Cofaktoren wurden in Reaktionspuffer vorgelegt und anschließend mit der jeweiligen Proteinlösung versetzt. Die Substratlösung wurde automatisiert mit dem Dispenser zugegeben, um die Zugabe unter Lichtausschluss und einen zeitnahen Start der Reaktion zu gewährleisten.

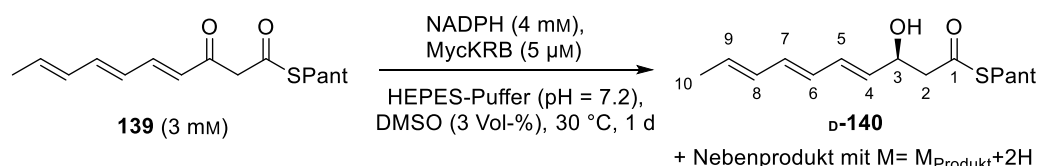
Während der Inkubation wurde die Absorption der temperierten Proben bei eingestellten Wellenlängen, bzw. die Absorptionsspektren gemessen. Teilweise wurden die Proben nach Ablauf der Inkubationszeit in Reagiergefäße überführt und mit MeCN/iPrOH 1:1 versetzt. Die wässrige Phase wurde anschließend mit fein gemörsertem NaCl gesättigt, die organische Phase abgetrennt und mit ges. NaCl aq. gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wurde das Lösungsmittel im Vakuumkonzentrator entfernt und die Probe für massenspektrometrische Messungen an der UPLC-MS in MeOH aufgenommen. Um Nebenreaktionen, bzw. Zersetzung, durch die für die Absorptionsmessung verwendete Strahlung möglichst ausschließen zu können, wurden für UPLC-MS-Messungen teils Vergleichsreaktionen in Reagiergefäßen unter Lichtausschluss im ThermoMixer® durchgeführt.

Getestet wurden AmbF_Px, AmbF_HPx sowie AmbF_Px^{NC}. Als Cofaktoren wurden PLP, PMP oder eine Kombination aus PLP und PMP sowie als Amindonor die Aminosäuren L-Glutamat, L-Aspartat und L-Alanin verwendet (Tabelle 14).

Die Ergebnisse der Aktivitätstests sind in Kapitel 3.3.4 beschrieben.

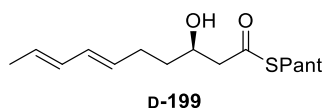
6.2.2 IN VITRO-VERSUCHE MIT MYCKR_B

Für die *in vitro*-Versuche wurde heterolog produziertes MycKR_B (*E. coli* BL21 *pET28a(+)_mycKRB*, Expression [1.0 mM IPTG, 20 °C, 1 d], Aufschluss und Reinigung gemäß allg. Arbeitsvorschriften), der β -Ketothioester **139** und der Cofaktor NADPH verwendet.



MycKR_B und NADPH wurden im ThermoMixer® bei 30 °C für 30 min in 10 mL HEPES-Puffer (s. Tabelle 21) und DMSO (3 Vol.-%) vorinkubiert. Das Substrat **139** (28 mg, 63.8 μmol) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung mit Reaktionspuffer auf ein Gesamtvolumen von 21.3 mL gebracht, um die finalen Konzentrationen von MycKR_B (5 μM , 0.17 Mol-%), NADPH (4 mM, 1.33 Äquiv.) und dem Substrat **139** (3 mM, 1.00 Äquiv.) zu erreichen. Die Mischung wurde bei 30 °C, 120 rpm für 1 d inkubiert. Das Protein wurde durch Inkubation mit Proteinase K (1 mg/mL) und CaCl₂ (1 mM) bei 30 °C für 2 h zersetzt. Die klare Lösung wurde mit ges. NaCl aq. (10 mL) versetzt und mit EtOAc (3 \times 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H₂O (2 \times 5 mL) und ges. NaCl aq. (2.5 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde entfernt, wonach ein gelbes Harz (11.0 mg) erhalten wurde, das ohne weitere Reinigung weiterverwendet wurde.

Im Rohprodukt wurde eine Verunreinigung festgestellt, die nicht isoliert und vollständig charakterisiert werden konnte. UPLC/MS-, UV/vis- und ¹H-NMR-Analysen deuteten auf den Dienyl- β -hydroxythioester **D-199** hin.



¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ [ppm] (ausgewählt Signale von **140**) = 5.76 (dq, $J = 14.9$, 6.9 Hz, 1H, 9-H), 5.63 (dd, $J = 15.0$, 6.4, 1H, 4-H), 4.67 (m, 1H, 3-H), 2.80 (dd, $J = 15.0$, 9.1 Hz, 1H, 2-H), 2.74 (dd, $J = 15.0$, 3.4 Hz, 1H, 2-H), 1.78 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, 10-H).

UPLC/MS (ESI) m/z : **140**: $[M+Na]^+$ für $C_{21}H_{34}N_2O_6S$: ber. 465.20, gef. 465.25; **199**: $[M+Na]^+$ für $C_{21}H_{36}N_2O_6S$ ber. 467.22, gef. 467.25.

UV/vis (UPLC-DAD, MeOH/H₂O ~9:1) **140**: $\lambda_{max} = 269$ nm; **199** = 228 nm.

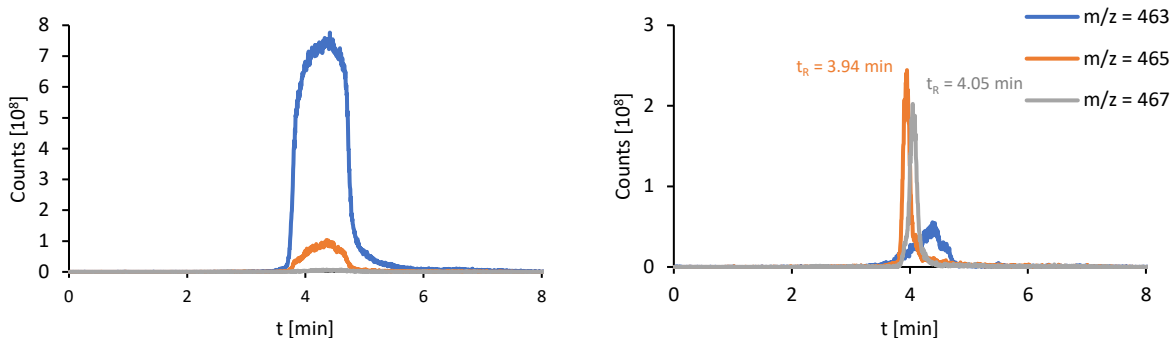


Abbildung 68. UPLC/MS-Chromatogramme vor (links) und nach (rechts) der Umsetzung des Substrats **139** mit MycKR_B und NADPH. Massenspuren des Substrats **IV-4** (blau, $[M+Na]^+ = 463$ u), Produkt **140** (orange, $[M+Na]^+ = 465$ u) und Nebenprodukt **199** (grau, $[M+Na]^+ = 467$ u).

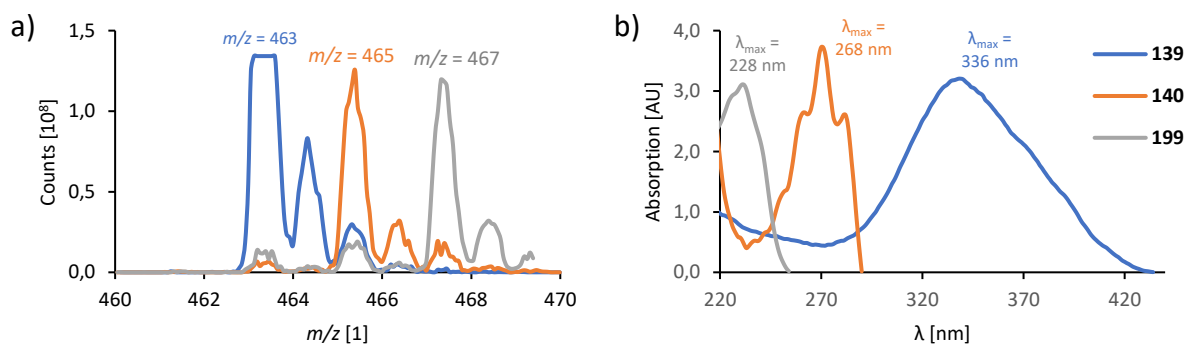


Abbildung 69. Massenspektren (ESI⁺, links) und UV/vis-Spektren (rechts) von Substrat **139** (blau), dem Produkt **140** (orange) und dem Nebenprodukt **199** (grau).

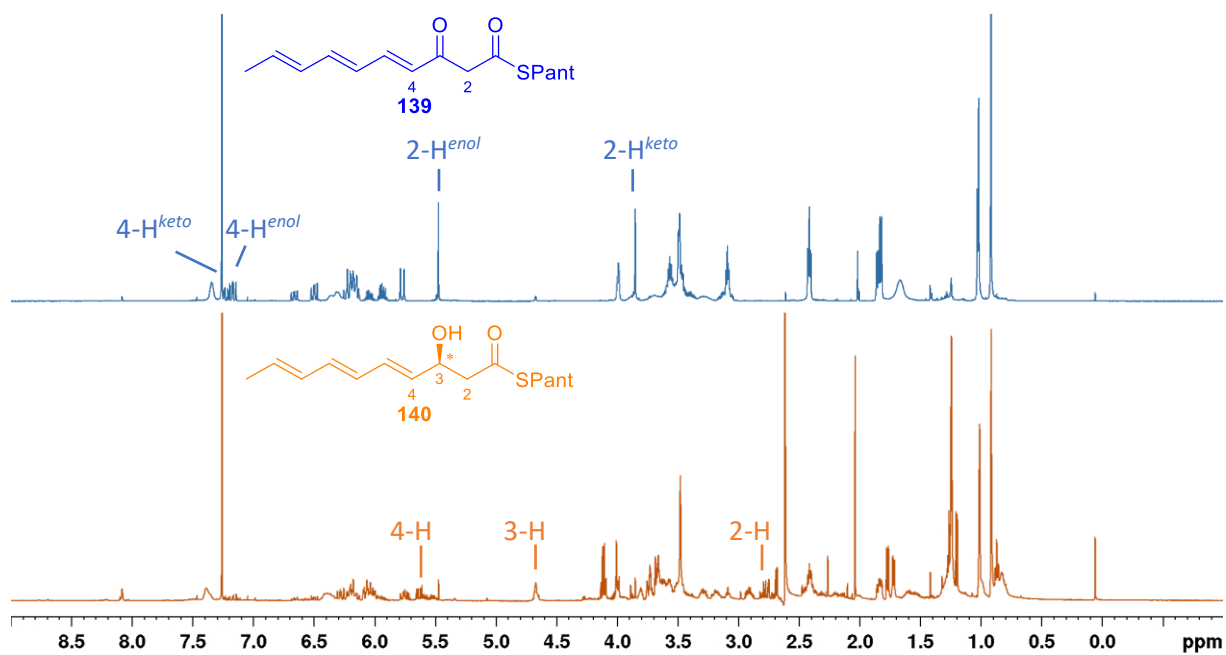


Abbildung 70. Vergleich der ¹H-NMR-Spektren (500 MHz, CDCl₃) des Substrats **139** (blau, oben) und des rohen Reaktionsprodukts der enzymkatalysierten Reduktion **140** (orange, unten).

6.3 CHEMISCHE ARBEITEN

6.3.1 ALLGEMEINE METHODEN

Vorbereitung der Versuche

Lösungsmittel und Chemikalien: Soweit nicht anders erwähnt, wurden Lösungsmittel und Chemikalien in p.A.-Qualität von ABCR, Acros Organics, Chempur, Eurisotop, Fisher Scientific, Fluorochem, Grüssing, Merck, Sigma-Aldrich, TCI und VWR gekauft und ohne weitere Reinigung verwendet.

Wasserfreie Lösungsmittel wurden in Flaschen mit ACROSEAL®-Septen von Acros Organics in *extra dry*-Qualität gekauft und ohne weitere Trocknung verwendet. Wasserfreies 2,2,2-Trifluorethanol wurde durch Erhitzen unter Rückfluss mit K_2CO_3 und MS 3Å und anschließender fraktionierter Destillation erhalten. KOH wurde mit einer Reinheit von 85%, MnO_2 mit einer Reinheit von 88% und NaH als 60%ige Suspension in Mineralöl eingesetzt. Die angegebenen Mengen beziehen sich jeweils auf die Reinsubstanz. Bei Reagenzlösungen bezieht sich das angegebene Volumen auf die Menge der eingesetzten Lösung.

Reaktionen und Handhabung empfindlicher Substanzen: Reaktionen luft- oder wasserempfindlicher Substanzen wurden grundsätzlich unter N_2 (5.5) im Schlenkkolben oder -rohr durchgeführt. Die Lösungsmittel für Reaktionen mit oxidationsempfindlichen Substanzen wurden mittels Ultraschalles bei ca. 300 mbar entgast. Ungesättigte Substanzen wurden stets unter Rotlicht und im Braunglas- oder mit Aluminiumfolie umwickelten Klarglaskolben gehandhabt.

Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC): Alle durchgeführten Reaktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie an ALUGRAM SIL G/UV254-DC-Folien (Macherey Nagel, 0.20 mm Schichtdicke, Kieselgel 60) kontrolliert. Zur Detektion der Substanzen dienten, wenn möglich die Fluoreszenzlösung bei 254 nm oder die Eigenfluoreszenz bei 365 nm, welche durch Imprägnieren mit 0.1 Vol.-% Paraffin in Heptan verstärkt wurde. Zusätzlich wurde zur Detektion standardmäßig ein Eintauchbad mit Vanillin-Anfärbereagenz (2.50 g Vanillin,

500 mL MeOH, 30 mL AcOH und 10 mL H₂SO₄), oder alternativ Eintauchbäder mit KMnO₄- (1.00 g KMnO₄, 2.00 g K₂CO₃, 100 mL H₂O), bzw. Cerammoniummolybdat-Lösung (6.0 mL H₂SO₄, 1.00 g Ce(SO₄)₂, 12.0 g MoO₃ · H₃PO₄ · H₂O, 94 mL H₂O) und anschließendem Erhitzen mit einem Heißluftfön verwendet. Amine wurden optional mit Ninhydrin (1.00 g Ninhydrin, 3.0 mL AcOH, 97 mL EtOH) angefärbt. Die Stabilität der Substanzen gegenüber den verwendeten Sorbenzien und Eluenten wurde gegebenenfalls durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie überprüft.

Säulenchromatographie: Für säulenchromatographische Trennungen an Normalphase wurde MN KIESELGEL 60 (40 – 63 µm Partikelgröße, Porendurchmesser 60 Å, *Macherey Nagel*), für Umkehrphasen-Säulenchromatographie KIESELGEL 100 C18-UMKEHRPHASE (15 – 25 µm Partikelgröße, Porendurchmesser 100 Å, *Sigma-Aldrich*) verwendet. Die Säulen wurden mit dem aufgeschlammten Sorbens befüllt. Die Laufmittelzusammensetzung ist stets in Volumenanteilen angegeben.

Analysemethoden

Kernspinresonanzspektroskopie: NMR-Spektren wurden an einem AVANCE III HD 500- oder AVANCE 300-Spektrometer (*Bruker*) bei RT aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der δ-Skala angegeben. Als interner Standard diente bei ¹H-NMR-Spektren das Resonanzsignal der Restprotonen der verwendeten Lösungsmittel CDCl₃ (δ = 7.26 ppm), C₆D₆ (δ = 7.16 ppm), CD₃OD (δ = 3.31 ppm) oder D₂O (δ = 4.79 ppm). Bei ¹³C-NMR-Spektren wurde das deuteriumgekoppelte Resonanzsignal der verwendeten Lösungsmittel CDCl₃ (δ = 77.16 ppm), C₆D₆ (δ = 128.06 ppm) oder CD₃OD (49.00 ppm) als interner Standard herangezogen. Die Zuordnung der Signale nicht-literaturbekannter Verbindungen wurde mit Hilfe von 2D-NMR-Messungen (COSY, HMBC, HSQC, NOESY) vorgenommen.

Zur Beschreibung der Signalformen wurden folgende Symbole verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin. = Quintett, sept. = Septett, oct. = Oktett, m = Multiplett, br. = breit. Die Kopplungskonstante *J* wurde in Hz angegeben. Die Bindungsordnung betrachteter Kohlenstoffatome wurde als p = primär, s = sekundär, t = tertiär, q = quartär angegeben.

Bei ungesättigten Verbindungen wurde, wenn möglich, der Anteil des *trans*-Isomers per ¹H-NMR bestimmt und als *all-E*-Wert angegeben.

Hochaufgelöste Massenspektrometrie: Hochaufgelöste Massespektren wurden an einem THERMO SCIENTIFIC™ Q-EXACTIVE Massenspektrometer (*Thermo Fisher Scientific*; Ionenquelle: ESI, Detektor: Orbitrap) gemessen.

Infrarotspektroskopie: IR-Spektren wurden an einem FT-IR-SPECTRUM 100-Spektrometer (*Perkin Elmer*) gemessen. Die Wellenzahl $\tilde{\nu}$ ist in cm^{-1} angegeben. Die Intensitäten der Absorptionsbanden wurden bezeichnet als: s = stark, m = mittel, w = schwach, br. = breit.

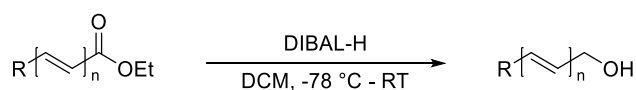
Gaschromatographie: Für GC-Messungen wurde ein THERMO FISHER™ TRACE GC ULTRA (*Thermo Fisher Scientific*) mit einer BGB-176SE-Säule (*BGB Analytik*; l = 30 m, $\varnothing = 0.25$ mm, $d_f = 0.25$ μm), einem S/SL-Injektor mit einem Splitverhältnis von 1:11, einer konstanten Flussrate von 3.5 mL H_2/min und einem FID-Detektor ($T = 240$ °C) verwendet. Als Lösungsmittel diente EtOAc.

Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie: Die Analytik von Reaktionsansätzen oder -produkten mittels UPLC erfolgten an einer ACQUITY UPLC® (*Waters*; Ionenquelle: ESI, Detektor: Single Quadrupol, Diodenarray-UV/vis-Detektor) an ACQUITY UPLC® BEH C18- (*Waters*; 130 Å, 1.7 μm , 2.1 mm \times 50 mm) oder ACQUITY UPLC® HSS T3-Säulen (*Waters*; 100 Å, 1.8 μm , 2.1 mm \times 50 mm) mit 0.5 mL/min MeOH/ H_2O 10:90 – 90:10 – 10:90 über 9 min.

Schmelzpunktmessung: Schmelzpunkte wurden an einem MELTING POINT M-565-Schmelzpunktgerät (*Büchi*) gemessen. Der Schmelzpunkt wurde dabei optisch bestimmt und die automatisch erhaltenen Werte manuell abgeglichen.

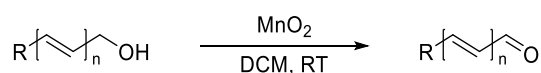
6.3.2 SYNTHESEVORSCHRIFTEN B-KETOTHIOATE

DIBAL-H-Reduktion (AAV 1)



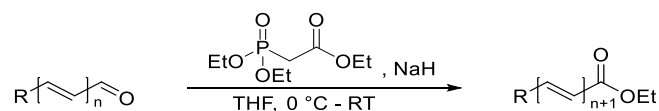
In Anlehnung an Lit.^[183] wurde der Ester (1.00 Äquiv.) in DCM abs. (0.2 M) gelöst und bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ mit DIBAL-H (1 M in Hexan, 3.00 Äquiv.) versetzt. Nach 1.5 h Rühren bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ wurde zur Beendigung der Reaktion 2 M NaOH aq. (0.1 mL/mmol DIBAL-H), gefolgt von H_2O (0.1 mL/mmol DIBAL-H) zugegeben. Die Lösung wurde 1 h gerührt, während sie langsam auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt wurde. Nach Zugabe von MgSO_4 wurde für 15 min gerührt, bevor über Celite® filtriert wurde. Es wurde mit DCM nachgewaschen, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der rohe Allylalkohol mittels Säulenchromatographie gereinigt.

MnO_2 -Oxidation der Allylalkohole (AAV 2)



In Anlehnung an Lit.^[183] wurde der Allylalkohol (1.00 Äquiv.) in DCM abs. (0.25 M) gelöst und mit MnO_2 (15.0 Äquiv.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT kräftig gerührt. Es wurde über eine Glasfritte (Por. 4) mit Celite® filtriert und mit DCM nachgewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der ungesättigte Aldehyd mittels Säulenchromatographie gereinigt.

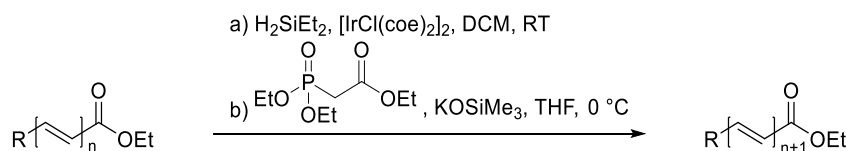
HWE-Reaktion zum konjugiert-ungesättigten Ester (AAV 3)



In Anlehnung an Lit.^[184] wurde Triethylphosphonoacetat (1.10 Äquiv.) bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ langsam zu einer Suspension von NaH (1.05 Äquiv.) in THF abs. (1.5 M) getropft und 10 min bei RT gerührt. Der Aldehyd (1.00 Äquiv.) in THF abs. (1.8 M) wurde bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ zugegeben, die Reaktionsmischung auf RT erwärmt und über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. NaCl aq. beendet. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase dreimal mit Et_2O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit H_2O und ges. NaCl

aq. gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Der rohe Ester wurde mittels Säulenchromatographie an SiO₂ gereinigt.

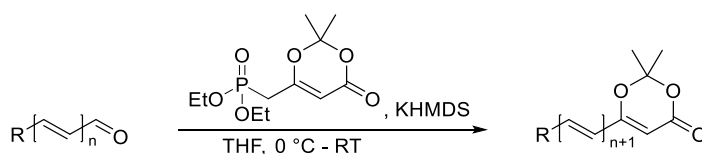
Reduktive Ir-katalysierte HWE-Homologisierung (AAV 4)



In Anlehnung an Lit.^[132] wurden der α,β -ungesättigte Ester (1.00 Äquiv.) und [IrCl(coe)₂]₂ (0.1 Mol-%) in DCM abs. (3 M) gelöst und mit Diethylsilan (2.00 Äquiv.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei RT über Nacht gerührt. Die Reaktionsmischung wurde am Rotationsverdampfer unter N₂ bei vermindertem Druck (ca. 300 mbar) eingengt und restliches DCM und Diethylsilan durch azeotrope Destillation mit Et₂O unter N₂ bei vermindertem Druck entfernt.

Triethylphosphonoacetat (1.10 Äquiv.) und das rohe Silylacetal in THF abs. (1 M) wurde bei 0 °C langsam zu einer Lösung von KOSiMe₃ (1.00 Äquiv.) in THF abs. (2 M) gegeben. Die Mischung wurde für 1 h gerührt und dabei langsam auf RT erwärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. NH₄Cl aq. (5 mL/mmol KOSiMe₃) beendet und mit Et₂O verdünnt. Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase dreimal mit Et₂O extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl aq. gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an SiO₂ gereinigt.

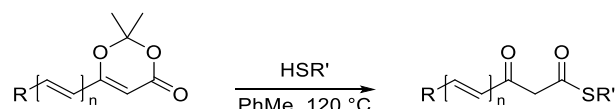
HWE-Reaktion zum 6-Alkenyl-4H-1,3-dioxin-4-on (AAV 5)



In Analogie zu Lit.^[185] wurde das Dioxinonylphosphonat **156** (1.25 Äquiv.) in THF abs. (0.125 M) bei -78 °C mit KHMDS-Lösung (0.5 M in PhMe, 1.25 Äquiv.) versetzt. Die Lösung wurde 10 min bei -78 °C und 20 min bei 0 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf -78 °C gekühlt und der Aldehyd (1.00 Äquiv.) in THF abs. (0.2 M) langsam zugetropft. Es

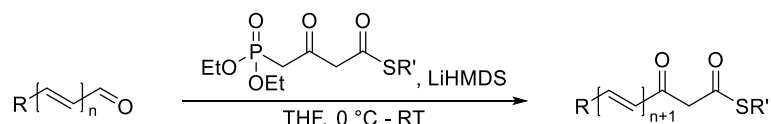
wurde über Nacht unter Rühren auf RT erwärmt, ehe die Reaktion durch die Zugabe von ges. NaHCO₃ aq. (5 mL/mmol Aldehyd) beendet wurde. Nach Verdünnen mit Et₂O wurde die wässrige Phase abgetrennt und dreimal mit Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl aq. gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt.

Ringöffnung am 6-Alkenyl-4H-1,3-dioxin-4-on (AAV 6)



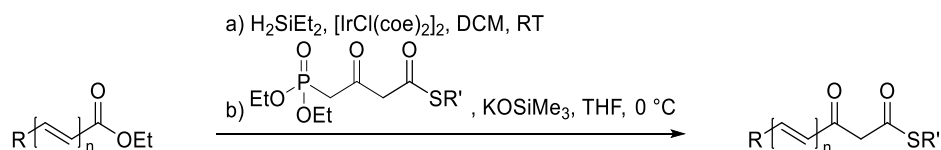
In Anlehnung an Lit.^[129] wurde das Dioxinon (1.00 Äquiv.) in PhMe abs. (10% [w/v]) bei RT mit einer Lösung des Thiols (1.05 Äquiv.) in PhMe abs. (10% [w/v]) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde sorgfältig entgast und anschließend im geschlossenen Kolben unter Argon bei 120 °C über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt.

HWE-Funktionalisierung (AAV 7)



In Anlehnung an Lit.^[132] wurde das Phosphonat (1.00 Äquiv.) in THF abs. (0.2 M) bei 0 °C langsam mit LiHMDS in PhMe (1 M, 3.00 Äquiv.) versetzt und für 30 min gerührt. Der Aldehyd (1.00 Äquiv.) in THF abs. (0.2 M) wurde zugetropft und die Reaktionsmischung über Nacht gerührt, wobei sie langsam auf RT erwärmt wurde. Die überschüssige Base wurde mit ges. NH₄Cl aq. (3 mL/mmol LiHMDS) neutralisiert. Nach Zugabe von EtOAc/PhH 3:1 (40 mL/mmol Aldehyd) wurden die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc/PhH 3:1 (2 × 20 mL/mmol Aldehyd) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl aq. (10 mL/mmol) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie gereinigt.

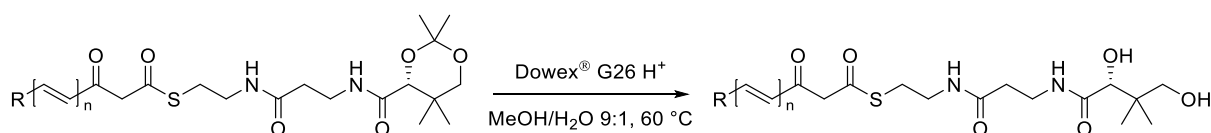
Reduktive Ir-katalysierte HWE-Funktionalisierung (AAV 8)



In Anlehnung an Lit.^[132] wurde der α,β -ungesättigte Ester (1.00 Äquiv.) in DCM abs. (3 M) mit $[\text{IrCl}(\text{coe})_2]_2$ (0.1 Mol-%) und H_2SiEt_2 (2.00 Äquiv.) versetzt und die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Es wurde am Rotationsverdampfer unter N_2 und vermindertem Druck (ca. 300 mbar) eingengt und restliches DCM und Diethylsilan durch azeotrope Destillation unter N_2 bei vermindertem Druck entfernt.

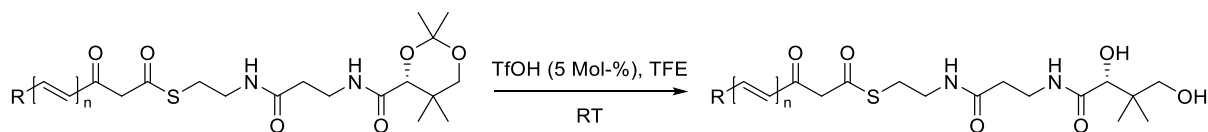
Zu dem β -Ketothioacylphosphonat (1.00 Äquiv.) und dem rohen Silylacetal (1.00 Äquiv.) in THF abs. (0.12 M) wurden bei 0 °C langsam eine KOSiMe_3 -Lösung in THF abs. (2.00 M, 3.00 Äquiv.) zugegeben. Die Mischung wurde 1 h gerührt und dabei langsam auf RT erwärmt. Es wurde mit EtOAc/PhH 1:1 (40 mL/mmol Ester) verdünnt und überschüssige Base mit ges. NH_4Cl aq. (10 mL/mmol) neutralisiert. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und mit EtOAc/PhH 1:1 (2 \times 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl aq. (10 mL/min) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt und der rohe β -Ketothioester mittels Säulenchromatographie gereinigt.

Entschützung mit saurem Ionentauscher (AAV 9)



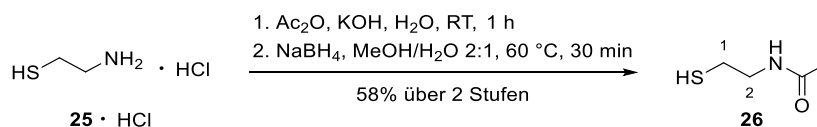
In Anlehnung an Lit.^[153] wurde der Isopropyliden- β -ketopantetheinester (1.00 Äquiv.) mit $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 9:1 (20 mM) und DowexTM G26 H^+ (4.00 mg/ μmol Acetonid) versetzt und über Nacht bei 60 °C gerührt. Der Ionentauscher wurde abfiltriert und mit MeOH nachgewaschen. Das Rohprodukt wurde durch Eindampfen der Lösung im Vakuum erhalten und mittels Säulenchromatographie gereinigt.

Entschützung mit TfOH/TFE (AAV 10)



In Anlehnung an Lit.^[154] wurde der Isopropyliden-β-ketopantetheinester (1.00 Äquiv.) in 2,2,2-Trifluorethanol (TFE) abs. (0.05 M) gelöst. Trifluormethansulfonsäure (TfOH) in TFE abs. (1 Vol.-%, 0.05 Äquiv.) wurde bei RT langsam zugetropft und die Mischung für 2 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit DCM verdünnt, und dreimal mit Natriumphosphat-NaCl-Puffer (pH = 6.0, 1 M Natriumphosphat, gesättigt mit NaCl, 1 mL/μmol TfOH) gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Nach Einengen unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer wurde der rohe β-Ketopantetheinester mittels Säulenchromatographie gereinigt.

N-Acetylcysteamin (26)



Cysteaminhydrochlorid (**25 · HCl**, 5.68 g, 50.0 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde bei 0 °C zu KOH (22.4 g, 400 mmol, 8.00 Äquiv.) in H₂O (75 mL) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde langsam mit Ac₂O (14.2 mL, 150 mmol, 3.00 Äquiv.) versetzt und anschließend 1 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 4 M HCl aq. auf pH = 7 gebracht und mit Et₂O (3 × 150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl aq. (50 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer bei verringertem Druck abdestilliert.

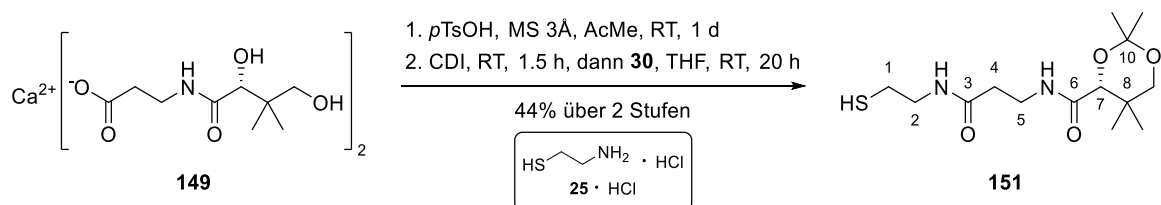
Das erhaltene Rohprodukt wurde in entgastem MeOH/H₂O (2:1, 150 mL) gelöst und portionsweise mit NaBH₄ (6.62 g, 175 mmol, 3.50 Äquiv.) versetzt. Nach vollständiger Zugabe wurde 30 min bei 60 °C gerührt. Unter N₂-Atmosphäre wurde die Lösung auf RT abgekühlt, mit entgaster 1 M HCl aq. auf pH = 4 angesäuert und mit entgastem CHCl₃ (150 mL, dann 2 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten Phasen wurden mit ges. NaCl (50 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer unter N₂ zur Trockene eingeeengt um HSNAC (**26**) als weißen Feststoff (2.06 g, 20.3 mmol, 58% über zwei Stufen) zu erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.85 (br. s, 1H, NH), 3.43 (q, *J* = 6.3 Hz, 2H, 2-H), 2.68 (dt, *J* = 8.5, 6.3 Hz, 2H, 1-H), 2.01 (s, 3H, COCH₃), 1.35 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H, SH).

R_f (EtOAc) = 0.27.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[186].

O,O'-Isopropyliden-D-pantethein (151)



In Analogie zu Lit.^[139] wurde Calcium-D-pantothenat (**149**, 10.0 g, 21.0 mmol, 1.00 Äquiv.), *p*TsOH · H₂O (9.58 g, 50.4 mmol, 2.40 Äquiv.) und 3Å Molekularsieb (10.0 g) in Aceton

(250 mL) suspendiert. Die Suspension wurde 1 d bei RT gerührt. Die Feststoffe wurden über Celite® abfiltriert, und der Filterkuchen mit EtOAc (100 mL) gewaschen. Die klare Lösung wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bis ca. 30 mL eingengt. Der Rückstand wurde mit EtOAc (100 mL) und Hexan (50 mL) versetzt. Die Lösung wurde von dem dabei entstehenden Harz durch Dekantieren getrennt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer vollständig entfernt um *O,O'*-Isopropyliden-D-pantothenensäure (**150**) als weißen Feststoff (7.58 g) zu erhalten, der ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt wurde.

Eine Lösung der rohen Säure **150** (7.58 g, 29.2 mmol, 1.00 Äquiv.) in THF (184 mL) wurde mit CDI (5.02 g, 44.2 mmol, 1.51 Äquiv.) versetzt und bei RT 1.5 h gerührt. Anschließend wurde Cysteaminhydrochlorid (**25** · HCl, 7.17 g, 44.2 mmol, 1.51 Äquiv.) zugegeben und die Mischung für weitere 20 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck und N₂ am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in DCM (200 mL) aufgenommen. Die Lösung wurde mit ges. NH₄Cl aq. (2 × 100 mL) und ges. NaCl aq. (100 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Nach dem Einengen am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck und N₂ wurde der Rückstand aus *n*-Hexan/EtOAc umkristallisiert um *O,O'*-Isopropyliden-D-pantethein (**151**) als weiße Kristalle (5.92 g, 18.6 mmol, 44% über zwei Stufen) zu erhalten.

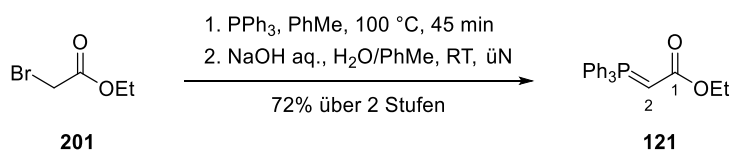
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.00 (m, 1H, 5-NH), 6.32 (m, 1H, 2-NH), 4.07 (s, 1H, 7-H), 3.68 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, 9-H^{ax}), 3.61 – 3.36 (m, 4H, 2-H, 5-H), 3.27 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, 9-H^{äq}), 2.65 (dtd, *J* = 8.5, 6.5, 2.5 Hz, 2H, 1-H), 2.46 (td, *J* = 6.5, 1.5 Hz, 2H, 4-H), 1.45 (s, 3H, 10-CH₃^{äq}), 1.41 (s, 3H, 10-CH₃^{ax}), 1.36 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H, SH), 1.03 (s, 3H, 8-CH₃^{ax}), 0.96 (s, 3H, 8-CH₃^{äq}).

¹³C-NMR (125 Hz, CDCl₃): δ [ppm] = 171.2 (q, C-3), 170.4 (q, C-6), 99.2 (q, C-10), 77.3 (t, C-7), 71.5 (s, C-9), 42.5 (s, C-2), 36.3 (q, C-8), 35.0 (s, C-5), 33.1 (s, C-4), 29.6 (p, 10-CH₃^{äq}), 24.7 (s, C-1), 22.3 (p, 8-CH₃^{ax}), 19.1 (p, 8-CH₃^{äq}), 18.8 (p, 10-CH₃^{ax}).

R_f (EtOAc) = 0.18.

Schmelzpunkt: 116.8 °C; Lit.^[187]: 113 – 115 °C.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[139].

Ethyl-2-(triphenyl- λ^5 -phosphanyliden)acetat (**121**)


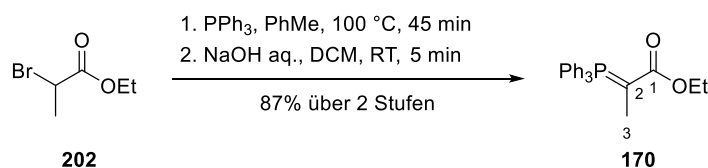
Eine Lösung von PPh_3 (50.0 g, 191 mmol, 1.00 Äquiv.) in Toluol (230 mL) wurde mit Ethylbromacetat (**201**, 21.5 mL, 194 mmol, 1.02 Äquiv.) versetzt und bei 100 °C für 45 min gerührt. Der Niederschlag wurde über eine Glasfritte (Por. 3) abfiltriert und mit Toluol (2 × 50 mL) und Et_2O (2 × 50 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum wurde das erhaltene Phosphoniumbromid (78.0 g) in H_2O (250 mL) und Toluol (250 mL) gegeben. Die Zwei-Phasen-Mischung wurde mit 4 M NaOH (95.0 mL, 380 mmol, 2.00 Äquiv.) versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Die Toluolphase wurde abgetrennt und zur wässrigen Phase DCM (100 mL) gegeben. Die NaOH aq./DCM-Mischung wurde für 1.5 h bei RT gerührt. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und mit DCM (2 × 100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H_2O (20 mL) und ges. NaCl aq. (20 mL) gewaschen. Nach Trocknen über Na_2SO_4 und Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde das Ylid **121** in seinen beiden rotameren Formen als gelber Feststoff (48.0 g, 138 mmol, 72% über zwei Stufen) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = **major**: 7.64 (m, 6H, Ar-H), 7.53 (m, 3H, Ar-H), 7.45 (m, 6H, Ar-H), 4.03 (m, 2H, OCH_2CH_3), 2.94 (d, 1H, $J^{\text{H-P}} = 21.2$ Hz, 2-H), 1.23 (t, 3H, $J^{\text{H-H}} = 6.4$ Hz, OCH_2CH_3); **minor**: 7.64 (m, 6H, Ar-H), 7.53 (m, 3H, Ar-H), 7.45 (m, 6H, Ar-H), 3.83 (br. s, 2H, OCH_2CH_3), 2.73 (d, 1H, $J^{\text{H-P}} = 21.2$ Hz, 2-H), 0.68 (br. s, 3H, OCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 171.4 (q, C-1), 133.1 (d, $J^{\text{C-P}} = 10.0$ Hz, t, $\text{C}^{\text{o-Ar}}$), 132.0 (d, $J^{\text{C-P}} = 2.7$ Hz, t, $\text{C}^{\text{p-Ar}}$), 128.8 (d, $J^{\text{C-P}} = 12.2$ Hz, t, $\text{C}^{\text{m-Ar}}$), 128.1 (d, $J^{\text{C-P}} = 91.1$ Hz, q, C^{Ar}), 57.9 (s, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 30.2 (d, $J^{\text{C-P}} = 125.7$ Hz, t, C-2), 14.9 (p, $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 18.1 (m, major, 65%), 16.6 (m, minor, 35%).

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[188].

Ethyl-2-(triphenyl- λ^5 -phosphanyliden)propanoat (**170**)


In Analogie zu Lit.^[189] wurde Ethyl-2-brompropionat (**202**, 7.23 mL, 55.5 mmol, 1.11 \u00c4quiv.) zu PPh₃ (13.1 g, 50.0 mmol, 1.00 \u00c4quiv.) in H₂O (55 mL) gegeben und bei 70 °C f\u00fcr 24 h ger\u00fchrt. Die L\u00f6sung des Phosphoniumbromids wurde auf RT gebracht und mit 1 M NaOH aq. (100 mL, 100 mmol, 2.00 \u00c4quiv.) versetzt. Zur entstandenen Suspension wurde DCM (100 mL) gegeben und die Mischung f\u00fcr 5 min bei RT ger\u00fchrt. Nach Phasentrennung wurde die w\u00e4ssrige Phase mit DCM (2 \u00d7 50 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl aq. (25 mL) gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer beinahe bis zur Trockene eingedampft. Es wurde mit Hexan (10 mL) versetzt, der Niederschlag abfiltriert und mit Hexan (3 \u00d7 10 mL) gewaschen um **170** als hellgelben Feststoff (15.7 g, 43.4 mmol, 87% \u00fcber zwei Stufen) zu erhalten.

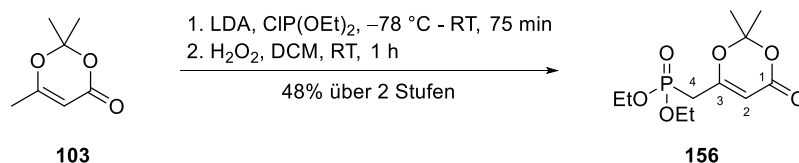
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **major**: 7.60 (m, 6H, Ar-H), 7.52 (m, 3H, Ar-H), 7.45 (m, 6H, Ar-H), 3.71 (q, $J^{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 1.62 (d, $J^{\text{H-P}} = 13.8$ Hz, 3H, 3-H), 0.45 (t, $J^{\text{H-H}} = 7.1$ Hz, 3H, OCH₂CH₃); **minor**: 7.60 (m, 6H, Ar-H), 7.52 (m, 3H, Ar-H), 7.45 (m, 6H, Ar-H), 4.05 (q, $J^{\text{H-H}} = 7.0$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 1.60 (d, $J^{\text{H-P}} = 14.3$ Hz, 3H, 3-H), 1.24 (t, $J^{\text{H-H}} = 7.0$ Hz, 3H, OCH₂CH₃).

¹³C-NMR (125 Hz, CDCl₃): δ [ppm] = **major**: 170.8 (d, $J^{\text{C-P}} = 18.1$ Hz, q, C-1), 133.8 (d, $J^{\text{C-P}} = 9.6$ Hz, t, C^{o-Ar}), 131.7 (d, $J^{\text{C-P}} = 2.9$ Hz, t, C^{p-Ar}), 128.6 (d, $J^{\text{C-P}} = 90.6$ Hz, t, C^{m-Ar}), 128.8 (d, $J^{\text{C-P}} = 12.0$ Hz, q, C^{Ar}), 57.5 (s, OCH₂CH₃), 31.9 (d, $J^{\text{C-P}} = 120.1$ Hz, q, C-2), 14.3 (p, OCH₂CH₃), 13.1 (d, $J^{\text{C-P}} = 13.3$ Hz, p, C-3); **minor**: 171.6 (d, $J^{\text{C-P}} = 12.9$ Hz, q, C-1), 133.8 (d, $J^{\text{C-P}} = 9.6$ Hz, t, C^{o-Ar}), 131.7 (d, $J^{\text{C-P}} = 2.8$ Hz, t, C^{p-Ar}), 128.7 (d, $J^{\text{C-P}} = 12.2$ Hz, t, C^{m-Ar}), 128.0 (d, $J^{\text{C-P}} = 90.6$ Hz, q, C^{Ar}), 58.2 (s, OCH₂CH₃), 33.0 (d, $J^{\text{C-P}} = 126.7$, q, C-2), 15.6 (p, OCH₂CH₃), 12.4 (d, $J^{\text{C-P}} = 12.1$ Hz, p, C-3).

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 22.6 (m).

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[190].

Diethyl-((2,2-dimethyl-4-oxo-4H-1,3-dioxin-6-yl)methyl)-phosphonat (**156**)



In Analogie zu Lit.^[129] wurde Diisopropylamin (7.21 mL, 51.1 mmol, 1.40 Äquiv.) in THF abs. (20 mL) bei -78 °C mit *n*-BuLi (2.5 M in Hexan, 20.4 mL, 51.1 mmol, 1.40 Äquiv.) versetzt. Nach 30 min wurde zur LDA-Lösung langsam frisch destilliertes (Kugelrohr, 140 °C , 1.1 mbar) 2,2,6-Trimethyl-4*H*-1,3-dioxin-4-on (**103**, 4.85 mL, 36.5 mmol, 1.00 Äquiv.) in THF abs. (10 mL) zugegeben. Nachdem die Reaktionsmischung weitere 45 min gerührt wurde, wurde sie mit Diethylchlorphosphit (7.62 mL, 53.0 mmol, 1.45 Äquiv.) versetzt, auf RT erwärmt und für 30 min gerührt. Nach Zugabe von Et₂O (100 mL) wurde mit halbgesättigter NaCl aq. (100 mL) gewaschen und die wässrige Phase mit Et₂O (100 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel entfernt.

Bei 0 °C wurde vorsichtig 30% H₂O₂ aq. (13.0 mL, 127 mmol, 3.50 Äquiv.) zu einer Lösung des rohen Phosphinats in DCM (60 mL) gegeben. Das Kältebad wurde entfernt und die zweiphasige Mischung bei RT für 1 h gerührt. Es wurde EtOAc (200 mL) zugegeben, die Phasen getrennt und die organische Phase mit ges. NaCl aq. (2 × 100 mL) gewaschen. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Reinigung durch Säulenchromatographie an SiO₂ (EtOAc) wurde das Phosphonat **156** als gelbes Öl (4.89 g, 17.6 mmol, 48% über zwei Stufen), welches sich beim Stehen verfestigte, erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.38 (d, $J^{\text{H-P}} = 3.7\text{ Hz}$, 1H, 2-H), 4.15 (dq, $J^{\text{H-P}} = 8.3\text{ Hz}$, $J^{\text{H-H}} = 7.1\text{ Hz}$, 4H, P(OCH₂CH₃)₂), 2.79 (d, $J^{\text{H-P}} = 22.1\text{ Hz}$, 2H, 4-H), 1.71 (s, 6H, C(CH₃)₂), 1.34 (t, $J^{\text{H-P}} = 7.1\text{ Hz}$, 6H, P(OCH₂CH₃)₂).

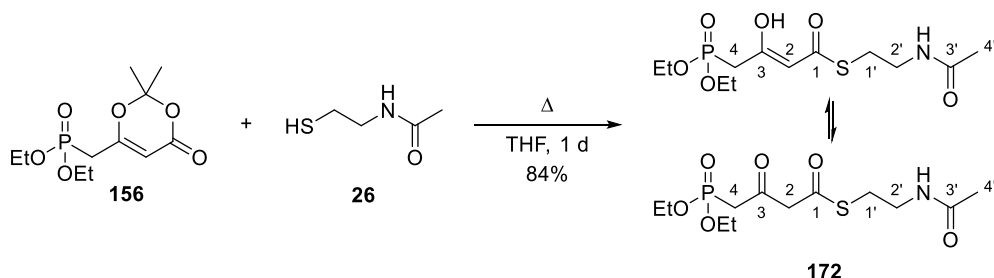
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 163.1 (d, $J^{\text{C-P}} = 9.7\text{ Hz}$, q, C-3), 160.7 (d, $J^{\text{C-P}} = 2.4\text{ Hz}$, q, C-1), 107.3 (q, C(CH₃)₂), 96.2 (d, $J^{\text{C-P}} = 8.0\text{ Hz}$, t, C-2), 62.7 (d, $J^{\text{C-P}} = 6.5\text{ Hz}$, s, O(CH₂CH₃)₂), 32.5 (d, $J^{\text{C-P}} = 136.9\text{ Hz}$, s, C-4), 25.0 (p, C(CH₃)₂), 16.5 (d, $J^{\text{C-P}} = 6.1\text{ Hz}$, s, O(CH₂CH₃)₂).

³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 20.5 (m).

R_f (EtOAc) = 0.24.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[191].

S-(2-Acetamidoethyl)-4-(diethoxyphosphoryl)-3-oxobutanthioat (**172**)



Eine sorgfältig entgaste Mischung aus HSNAC (**26**, 301 mg, 2.52 mmol, 1.00 Äquiv.) und dem Phosphonat **156** (1.05 g, 3.78 mmol, 1.50 Äquiv.) in THF abs. (2.5 mL) wurde im geschlossenen Kolben bei 70 °C für 1 d gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt durch Säulenchromatographie an SiO₂ (DCM/MeCN/MeOH 100:0:0 → 45:50:5) gereinigt. Das β-Ketoacylphosphonat **172** wurde als gelbes Harz (721 mg, 2.12 mmol, 84%) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = *keto*: 6.15 (br. s, 1H, NH), 4.16 (m, 4H, OCH₂CH₃), 3.91 (s, 2H, 2-H), 3.47 (m, 2H, 2'-H), 3.24 (d, J^{H-P} = 22.8 Hz, 2H, 4-H), 3.10 (m, 2H, 1'-H), 1.97 (s, 3H, COCH₃), 1.35 (t, J^{H-H} = 7.1 Hz, 6H, OCH₂CH₃); *enol*: 12.68 (s, 1H, OH), 5.87 (br. s, 1H, NH), 5.62 (d, J^{H-P} = 3.2 Hz, 1H, 2-H), 4.16 (m, 4H, OCH₂CH₃), 3.47 (m, 2H, 2'-H), 3.10 (m, 2H, 1'-H), 2.76 (d, J^{H-P} = 22.5 Hz, 2H, 4-H), 1.97 (s, 3H, COCH₃), 1.34 (t, J = 7.1 Hz, 6H, OCH₂CH₃).

¹³C-NMR (125 Hz, CDCl₃): δ [ppm] = *keto*: 194.0 (q, C-3), 191.9 (d, J^{C-P} = 6.2 Hz, q, C-1), 170.7 (q, C-3'), 63.0 (d, J^{C-P} = 6.5 Hz, s, OCH₂CH₃), 58.0 (s, C-2), 42.6 (d, J^{C-P} = 126.9 Hz, s, C-4), 38.9 (s, C-2'), 29.4 (s, C-1'), 23.2 (p, C-4'), 16.4 (d, J^{C-P} = 5.9 Hz, p, OCH₂CH₃); *enol*: 194.7 (d, J^{C-P} = 2.2 Hz, q, C-1), 170.5 (q, C-3'), 167.3 (d, J^{C-P} = 8.6 Hz, q, C-3), 101.8 (d, J^{C-P} = 7.7 Hz, t, C-2), 62.9 (d, J^{C-P} = 6.4 Hz, s, OCH₂CH₃), 39.6 (s, C-2'), 33.7 (d, J^{C-P} = 135.6 Hz, s, C-4), 28.1 (s, C-1'), 23.3 (p, C-4'), 16.4 (d, J^{C-P} = 5.6 Hz, p, OCH₂CH₃).

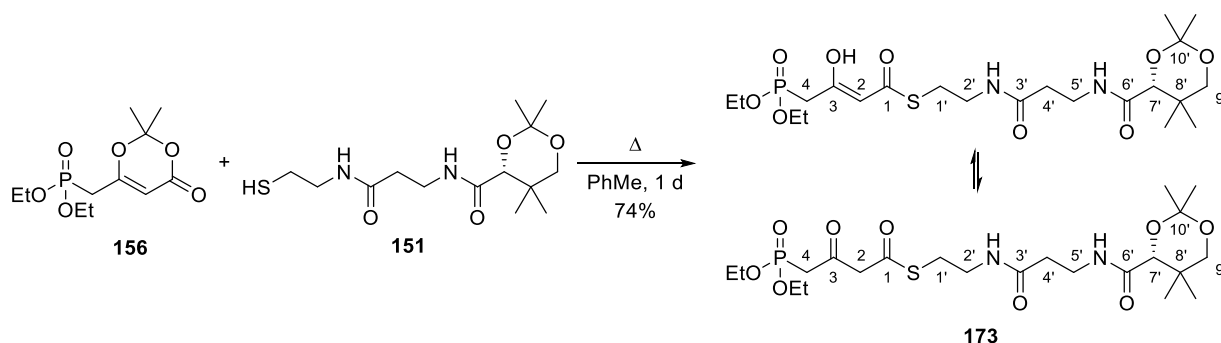
³¹P-NMR (202 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = *keto*: 18.3 (m, 71%); *enol*: 21.2 (m, 29%).

HRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ für C₁₂H₂₂NO₆PS: ber. 362.0798, gef. 362.0794.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3283 (br. w), 3079 (w), 2980 (w), 2925 (w), 2916 (w), 2853 (w), 1726 (m), 1666 (m), 1655 (m), 1619 (m), 1544 (m), 1511 (w), 1477 (w), 1438 (w), 1398 (m), 1372 (m), 1289 (m), 1239 (m), 1195 (w), 1176 (m), 1166 (m), 1139 (w), 1089 (m), 1019 (s), 971 (m), 863 (m), 854 (m), 827 (m), 819 (m), 790 (m), 733 (w), 687 (w), 623 (w), 601 (w), 598 (m), 587 (w).

R_f (MeCN/DCM/MeOH 50:45:5) = 0.38.

S-(O,O'-Isopropyliden-D-pantetheinyl)-4-(diethoxyphosphoryl)-3-oxobutanethioat (**173**)



Das Phosphonat **156** (575 mg, 2.00 mmol, 1.00 Äquiv.) und O,O'-Isopropyliden-D-pantethein (**151**, 669 mg, 2.10 mmol, 1.05 Äquiv.) wurden in frisch entgastem PhMe abs. (2.0 mL) gelöst und im geschlossenen Kolben bei 120 °C für 1 d gerührt. Nach Reinigung mittels Säulenchromatographie an SiO₂ (EtOAc/DCM/MeOH 1:0:0 → 0:95:5) wurde das β -Ketoacylphosphonat **173** als viskoses gelbes Öl (797 mg, 1.48 mmol, 74%) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = *keto*: 7.05 (m, 1H, 5'-NH), 6.52 (m, 1H, 2'-NH), 4.15 (m, 4H, OCH₂CH₃), 4.07 (s, 1H, 7'-H), 3.90 (s, 2H, 2-H), 3.67 (d, $J^{\text{H-H}} = 11.8$ Hz, 1H, 9'-H^{ax}), 3.60 – 3.40 (m, 4H, 2'-H, 5'-H), 3.27 (d, $J^{\text{H-H}} = 11.8$ Hz, 9'-H^{äq}), 3.23 (d, $J^{\text{H-P}} = 22.9$ Hz, 4-H), 3.07 (m, 2H, 1'-H), 2.43 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, 4'-H), 1.45 (s, 3H, 10'-CH₃^{äq}), 1.41 (s, 3H, 10'-CH₃^{ax}), 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, OCH₂CH₃), 1.03 (s, 3H, 8'-CH₃^{ax}), 0.96 (s, 3H, 8'-CH₃^{äq}); *enol*: 12.65 (s, 1H, OH), 7.05 (m, 1H, 5'-NH), 6.25 (m, 1H, 2'-NH), 5.60 (d, $J^{\text{H-P}} = 3.1$ Hz, 1H, 2-H), 4.15 (m, 4H, OCH₂CH₃), 4.07 (s, 1H, 7'-H), 3.67 (d, $J^{\text{H-H}} = 11.8$ Hz, 1H, 9'-H^{ax}), 3.60 – 3.40 (m, 4H, 2'-H, 5'-H), 3.27 (d, $J^{\text{H-H}} = 11.8$ Hz, 9'-H^{äq}), 3.07 (m, 2H, 1'-H), 2.75 (d, $J^{\text{H-P}} = 22.5$ Hz, 4-H), 2.49 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H, 4'-H), 1.45 (s, 3H, 10'-CH₃^{äq}), 1.41 (s, 3H, 10'-CH₃^{ax}), 1.34 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H, OCH₂CH₃), 1.03 (s, 3H, 8'-CH₃^{ax}), 0.96 (s, 3H, 8'-CH₃^{äq}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 Hz, CDCl_3): δ [ppm] = **keto**: 194.0 (d, $J^{\text{C-P}} = 6.3$ Hz, q, C-3), 191.9 (q, C-1), 171.6 (q, C-3'), 170.2 (q, C-6'), 99.2 (q, C-10'), 77.3 (t, C-7'), 71.6 (s, C-9'), 63.1 (d, $J^{\text{C-P}} = 6.3$ Hz, s, OCH_2CH_3), 58.1 (s, C-2), 42.7 (d, $J^{\text{C-P}} = 127.5$ Hz, s, C-4), 38.9 (s, C-5'), 35.9 (s, C-4'), 34.9 (s, C-2'), 33.1 (q, C-8'), 29.6 (p, $10'\text{-CH}_3^{\text{äq}}$), 29.6 (s, C-1'), 22.3 (p, $8'\text{-CH}_3^{\text{ax}}$), 19.0 (p, $8'\text{-CH}_3^{\text{äq}}$), 18.8 (p, $10'\text{-CH}_3^{\text{ax}}$), 16.4 (d, $J^{\text{H-P}} = 5.8$ Hz, p, OCH_2CH_3); **enol**: 194.5 (q, C-1), 171.3 (q, C-3'), 170.3 (q, C-6'), 167.5 (d, $J^{\text{C-P}} = 8.7$ Hz, q, C-3), 101.8 (d, $J^{\text{C-P}} = 7.8$ Hz, t, C-2), 99.2 (q, C-10'), 77.3 (t, C-7'), 71.6 (s, C-9'), 62.9 (d, $J^{\text{C-P}} = 6.4$ Hz, s, OCH_2CH_3), 39.6 (s, C-5'), 36.1 (s, C-4'), 34.8 (s, C-2'), 33.8 (d, $J^{\text{C-P}} = 135.7$ Hz, s, C-4), 33.1 (q, C-8'), 29.5 (p, $10'\text{-CH}_3^{\text{äq}}$), 28.1 (s, C-1'), 22.3 (p, $8'\text{-CH}_3^{\text{ax}}$), 19.0 (p, $8'\text{-CH}_3^{\text{äq}}$), 18.8 (p, $10'\text{-CH}_3^{\text{ax}}$), 16.5 (d, $J^{\text{C-P}} = 5.8$ Hz, p, OCH_2CH_3).

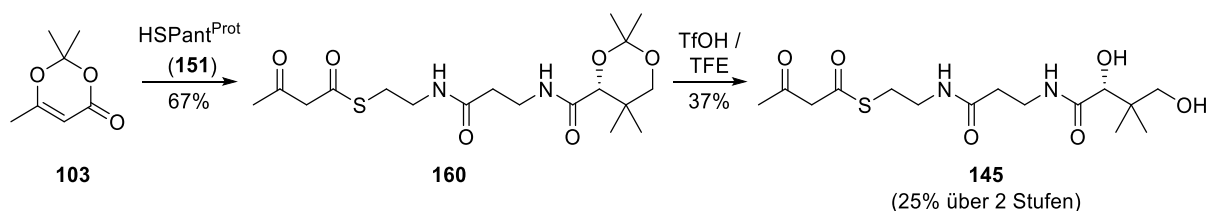
$^{31}\text{P-NMR}$ (202 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = **keto**: 18.3 (m, 72%), **enol**: 21.2 (m, 28%).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3397 (br. w), 3298 (br. w), 2988 (w), 2936 (w), 2873 (w), 1726 (w), 1163 (s), 1528 (m), 1143 (w), 1392 (m), 1378 (m), 1252 (m), 1226 (m), 1198 (m), 1161 (m), 1097 (s), 1021 (s), 973 (m), 871 (w), 790 (w).

HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ für $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_9\text{PS}$: ber. 539.2187, gef. 539.2183

R_f (MeCN/DCM/MeOH 45:50:5) = 0.44.

S-(*D*-Pantetheinyl)- 3-oxobutanethioat (145)



S-(*O,O'*-Isopropyliden-D-pantetheinyl)- 3-oxobutanethioat (160)



Zu *O,O'*-Isopropyliden-D-pantethein (**151**, 350 mg, 1.10 mmol, 1.00 Äquiv.) in PhMe abs. (2.2 mL) wurde frisch destilliertes (Kugelrohr, 0.7 mbar, 160 °C) 2,2,6-Trimethyl-4*H*-1,3-dioxin-4-on (**103**, 195 mg, 1.38 mmol, 1.25 Äquiv.) gegeben. Die Reaktionsmischung wurde im geschlossenen Kolben bei 110 °C für 19 h gerührt. Das Lösungsmittel wurde am

Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an SiO₂ (EtOAc/DCM/MeOH 1:0:0 → 0:95:5) gereinigt. Der β-Ketothioester **160** wurde als farbloser, amorpher Feststoff (298 mg, 740 μmol, 67%) erhalten.

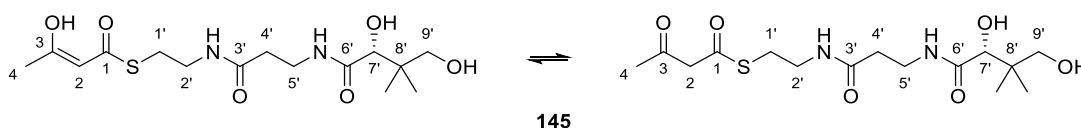
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = *keto*: 7.06 (br. s, 1H, 5'-NH), 6.31 (br. s, 1H, 2'-H), 4.07 (s, 1H, 7'-H), 3.70 (s, 2H, 2-H), 3.67 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, 9'-H^{ax}), 3.60 – 3.37 (m, 4H, 2'-H, 5'-H), 3.27 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, 9'-H^{äq}), 3.06 (m, 2H, 1'-H), 2.43 (m, 2H, 4'-H), 2.26 (s, 3H, 4-H), 1.45 (s, 3H, 10'-CH₃^{äq}), 1.41 (s, 3H, 10'-CH₃^{ax}), 1.02 (s, 3H, 8'-CH₃^{ax}), 0.96 (s, 3H, 8'-CH₃^{äq}); *enol*: 12.55 (s, 1H, 3-OH), 7.06 (br. s, 1H, 5'-NH), 6.31 (br. s, 1H, 2'-H), 5.44 (s, 1H, 2-H), 4.07 (s, 1H, 7'-H), 3.67 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, 9'-H^{ax}), 3.60 – 3.37 (m, 4H, 2'-H, 5'-H), 3.27 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, 9'-H^{äq}), 3.06 (m, 2H, 1'-H), 2.43 (m, 2H, 4'-H), 1.94 (s, 3H, 4-H), 1.45 (s, 3H, 10'-CH₃^{äq}), 1.41 (s, 3H, 10'-CH₃^{ax}), 1.02 (s, 3H, 8'-CH₃^{ax}), 0.96 (s, 3H, 8'-CH₃^{äq}).

¹³C-NMR (125 Hz, CDCl₃): δ [ppm] = *keto*: 200.0 (q, C-3), 192.2 (q, C-1), 171.5 (q, C-3'), 170.2 (q, C-6'), 99.2 (q, C-10'), 77.3 (t, C-7'), 71.6 (s, C-9'), 58.2 (s, C-2), 39.2 (s, C-2'), 36.0 (s, C-4'), 34.8 (s, C-5'), 33.1 (q, C-8'), 30.6 (p, C-4), 29.6 (p, 10'-Me^{äq}), 29.3 (s, C-1'), 22.2 (p, 8'-Me^{ax}), 19.0 (p, 8'-Me^{äq}), 18.8 (p, 10'-Me^{ax}); *enol*: 194.1 (q, C-1), 174.2 (q, C-3), 171.3 (q, C-3'), 170.2 (q, C-6'), 100.0 (t, C-2), 99.2 (q, C-10'), 77.3 (t, C-7'), 71.6 (s, C-9'), 39.9 (s, C-2'), 36.0 (s, C-4'), 34.8 (s, C-5'), 33.1 (q, C-8'), 29.6 (p, 10'-Me^{äq}), 27.9 (s, C-1'), 22.2 (p, 8'-Me^{ax}), 21.2 (p, C-4), 19.0 (p, 8'-Me^{äq}), 18.8 (p, 10'-Me^{ax}).

HRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ für C₁₈H₃₀N₂O₆S: ber. 425.1717, gef. 425.1713

R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.49.

S-(D-Pantetheinyl)- 3-oxobutanethioat (**145**)



Das Acetonid **160** (49.3 mg, 123 μmol, 1.00 Äquiv.) in TFE (1.9 mL) wurde bei 0 °C mit TfOH in TFE (1 Vol.-%, 54 μL, 6.12 μmol, 0.05 Äquiv.) versetzt und bei 0 °C für 21 h gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Säure mit NEt₃ in MeOH (1 Vol.-%, 170 μL, 12.3 μmol, 0.10 Äquiv.) neutralisiert und die Mischung am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingengt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an SiO₂

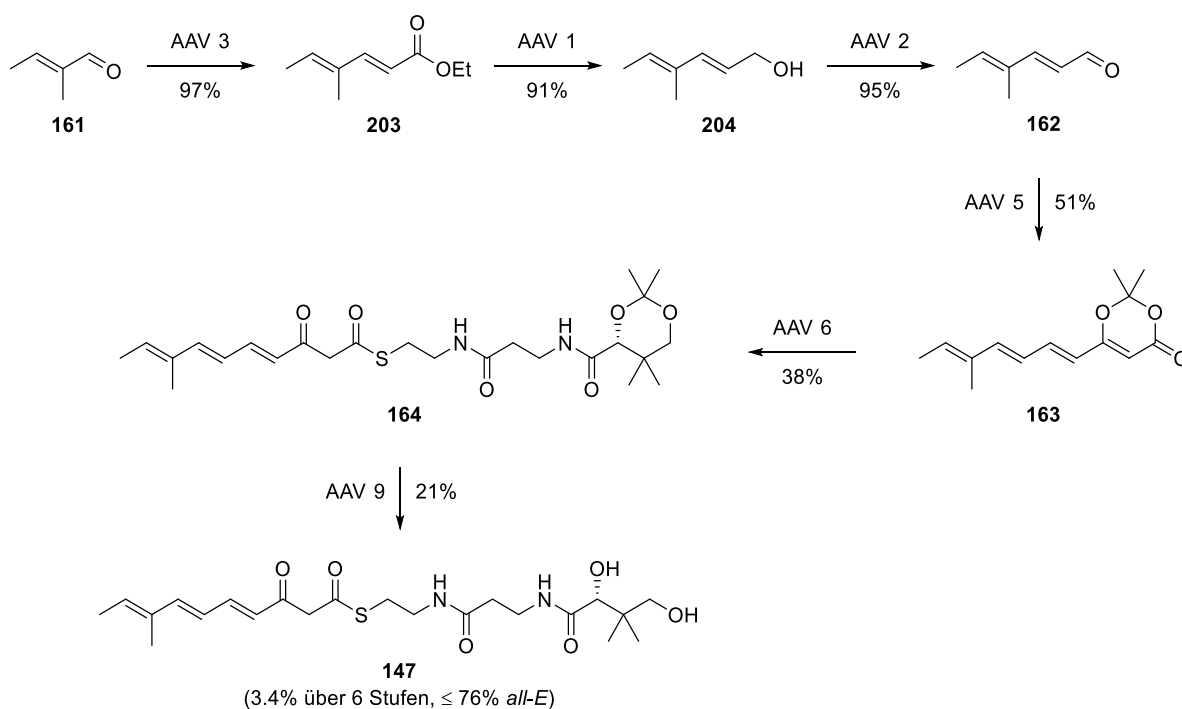
(DCM/MeOH 95:5 → 90:10) gereinigt, wonach **145** als weißer, amorpher Feststoff (26.6 mg, 73.4 μmol , 60%) erhalten wurde.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): δ [ppm] = *enol*: 3.89 (s, 1H, 7'-H), 3.55 – 3.33 (m, 6H, 2'-H, 5'-H, 9'-H), 3.06 (m, 2H, 1'-H), 2.42 (m, 2H, 5'-H), 2.23 (s, 3H, 4-H), 0.92 (s, 6H, 8'- CH_3); *keto*: 3.89 (s, 1H, 7'-H), 3.55 – 3.33 (m, 6H, 2'-H, 5'-H, 9'-H), 3.06 (m, 2H, 1'-H), 2.42 (m, 2H, 5'-H), 1.92 (s, 3H, 4-H), 0.92 (s, 6H, 8'- CH_3)

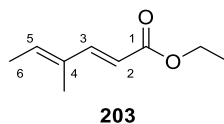
UPLC-MS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ für $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$: ber. 385.14, gef. 385.25.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[152].

(*all-E*)-S-(D-Pantetheinyl)-3-oxo-8-methyldeca-4,6,8-trienylthioat (147**)**



Ethyl-(*2E,4E*)-4-methylhexa-2,4-dienoat (203**)**



Gemäß AAV 3 wurde (*E*)-2-Methylbut-2-enal (**161**, 1.93 mL, 20 mmol) mit NaH und Triethylphosphonat umgesetzt. Nach Aufarbeitung wurde der Ester **203** als farblose Flüssigkeit (2.98 g, 19.3 mmol, 97%, $\geq 96\%$ *all-E*) erhalten, die ohne Reinigung weiter umgesetzt wurde.

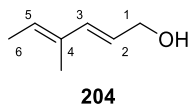
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.31 (d, J = 15.7 Hz, 1H, 3-H), 5.98 (q, J = 7.0 Hz, 1H, 5-H), 5.78 (d, J = 15.7 Hz, 1H, 2-H), 4.20 (q, J = 7.2 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 1.81 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 6-H), 1.77 (s, 3H, 4-CH₃), 1.30 (t, J = 7.2 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 167.8 (q, C-1), 149.6 (t, C-3), 136.5 (t, C-5), 133.9 (q, C-4), 115.4 (t, C-2), 60.3 (s, OCH₂CH₃), 14.7 (p, C-6), 14.5 (p, OCH₂CH₃), 11.9 (p, 4-CH₃).

R_f (*n*Hex/EtOAc 19:1) = 0.40.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[192].

(2*E*,4*E*)-4-Methylhexa-2,4-dienol (**204**)



In Anlehnung an AAV 1 wurde der Ester **203** (2.47 g, 16.0 mmol, 1.00 Äquiv.) mit DIBAL-H (1 M in Hexan, 40.0 mL, 2.50 Äquiv.) reduziert. Nach Aufarbeitung wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an SiO₂ (*n*Hex/EtOAc 4:1) gereinigt. Der Allylkohol **204** wurde als farblose Flüssigkeit (1.64 g, 14.6 mmol, 91%, $\geq 96\%$ *all-E*) erhalten und ohne Reinigung weiter umgesetzt.

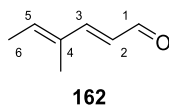
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.26 (d, J = 15.5 Hz, 1H, 3-H), 5.71 (dt, J = 15.6, 6.2 Hz, 1H, 2-H), 5.57 (q, J = 6.9 Hz, 1H, 5-H), 4.19 (d, J = 6.2 Hz, 2H, 1-H), 1.73 (m, 6H, 4-CH₃, 6-H), 1.36 (br. s, 1H, OH).

¹³C-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 136.9 (t, C-3), 133.9 (q, C-4), 127.7 (t, C-5), 124.9 (t, C-2), 64.2 (s, C-1), 14.0 (p, C-6), 12.2 (p, 4-CH₃).

R_f (*n*Hex/EtOAc 4:1) = 0.36.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[193].

(2E,4E)-4-Methylhexa-2,4-dienal (**162**)



In Anlehnung an AAV 2 wurde der Allylalkohol **204** (1.64 g, 14.6 mmol, 1.00 Äquiv.) mit MnO₂ (8.88 g, 102 mmol, 7.00 Äquiv.) oxidiert. Nach Filtration und Entfernen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde der Aldehyd **162** als farblose Flüssigkeit (1.53 g, 13.9 mmol, 95%, $\geq 96\%$ *all-E*) erhalten und ohne Reinigung weiter umgesetzt.

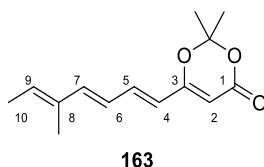
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.55 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-1), 7.11 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H, 3-H), 6.10 (m, 2H, 2-H, 5-H), 1.86 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, 6-H), 1.81 (s, 3H, 4-CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 194.4 (q, C-1), 157.9 (t, C-3), 139.0 (t, C-5), 134.6 (q, C-4), 126.7 (t, C-2), 15.0 (p, C-6), 12.1 (p, 4-CH₃).

R_f (*n*Hex/EtOAc 9:1) = 0.39.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[194].

2,2-Dimethyl-6-(((1E,3E,5E)-5-methylhepta-1,3,5,7,9-trien-1-yl)-4H-1,3-dioxin-4-on (**163**)



In Anlehnung an AAV 4 wurde das Phosphonat **156** (947 mg, 3.40 mmol, 1.50 Äquiv.) in THF abs. (20 mL) gelöst und bei -78 °C mit KHMDS (0.5 M in PhMe, 6.80 mL, 1.25 Äquiv.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 10 min bei -78 °C und 20 min bei 0 °C gerührt. Der Aldehyd **162** (250 mg, 2.27 mmol, 1.00 Äquiv.) in THF abs. (10 mL) wurde bei -78 °C langsam zugetropft und es wurde unter langsamen Erwärmen auf RT über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. NaHCO₃ aq. (10 mL) beendet, die wässrige Phase abgetrennt und mit Et₂O (3 \times 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaCl aq. (5 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an SiO₂

(*n*Hex/EtOAc 19:1 → 9:1) gereinigt, wonach das Trienyldioxinon **III-4** als gelber Feststoff (271 mg, 1.16 mmol, 51%, ≤ 91% *all-E*) erhalten wurde.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.00 (dd, *J* = 11.2, 15.1 Hz, 1H, 5-H), 6.55 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, 7-H), 6.22 (ddd, *J* = 0.5, 11.2, 15.2 Hz, 1H, 6-H), 5.98 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, 4-H), 5.78 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, 9-H), 5.28 (s, 1H, 2-H), 1.80 (m, 3H, 8-CH₃, 10-H), 1.72 (s, 6H, C(CH₃)₂).

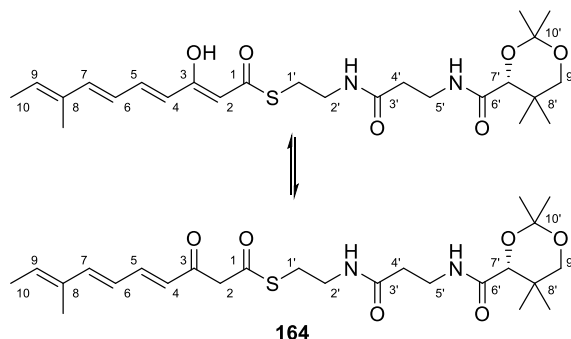
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 163.8 (q, C-3), 162.3 (q, C-1), 145.2 (t, C-7), 139.2 (t, C-5), 135.0 (t, C-9), 132.7 (q, C-8), 124.2 (t, C-6), 121.5 (t, C-4), 106.3 (q, C(CH₃)₂), 93.9 (t, C-2), 25.2 (p, C(CH₃)₂), 14.6 (p, C-10), 12.1 (p, 8-CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 2294 (w), 2920 (w), 2851 (w), 1705 (s), 1610 (m), 1599 (m), 1561 (m), 1457 (w), 1439 (w), 1388 (m), 1371 (s), 1270 (m), 1249 (m), 1190 (s), 1146 (m), 1095 (m), 1017 (s), 988 (s), 963 (m), 902 (m), 858 (m), 803 (s), 746 (m), 684 (m), 654 (m), 616 (m).

HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ für C₁₄H₁₈O₃: ber. 235.1329, gef. 235.1325.

R_f (*n*Hex/EtOAc 4:1) = 0.50.

S-(*O,O'*-Isopropyliden-*D*-pantetheinyl)-(4*E*,6*E*,8*E*)-3-oxodeca-4,6,8-trienoat (**164**)



In Anlehnung an AAV 6 wurde eine Lösung des Dioxinons **163** (150 mg, 640 μ mol, 1.00 Äquiv.) in PhMe abs. (4 mL) mit *O,O'*-Isopropyliden-*D*-pantethein (**151**, 306 mg, 960 μ mol, 1.50 Äquiv.) versetzt und über Nacht im geschlossenen Kolben bei 130 °C gerührt. Nach Einengen am Rotationsverdampfer und säulenchromatographischer Reinigung an SiO₂ (*n*Hex/EtOAc 1:3 → 0:1) wurde das Produkt **164** als gelbes Harz (121 mg, 246 μ mol, 38%, ≤ 73% *all-E*) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **enol**: 12.30 (d, *J* = 1.6 Hz, OH), 7.21 (dd, *J* = 15.0, 11.2 Hz, 1H, 5-H), 7.02 (br. s, 1H, 4'-NH), 6.55 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, 7-H), 6.24 (m, 2H, 6-H, 2'-NH), 5.79 (m, 2H, 4-H, 9-H), 5.46 (s, 1H, 2-H), 4.07 (s, 1H, 7'-H), 3.68 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, 9'-H^{ax}), 3.61 – 3.38 (m, 4H, 2'-H, 5'-H), 3.27 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, 9'-H^{äq}), 3.08 (m, 2H, 1'-H), 2.42 (m, 2H, 4'-H), 1.79 (m, 6H, 8-CH₃, 10-H), 1.45 (s, 3H, 10'-CH₃^{äq}), 1.41 (s, 3H, 10'-CH₃^{ax}), 1.03 (s, 3H, 8'-CH₃^{ax}), 0.96 (s, 3H, 8'-CH₃^{äq}); **keto**: 7.28 (dd, *J* = 15.6, 11.2 Hz, 1H, 5-H), 7.02 (br. s, 4'-NH), 6.69 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, 7-H), 6.24 (m, 2H, 6-H, 2'-NH), 5.86 (m, 2H, 4-H, 9-H), 4.07 (s, 1H, 7'-H), 3.84 (s, 2H, 2-H), 3.68 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, 9'-H^{ax}), 3.61 – 3.38 (m, 4H, 2'-H, 5'-H), 3.27 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, 9'-H^{äq}), 3.08 (m, 2H, 1'-H), 2.42 (m, 2H, 4'-H), 1.79 (m, 6H, 8-CH₃, 10-H), 1.45 (s, 3H, 10'-CH₃^{äq}), 1.41 (s, 3H, 10'-CH₃^{ax}), 1.03 (s, 3H, 8'-CH₃^{ax}), 0.96 (s, 3H, 8'-CH₃^{äq}).

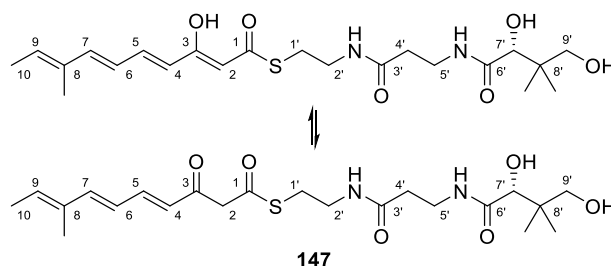
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **enol**: 193.8 (q, C-1), 171.4 (q, C-3'), 170.2 (q, C-6'), 168.0 (q, C-3), 145.1 (t, C-7), 140.9 (t, C-5), 135.0 (q, C-8), 132.7 (t, C-9), 124.5 (t, C-6), 122.9 (t, C-4), 100.5 (t, C-2), 99.2 (q, C-10'), 77.3 (t, C-7'), 71.6 (s, C-9'), 40.0 (s, C-2'), 36.1 (s, C-4'), 34.9 (s, C-5'), 33.1 (q, C-8'), 29.6 (p, 10'-CH₃^{äq}), 28.1 (s, C-1'), 22.3 (p, 8'-CH₃^{ax}), 19.1 (p, 8'-CH₃^{äq}), 18.8 (p, C-10), 18.8 (p, 10'-CH₃^{ax}), 12.0 (p, 8-CH₃); **keto**: 192.8 (q, C-1), 191.3 (q, C-3), 171.4 (q, C-3'), 170.2 (q, C-6'), 148.9 (t, C-7), 134.9 (q, C-8), 132.8 (t, C-9), 123.7 (t, C-6), 123.6 (t, C-4), 99.2 (q, C-10'), 77.3 (t, C-7'), 71.6 (s, C-9'), 55.6 (s, C-2), 40.0 (s, C-2'), 36.1 (s, C-4'), 34.9 (s, C-5'), 33.1 (q, C-8'), 29.6 (p, 10'-CH₃^{ax}), 28.1 (s, C-1'), 22.3 (p, 8'-CH₃^{ax}), 19.1 (p, 8'-CH₃^{äq}), 19.0 (p, C-10), 18.8 (p, 10'-CH₃^{ax}), 14.6 (p, 8-CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3321 (w), 2989 (w), 2937 (w), 2872 (w), 2249 (w), 1651 (m), 1556 (w), 1529 (m), 1462 (w), 1361 (w), 1336 (w), 1288 (w), 1256 (w), 1196 (m), 1159 (w), 1088 (m), 1048 (w), 1018 (w), 997 (w), 945 (w), 909 (w), 869 (m), 729 (s), 703 (m), 646 (m), 601 (m).

HRMS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ für C₂₅H₃₈N₂O₆S: ber. 517.2343, gef. 517.2360.

R_f (*n*Hex/EtOAc 1:4) = 0.24.

S-(D-Pantetheinyl)-(4E,6E,8E)-3-oxodeca-4,6,8-trienoat (147)



In Anlehnung an AAV 9 wurde das Acetonid **164** (226 mg, 456 μmol) mit Dowex™ G26 H⁺ geschützt. Nach Reinigung durch Umkehrphasensäulenchromatographie an C₁₈-SiO₂ (MeOH/H₂O 7:3) wurde der β -Ketothioester **147** als gelber Feststoff (44.5 mg, 97.8 μmol , 21%, $\leq 76\%$ *all-E*) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = *enol*: 7.09 (dd, $J = 15.0, 11.3$ Hz, 1H, 5-H), 6.48 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H, 7-H), 6.23 (dd, $J = 15.5, 11.3$ Hz, 1H, 6-H), 5.84 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H, 4-H), 5.71 (q, $J = 6.4$ Hz, 1H, 9-H), 3.79 (s, 1H, 7'-H), 3.38 (m, 3H, 5'-H, 9'-H^{ax}), 3.27 (m, 3H, 2'-H, 9'-H^{äq}), 2.97 (m, 2H, 1'-H), 2.31 (m, 2H, 4'-H), 1.70 (m, 6H, 8-CH₃, 10-H), 0.82 (s, 6H, 8'-H); *keto*: 7.28 (dd, $J = 15.2, 10.8$ Hz, 1H, 5-H), 6.69 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H, 7-H), 6.27 (dd, $J = 15.1, 10.8$ Hz, 1H, 6-H), 6.14 (d, $J = 15.2$ Hz, 1H, 4-H), 5.55 (q, $J = 7.0$ Hz, 1H, 9-H), 3.79 (s, 1H, 7'-H), 3.38 (m, 3H, 5'-H, 9'-H^{ax}), 3.27 (m, 3H, 2'-H, 9'-H^{äq}), 2.97 (m, 2H, 1'-H), 2.31 (m, 2H, 4'-H), 1.70 (m, 6H, 8-CH₃, 10-H), 0.82 (s, 6H, 8'-H).

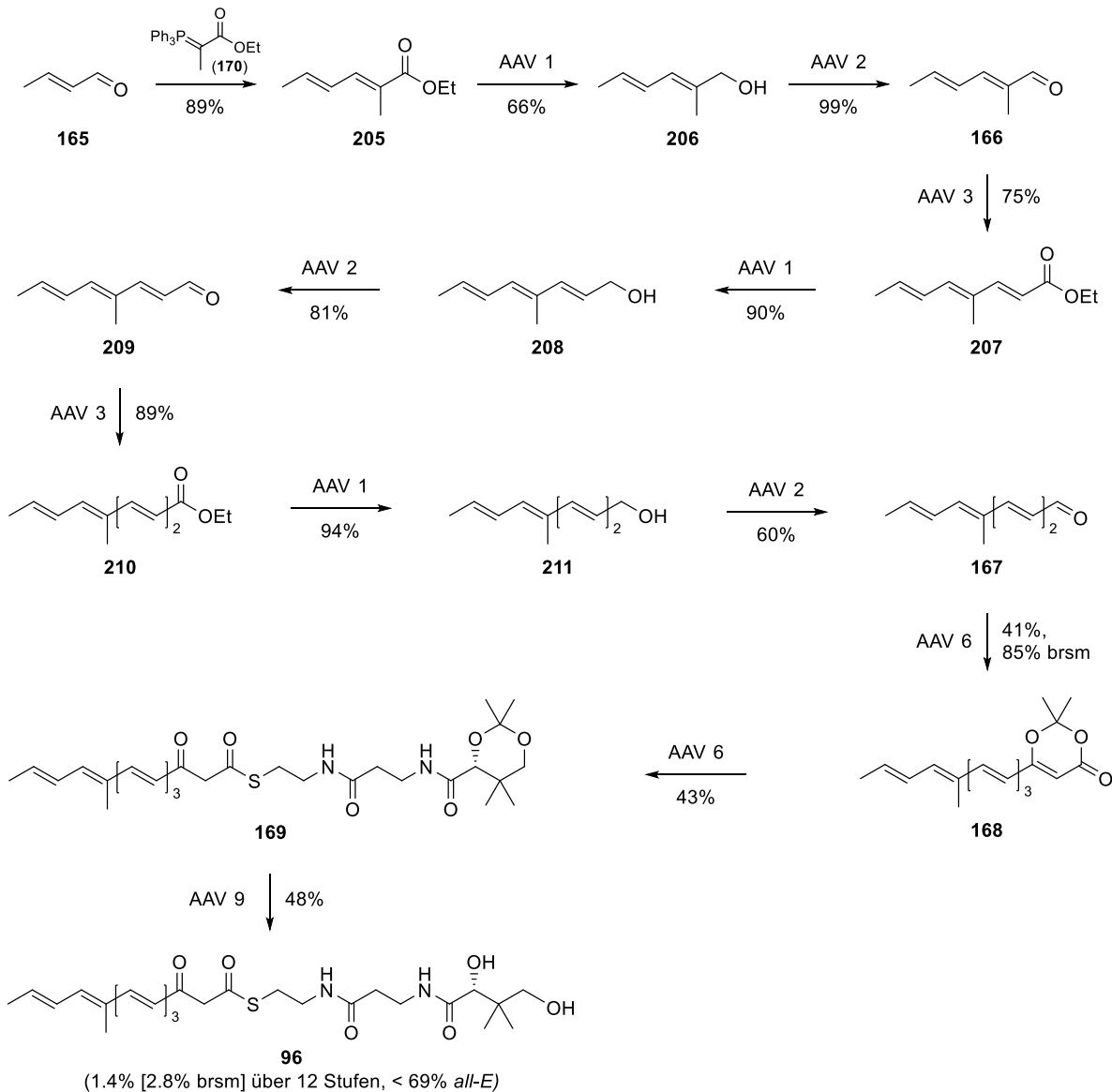
¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = *enol*: 194.9 (q, C-1), 176.1 (q, C-3'), 173.9 (q, C-6'), 168.6 (q, C-3), 145.6 (t, C-7), 141.4 (t, C-5), 136.3 (q, C-8), 132.9 (t, C-9), 125.8 (t, C-6), 124.2 (t, C-4), 77.2 (t, C-7'), 70.3 (s, C-9'), 40.4 (s, C-2'), 40.4 (q, C-8'), 36.4 (s, C-4'), 36.3 (s, C-5'), 28.6 (s, C-1'), 21.3 (p, 8'-CH₃), 14.4 (p, C-10), 11.9 (p, 8-CH₃); *keto*: 192.9 (q, C-1), 191.3 (q, C-3), 171.4 (q, C-3'), 170.2 (q, C-6'), 148.9 (t, C-7), 146.7 (t, C-5), 134.9 (q, C-8), 132.8 (t, C-9), 123.7 (t, C-6), 123.6 (t, C-6), 77.2 (t, C-7'), 70.3 (s, C-9'), 40.4 (q, C-8'), 39.8 (s, C-2'), 36.4 (s, C-4'), 36.3 (s, C-5'), 29.7 (s, C-1'), 20.9 (p, 8'-CH₃), 14.4 (p, C-10), 11.9 (p, 8-CH₃).

HRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ für C₂₂H₃₄N₂O₆S: ber. 477.2030; gef. 477.2036.

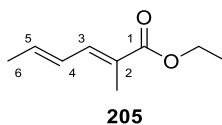
R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.34.

(all-E)-S-(D-Pantetheinyl)-3-oxo-10-methyltetradeca-4,6,8,10,12-pentaenylthioester (96)

Synthese mittels dreistufiger Homologisierung



Ethyl-(2*E*,4*E*)-2-methylhexa-2,4-dienoat (**205**)

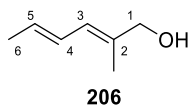


In Anlehnung an Lit.^[195] wurde das Ylid **170** (7.97 g, 22.0 mmol, 1.10 Äquiv.) in DCM (100 mL) gelöst und bei RT mit Crotonaldehyd (**165**, 1.65 mmol, 1.65 mL, 1.00 Äquiv.) versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei RT über Nacht gerührt, ehe diese am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck beinahe vollständig eingengt wurde. Nach Zugabe von Hexan (100 mL) wurde der ausgefallene Feststoff über eine Glasfritte abfiltriert und mit Hexan (2 × 50 mL) nachgewaschen. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Säulenchromatographie an SiO₂ (*n*Hex/EtOAc 49:1 → 19:1) wurde **205** als farblose Flüssigkeit (2.73 g, 17.7 mmol, 89%, ≥ 92% *all-E*) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.15 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, 3-H), 6.36 (ddq, *J* = 15.0, 11.3, 1.7 Hz, 1H, 4-H), 6.08 (dq, *J* = 15.0, 6.8 Hz, 1H, 5-H), 4.20 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 1.92 (s, 3H, 2-CH₃), 1.87 (d, *J* = 6.8 Hz, 6-H), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃).
¹³C-NMR (125 Hz, CDCl₃): δ [ppm] = 168.9 (q, C-1), 138.5 (t, C-3), 137.7 (t, C-5), 127.6 (t, C-4), 125.0 (q, C-2), 60.6 (s, OCH₂CH₃), 19.0 (p, C-6), 14.5 (p, OCH₂CH₃), 12.7 (p, 2-CH₃).
R_f (*n*Hex/EtOAc 9:1) = 0.55.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[196].

(2*E*,4*E*)-2-Methylhexa-2,4-dienol (**206**)



In Anlehnung an AAV 1 wurde der Ester **205** (2.21 g, 14.3 mmol, 1.00 Äquiv.) in DCM abs. (75 mL) mit DIBAL-H (1M in Hexan, 36 mL, 36.0 mmol, 2.52 Äquiv.) reduziert. Nach Säulenchromatographie an SiO₂ (*n*Hex/EtOAc 9:1 → 4:1) wurde der Allylkohol **206** als farblose Flüssigkeit (1.03 g, 9.18 mmol, 66%, ≥ 95% *all-E*) zu erhalten.

Aufgrund der hohen Flüchtigkeit des Alkohols wurde ein restlicher Gehalt von ca. 2 Gew.-% an EtOAc im gereinigten Produkt toleriert.

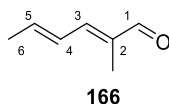
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.27 (ddq, *J* = 15.0, 10.8, 1.5 Hz, 1H, 4-H), 6.00 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, 3-H), 5.70 (dq, *J* = 15.0, 6.7 Hz, 1H, 5-H), 4.04 (m, 2H, 1-H), 1.78 (d, *J* = 6.7 Hz, 6-H), 1.77 (s, 3H, 2-CH₃), 1.49 (br. s, 1H, OH).

¹³C-NMR (125 Hz, CDCl₃): δ [ppm] = 134.5 (q, C-2), 129.6 (t, C-5), 127.3 (t, C-4), 125.3 (t, C-3), 68.8 (s, C-1), 18.5 (p, C-6), 14.1 (p, 2-CH₃).

R_f (*n*Hex/EtOAc 4:1) = 0.30.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[197].

(2*E*,4*E*)-2-Methylhexa-2,4-dienal (166)



In Anlehnung AAV 2 wurde der Allylalkohol **206** (1.03 g, 9.18 mmol, 1.00 Äquiv.) in DCM abs. (18.5 mL) gelöst und mit MnO₂ (9.07 g, 91.8 mmol, 10.0 Äquiv.) oxidiert. Der Aldehyd **166** wurde als farblose Flüssigkeit (1.00 g, 9.09 mmol, 99%, ≥ 93% *all-E*) erhalten und ohne zusätzliche Aufreinigung weiter umgesetzt.

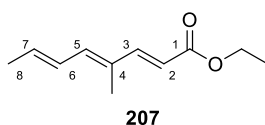
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.41 (s, 1H, 1-H), 6.81 (d, *J* = 11.1 Hz, 1H, 3-H), 6.54 (ddq, *J* = 14.9, 11.1, 1.7 Hz, 1H, 4-H), 6.25 (dq, *J* = 14.9, 6.9 Hz, 1H, 5-H), 1.93 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, 6-H), 1.82 (s, 3H, 2-CH₃).

¹³C-NMR (125 Hz, CDCl₃): δ [ppm] = 195.3 (t, C-1), 149.3 (t, C-3), 140.6 (t, C-5), 135.9 (q, C-2), 127.5 (t, C-4), 19.3 (p, C-6), 9.5 (p, 2-CH₃).

R_f (*n*Hex/EtOAc 4:1) = 0.63.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[198].

Ethyl-(2E,4E,6E)-4-methylocta-2,4,6-trienoat (207)



Gemäß AAV 3 wurde der Aldehyd **166** (1.00 g, 9.09 mmol) mit NaH und Triethylphosphonoacetat umgesetzt. Das rohe Produkt wurde durch Säulenchromatographie an SiO₂ (Pentan/Et₂O 19:1) gereinigt. Der Ester **207** wurde als farblose Flüssigkeit (1.23 g, 6.81 mmol, 75%, ≥ 95% *all-E*) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.33 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, 3-H), 6.42 (m, 1H, 6-H), 6.35 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, 5-H), 5.95 (dq, *J* = 14.3, 6.9 Hz, 1H, 7-H), 5.84 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, 2-H), 4.21 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 1.86 (m, 6H, 4-CH₃, 8-H), 1.30 (t, *J* = 7.2 Hz, OCH₂CH₃).

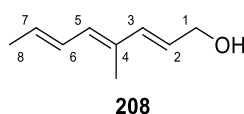
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 167.7 (q, C-1), 149.5 (t, C-3), 138.9 (t, C-5), 135.3 (t, C-7), 131.2 (q, C-4), 128.0 (t, C-6), 116.3 (t, C-2), 60.3 (s, OCH₂CH₃), 19.0 (p, C-8), 14.5 (p, OCH₂CH₃), 12.5 (p, 4-CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3029 (w), 2981 (w), 2937 (w), 2912 (w), 1704 (s), 1638 (w), 1606 (s), 1446 (w), 1392 (w), 1367 (w), 1307 (m), 1270 (s), 1246 (m), 1210 (w), 1162 (s), 1149 (s), 1095 (w), 1037 (m), 1022 (m), 980 (m), 962 (m), 930 (w), 850 (m), 809 (w), 723 (w).

HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ für C₁₁H₁₆O₂: ber. 181.1223, gef. 181.1222.

R_f (*n*Hex/EtOAc 9:1) = 0.52.

(2E,4E,6E)-4-Methylocta-2,4,6-trienol (208)



Gemäß AAV 1 wurde der Ester **207** (1.19 g, 6.60 mmol) mit DIBAL-H reduziert. Nach Säulenchromatographie an SiO₂ (Pentan/Et₂O 2:1 → 1:1) wurde der Allylalkohol **208** als gelbliche Flüssigkeit (819 mg, 5.93 mmol, 90%, ≥ 95% *all-E*) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.37 (ddq, *J* = 14.5, 11.2, 1.6 Hz, 1H, 6-H), 6.26 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H, 3-H), 6.03 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, 5-H), 5.82 – 5.71 (m, 2H, 2-H, 7-H), 4.20 (m, 2H, 1-H), 1.84 (s, 3H, 4-CH₃), 1.81 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, 8-H), 1.69 (br. s, 1H, OH).

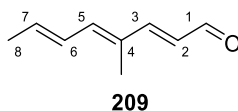
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 136.6 (t, C-3), 131.9 (q, C-4), 131.7 (t, C-5), 130.9 (t, C-7), 128.1 (t, C-6), 126.6 (t, C-2), 64.0 (s, C-1), 18.7 (p, C-8), 12.7 (p, 4-CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3303 (br. w), 3027 (w), 2913 (w), 2854 (w), 1629 (w), 1438 (w), 1391 (w), 1301 (w), 1149 (w), 1101 (w), 1083 (w), 1025 (w), 994 (m), 964 (s), 930 (w), 886 (w), 636 (w), 613 (w).

HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ für C₉H₁₄O: ber. 139.1117, gef. 139.1117.

R_f (Pentan/Et₂O 1:1) = 0.40.

(2E,4E,6E)-4-Methylocta-2,4,6-trienal (**209**)



Gemäß AAV 2 wurde der Allylalkohol **208** (779 mg, 5.64 mmol) mit MnO₂ oxidiert. Der Aldehyd **209** wurde nach Säulenchromatographie an SiO₂ (Pentan/Et₂O 9:1 → 4:1) als gelbe Flüssigkeit (620 mg, 4.55 mmol, 81%, ≥ 94% *all-E*) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.56 (d, *J* = 7.8 Hz, 1-H), 7.12 (d, *J* = 15.5 Hz, 3-H), 6.44 (m, 2H, 5-H, 6-H), 6.15 (dd, *J* = 15.5, 7.8 Hz, 2-H), 6.05 (m, 1H, 7-H), 1.89 (m, 6H, 4-CH₃, 8-H).

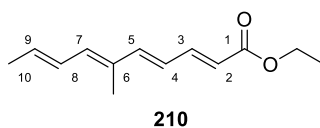
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 194.0 (t, C-1), 157.6 (t, C-3), 140.9 (t, C-5), 137.3 (t, C-7), 131.6 (q, C-4), 128.0 (t, C-6), 127.3 (t, C-2), 19.1 (p, C-8), 12.6 (p, 4-CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3030 (w), 3001 (w), 2915 (w), 2812 (w), 2725 (w), 1741 (w), 1668 (s), 1634 (m), 1593 (s), 1435 (w), 1386 (m), 1302 (w), 1288 (w), 1213 (w), 1157 (m), 1122 (s), 1091 (m), 1007 (m), 967 (s), 929 (m), 851 (w), 829 (m), 731 (w), 605 (m).

HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ für C₉H₁₂O: ber. 137.0961, gef. 137.0959.

R_f (*n*Hex/EtOAc 9:1) = 0.34.

Ethyl-(2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-6-methyl-2,4,6,8-decatetraenoat (210)



Gemäß AAV 3 wurde der Aldehyd **209** (591 mg, 4.34 mmol) mit Triethylacetophosphonat und NaH umgesetzt. Säulenchromatographie an SiO₂ (Pentan/Et₂O 1:0 → 4:1) lieferte den Ester **210** als gelbe Flüssigkeit (795 mg, 3.85 mmol, 89%, ≥ 92% *all-E*).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.34 (dd, *J* = 15.2, 11.2 Hz, 1H, 3-H), 6.58 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, 5-H), 6.41 (ddq, *J* = 14.8, 11.2, 1.7 Hz, 1H, 7-H), 6.30 (dd, *J* = 15.1, 11.2 Hz, 1H, 8-H), 6.19 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, 4-H), 5.88 (m, 2H, 2-H, 9-H), 4.19 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 1.87 (s, 3H, 6-CH₃), 1.84 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 10-H), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

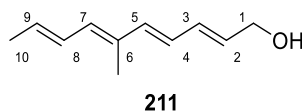
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 167.5 (q, C-1), 145.8 (t, C-5), 145.3 (t, C-3), 135.9 (t, C-7), 133.5 (t, C-9), 132.4 (q, C-6), 128.2 (t, C-8), 124.9 (t, C-4), 119.8 (t, C-2), 60.3 (s, OCH₂CH₃), 19.0 (p, C-10), 14.5 (p, OCH₂CH₃), 12.5 (p, 6-CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3029 (w), 2980 (w), 2911 (w), 1703 (s), 1615 (s), 1588 (m), 1446 (w), 1391 (w), 1366 (m), 1331 (m), 1306 (m), 1255 (m), 1235 (s), 1202 (w), 1178 (m), 1153 (s), 1125 (s), 1096 (w), 1038 (m), 995 (s), 963 (m), 930 (w), 871 (m), 832 (w), 719 (w).

HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ für C₁₃H₁₈O₂: ber. 207.1380, gef. 207.1379.

R_f (*n*Hex/EtOAc 9:1) = 0.48.

(2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-6-Methyl-2,4,6,8-decatetraenol (211)



Gemäß AAV 1 wurde der Ester **210** (432 mg, 2.09 mmol) mit DIBAL-H reduziert. Der Allylalkohol **211** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an SiO₂ (*n*Hex/EtOAc 9:1 → 4:1) als gelbes Öl (318 mg, 1.94 mmol, 94%, ≥ 91% *all-E*) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.39 (ddq, *J* = 14.8, 11.2, 1.7 Hz, 1H, 8-H), 6.27 (m, 3H, 3-H, 5-H, 4-H), 6.06 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, 7-H), 5.84 (dt, *J* = 14.8, 5.9 Hz, 1H, 2-H), 5.77

(dq, $J = 14.8, 7.0$ Hz, 1H, 9-H), 4.19 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H, 1-H), 1.85 (s, 3H, 6-CH₃), 1.82 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 10-H), 1.63 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, OH).

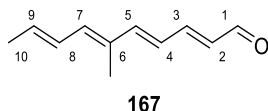
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 138.3 (t, C-5), 132.7 (q, C-6), 132.5 (t, C-3), 132.2 (t, C-7), 131.1 (t, C-2), 131.0 (t, C-9), 128.3 (t, C-8), 126.6 (t, C-4), 63.7 (s, C-1), 18.8 (p, C-10), 12.6 (p, 6-CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3313 (br. w), 3024 (w), 2912 (w), 2852 (w), 1630 (w), 1598 (w), 1444 (w), 1391 (w), 1374 (w), 1297 (w), 1242 (w), 1207 (w), 1136 (w), 1085 (m), 980 (s), 960 (s), 929 (m), 889 (w), 856 (w), 724 (w), 613 (w).

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ für C₁₁H₁₆O: ber. 165.1274, gef. 165.1272.

R_f (*n*Hex/EtOAc 4:1) = 0.20.

(2E,4E,6E,8E)-6-Methyl-2,4,6,8-decatetraenal (167)



Gemäß AAV 2 wurde der Alkohol **211** (287 mg, 1.75 mmol) mit MnO₂ oxidiert. Nach Säulenchromatographie an SiO₂ (*n*Hex/EtOAc 9:1) wurde der Aldehyd **167** als gelbes Öl (170 mg, 1.05 mmol, 60%, $\geq 91\%$ *all-E*) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.55 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 1-H), 7.17 (dd, $J = 15.1, 11.1$ Hz, 1H, 3-H), 6.70 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H, 5-H), 6.44 (m, 2H, 4-H, 8-H), 6.29 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, 7-H), 6.16 (dd, $J = 15.1, 8.0$ Hz, 1H, 2-H), 5.95 (dq, $J = 14.7, 7.0$ Hz, 1H, 9-H), 1.91 (s, 3H, 6-CH₃), 1.87 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 10-H).

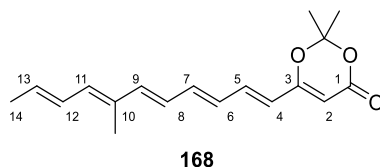
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 193.8 (q, C-1), 153.1 (t, C-3), 147.9 (t, C-5), 137.7 (t, C-7), 134.8 (t, C-9), 132.5 (q, C-6), 130.5 (t, C-2), 128.2 (t, C-8), 125.0 (t, C-4), 19.0 (p, C-10), 12.6 (p, 6-CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3030 (w), 2999 (w), 2919 (w), 2851 (w), 2809 (w), 2733 (w), 1666 (s), 1605 (s), 1580 (s), 1446 (w), 1394 (w), 1375 (w), 1295 (w), 1169 (m), 1142 (s), 1114 (s), 1010 (m), 983 (m), 965 (m), 930 (w), 869 (w), 728 (w), 649 (w), 606 (w).

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ für C₁₁H₁₄O: ber. 163.1117, gef. 163.1112.

R_f (*n*Hex/EtOAc 4:1) = 0.41.

2,2-Dimethyl-6-(((1*E*,3*E*,5*E*,7*E*,9*E*)-7-methylundeca-1,3,5,7,9-pentaen-1-yl)-4*H*-1,3-dioxin-4-on (**168**)



In Anlehnung an AAV 4 wurde der Aldehyd **167** (157 mg, 967 μmol , 1.00 Äquiv.) mit dem Phosphonat **156** (323 mg, 1.16 mmol, 1.25 Äquiv.) umgesetzt. Nach 24 h Rühren wurde eine zweite Portion Phosphonat **156** (202 mg, 725 μmol , 0.75 Äquiv.) in THF abs. (6 mL) bei $-78\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ mit KHMDS (0.5 M in PhMe, 1.45 mL, 0.75 Äquiv.) vordeprotoniert. Die Reaktionsmischung wurde auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt, mit der Reagenzlösung versetzt und über Nacht unter Rühren auf RT erwärmt. Nach Aufarbeitung und Säulenchromatographie an SiO_2 (*n*Hex/EtOAc 9:1 \rightarrow 4:1) wurde das Pentaenyldioxinon **168** neben zurückgewonnenem Edukt (82.2 mg, 508 μmol , 52%) als gelbes Harz (112 mg, 391 μmol , 41%, 85% brsm, $\leq 90\%$ *all-E*) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.99 (dd, $J = 15.1, 11.1$ Hz, 1H, 5-H), 6.60 (dd, $J = 14.9, 11.1$ Hz, 1H, 7-H), 6.41 (m, 2H, 9-H, 12-H), 6.32 (dd, $J = 14.9, 11.1$ Hz, 2H, 6-H, 8-H), 6.16 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, 11-H), 5.96 (d, $J = 15.1$ Hz, 1H, 4-H), 5.85 (dq, $J = 14.7, 6.8$ Hz, 1H, 13-H), 5.30 (s, 1H, 2-H), 1.88 (s, 3H, 10- CH_3), 1.85 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 14-H), 1.72 (s, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$).

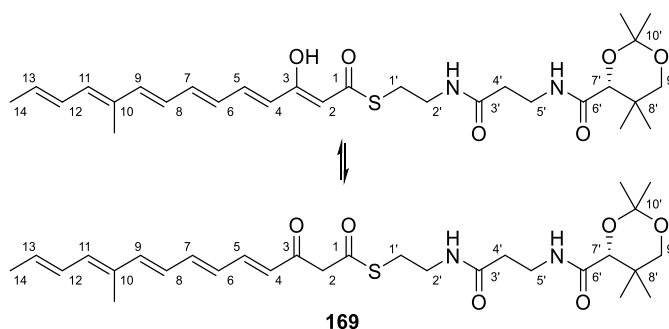
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 163.7 (q, C-3), 162.2 (q, C-1), 142.1 (t, C-9), 141.0 (t, C-7), 138.5 (t, C-5), 134.6 (t, C-11), 133.0 (q, C-10), 132.7 (t, C-13), 129.8 (t, C-6), 128.4 (t, C-12), 127.0 (t, C-8), 121.8 (t, C-4), 106.3 (q, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 94.2 (t, C-2), 25.2 (p, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 19.0 (p, C-14), 12.6 (p, 10- CH_3).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3025 (w), 2999 (w), 2920 (w), 2861 (w), 1717 (s), 1620 (m), 1566 (s), 1442 (w), 1383 (m), 1374 (m), 1274 (m), 1253 (m), 1204 (s), 1140 (w), 1019 (w), 997 (m), 964 (w), 902 (w), 800 (w), 608 (w).

HRMS (ESI) m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ für $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_3$: ber. 287.1642, gef. 287.1636.

R_f (*n*Hex/EtOAc 4:1) = 0.35.

S-(*O,O'*-Isopropyliden-D-pantetheinyl)-(4*E*,6*E*,8*E*,10*E*,12*E*)-10-methyl-3-oxotetradeca-4,6,8,10,12-pentaenoat (**169**)



Gemäß AAV 6 wurde das Pentaenyldioxinon **168** (69.1 mg, 241 μ mol) mit einer Lösung von *O,O'*-Isopropyliden-D-pantethein (**151**) umgesetzt. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie an SiO₂ (*n*Hex/EtOAc 1:1 \rightarrow 1:5) und Umkehrphasensäulenchromatographie an C₁₈-SiO₂ (MeOH/H₂O 8:2 \rightarrow 1:0) gereinigt, wonach der Isopropyliden- β -ketothioester **169** als oranger, amorpher Feststoff (50.4 mg, 92.2 μ mol, 43%, \leq 69% *all-E*) erhalten wurde.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = *enol*: 12.28 (d, J = 1.4 Hz, 1H, 3-OH), 7.21 (dd, J = 14.9, 11.4 Hz, 1H, 5-H), 7.02 (m, 1H, 5'-NH), 6.61 (dd, J = 14.9, 10.9 Hz, 1H, 7-H), 6.54 – 6.30 (m, 4H, 6-H, 8-H, 9-H, 12-H), 6.19 (m, 2H, 11-H, 2'-NH), 5.92 – 5.77 (m, 2H, 4-H, 13-H), 5.48 (s, 1H, 2-H), 4.08 (s, 1H, 7'-H), 3.68 (d, J = 11.7 Hz, 9'-H^{ax}), 3.61 – 3.42 (m, 4H, 2'-H, 5'-H), 3.27 (d, J = 11.7 Hz, 1H, 9'-H^{äq}), 3.09 (m, 2H, 1'-H), 2.42 (m, 2H, 4'-H), 1.87 (m, 6H, 10-CH₃, 14-H), 1.46 (s, 3H, 10'-CH₃^{äq}), 1.42 (s, 3H, 10'-CH₃^{ax}), 1.04 (s, 3H, 8'-CH₃^{ax}), 0.97 (s, 3H, 8'-CH₃^{äq}); *keto*: 7.28 (dd, J = 15.6, 11.5 Hz, 1H, 5-H), 7.02 (m, 1H, 5'-NH), 6.75 (dd, J = 14.6, 11.0 Hz, 1H, 7-H), 6.54 – 6.30 (m, 5H, 6-H, 8-H, 9-H, 11-H, 12-H), 6.19 (m, 2H, 4-H, 2'-NH), 5.92 – 5.77 (m, 1H, 13-H), 4.08 (s, 1H, 7'-H), 3.84 (s, 2H, 2-H), 3.68 (d, J = 11.7 Hz, 9'-H^{ax}), 3.61 – 3.42 (m, 4H, 2'-H, 5'-H), 3.27 (d, J = 11.7 Hz, 1H, 9'-H^{äq}), 3.08 (m, 2H, 1'-H), 2.43 (m, 2H, 4'-H), 1.87 (m, 6H, 10-CH₃, 14-H), 1.46 (s, 3H, 10'-CH₃^{äq}), 1.42 (s, 3H, 10'-CH₃^{ax}), 1.04 (s, 3H, 8'-CH₃^{ax}), 0.97 (s, 3H, 8'-CH₃^{äq}).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = *enol*: 193.8 (q, C-1), 171.4 (q, C-3'), 170.3 (q, C-6'), 167.8 (q, C-3), 142.1 (t, C-9), 140.9 (t, C-7), 140.2 (t, C-5), 134.6 (t, C-11), 133.0 (q, C-10), 132.7 (t, C-13), 130.1 (t, C-6), 128.4 (t, C-12), 127.1 (t, C-8), 123.3 (t, C-4), 100.8 (t, C-2), 99.2 (q, C-10'), 77.3 (t, C-7'), 71.6 (s, C-9'), 40.0 (s, C-2'), 36.1 (s, C-4'), 34.9 (s, C-5'), 33.1 (q, C-8'),

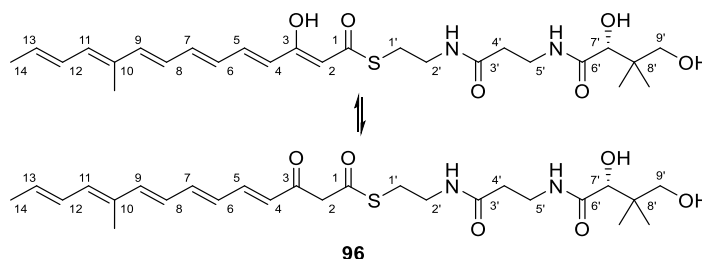
29.6 (p, 10'-CH₃^{äq}), 28.0 (s, C-1'), 22.3 (p, 8'-CH₃^{ax}), 19.1 (p, 8'-CH₃^{äq}), 19.0 (p, C-14), 18.8 (p, 10'-CH₃^{ax}), 12.6 (p, 10-CH₃); **keto**: 192.8 (q, C-1), 191.2 (q, C-3), 171.5 (q, C-3'), 170.2 (q, C-6'), 145.8 (t, C-5), 144.7 (t, C-7), 143.9 (t, C-9), 135.7 (t, C-11), 133.5 (t, C-13), 132.8 (q, C-10), 129.0, 128.4, 126.8, 126.7 (t, C-4, C-6, C-8, C-12), 99.2 (q, C-10'), 77.3 (t, C-7'), 71.6 (s, C-9'), 55.7 (s, C-2), 39.9 (s, C-2'), 36.0 (s, C-4'), 34.8 (s, C-5'), 33.1 (q, C-8'), 29.6 (p, 10'-CH₃^{äq}), 29.3 (s, C-1'), 22.3 (p, 8'-CH₃^{ax}), 19.1 (p, 8'-CH₃^{äq}), 19.0 (p, C-14), 18.8 (p, 10'-CH₃^{ax}), 12.6 (p, 10-CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3317 (br. w), 2993 (w), 2932 (w), 2876 (w), 1656 (s), 1626 (m), 1562 (s), 1546 (s), 1460 (m), 1439 (m), 1411 (m), 1391 (m), 1376 (m), 1362 (m), 1332 (w), 1291 (w), 1258 (m), 1222 (m), 1198 (m), 1160 (m), 1143 (w), 1088 (s), 1051 (w), 999 (m), 967 (w), 945 (w), 930 (w), 867 (m), 756 (m).

HRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ für C₂₉H₄₂N₂O₆S: ber. 569.2656, gef. 569.2656.

R_f (nHex/EtOAc 1:4) = 0.30.

S-D-Pantetheinyl-(4E,6E,8E,10E,12E)-10-methyl-3-oxotetradeca-4,6,8,10,12-pentaenoat (**96**)



Gemäß AAV 9 wurde das Acetonid **169** (18.5 mg, 33.8 μ mol) mit Dowex™ G26 H⁺ entschützt. Umkehrphasensäulenchromatographie an C₁₈-SiO₂ (MeOH/MeCN/H₂O 48:12:40 → 64:16:20) lieferte den β -Ketothioester **96** als orangen, amorphen Feststoff (8.0 mg, 15.8 μ mol, 48%, < 69% *all-E*).

Um eine ausreichende Löslichkeit zu erreichen, wurde für die NMR-Spektroskopie eine Mischung aus C₆D₆ und CD₃OD (ca. 2:1) verwendet. Als Referenz dienen die Signale der Restprotonen des CD₃OD.

¹H-NMR (500 MHz, C₆D₆/CD₃OD ~2:1): δ [ppm] = **enol**: 7.26 (ddd, J = 10.0, 11.4, 0.5 Hz, 1H, 5-H), 6.52 – 6.14 (m, 6H, 6-H, 7-H, 8-H, 9-H, 11-H, 12-H), 5.80 (m, 2H, 4-H, 13-H), 4.02

(s, 1H, 7'-H), 3.50 (m, 4H, 5'-H, 9'-H), 3.39 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, 2'-H), 3.08 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, 1'-H), 2.38 (m, 2H, 4'-H), 1.79 (m, 6H, 10-CH₃, 14-H), 1.01 (8'-CH₃); **keto**: 7.33 (ddd, $J = 15.3$, 11.3, 0.7 Hz, 1H, 5-H), 6.70 (dd, $J = 14.6$, 11.0 Hz, 1H, 7-H), 6.52 – 6.14 (m, 6H, 4-H, 6-H, 7-H, 8-H, 9-H, 11-H, 12-H), 5.80 (m, 1H, 13-H), 4.02 (s, 1H, 7'-H), 3.50 (m, 4H, 5'-H, 9'-H), 3.33 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, 2'-H), 3.02 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, 1'-H), 2.38 (m, 2H, 4'-H), 1.79 (m, 6H, 10-CH₃, 14-H), 1.01 (m, 6H, 8'-CH₃).

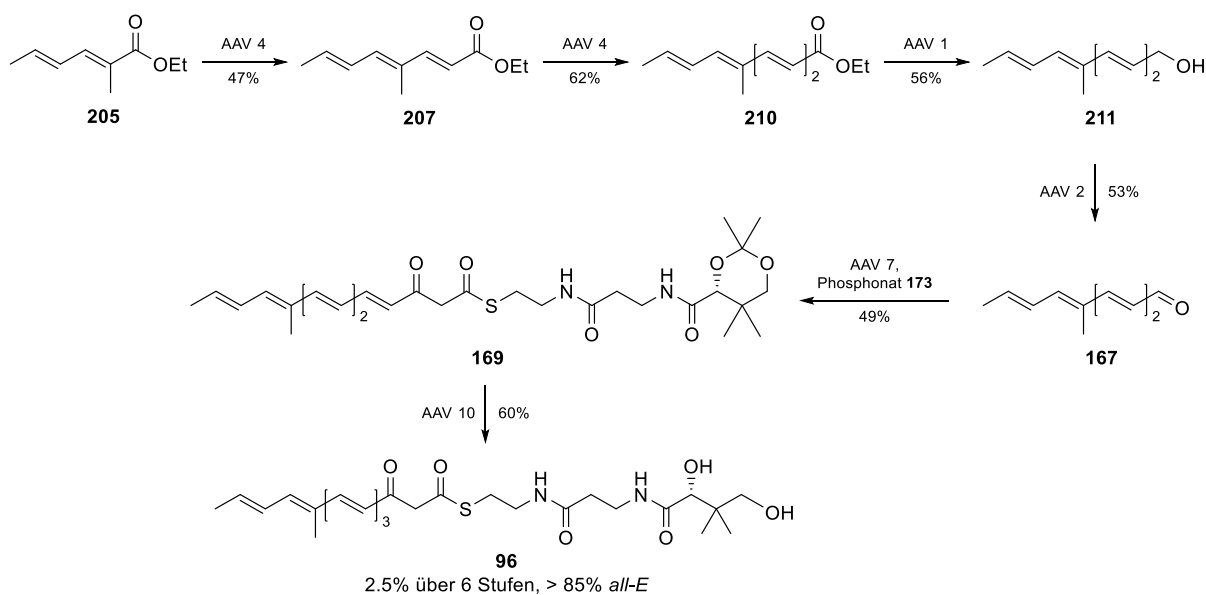
¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ [ppm] = **enol**: 194.7 (q, C-1), 175.8 (q, C-3'), 173.6 (q, C-6'), 168.3 (q, C-3), 142.7 (t, C-9), 141.5 (t, C-7), 140.7 (t, C-5), 135.2 (t, C-11), 132.6 q, (C-10), 129.4 (t, C-12), 129.2 (t, C-13), 128.1 (t, C-8), 127.9 (t, C-6), 124.3 (t, C-4), 77.3 (t, C-7'), 70.5 (s, C-9'), 40.2 (s, C-2'), 40.2 (q, C-8'), 36.2 (s, C-4', C-5'), 28.5 (s, C-1'), 21.2 (p, 8'-CH₃), 21.1 (p, 8'-CH₃), 18.9 (p, C-14), 12.6 (p, 10-CH₃); **keto**: 193.5 (q, C-1), 193.4 (q, C-3), 175.8 (q, C-3'), 173.6 (q, C-6'), 147.2 (t, C-5), 145.6 (t, C-7), 144.6 (t, C-9), 136.3 (t, C-11), 133.5 (t, C-13), 132.6 (q, C-10), 130.2 (t, C-12), 129.3 (t, C-8), 127.8 (t, C-6), 124.3 (t, C-4), 79.1 (t, C-7'), 70.5 (s, C-9'), 40.2 (q, C-8'), 39.7 (s, C-2'), 36.2 (s, C-4'), 36.1 (s, C-5'), 29.6 (s, C-1'), 21.2 (p, 8'-CH₃), 21.1 (p, 8'-Me), 19.0 (p, C-14), 12.6 (p, 10-CH₃).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3305 (br. w), 3022 (w), 2992 (w), 2928 (w), 2867 (w), 1660 (m), 1643 (m), 1631 (m), 1580 (m), 1564 (m), 1532 (m), 1443 (m), 1437 (m), 1414 (w), 1390 (m), 1376 (m), 1362 (m), 1255 (w), 1222 (w), 1197 (m), 1160 (w), 1089 (s), 1005 (s), 980 (s), 960 (s), 930 (m), 867 (m), 762 (w), 728 (w).

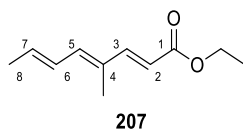
HRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ für C₂₆H₃₈O₆N₂S: ber. 529.2343, gef. 529.2344.

R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.52.

Synthese mittels reduktiver HWE-Homologisierung



Ethyl-(2E,4E,6E)-4-methylocta-2,4,6-trienoat (207)

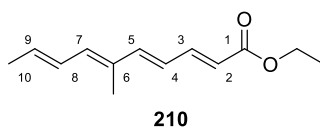


In Anlehnung an AAV 4 wurde Ethyl-(2E,4E)-2-methylhexa-2,4-dienoat (**205**, 1.54 g, 10.0 mmol) mit Diethylsilan und $[\text{IrCl}(\text{coe})_2]_2$ umgesetzt. Überschüssiges DCM und H_2SiEt_2 wurden durch Destillation unter vermindertem Druck (300 mbar \rightarrow 0.05 mbar) entfernt.

Ohne weitere Aufarbeitung wurde das rohe Silylacetal in THF abs. (10 mL) bei 0 °C zu einer Lösung von KOSiMe_3 (2 M in THF) und Triethylphosphonat in THF abs. (30 mL) gegeben und die Mischung für 50 min gerührt. Aufarbeitung und säulenchromatographische Reinigung an SiO_2 (Pentan/ Et_2O 19:1 \rightarrow 9:1) lieferte den Ester **207** als farblose Flüssigkeit (846 mg, 4.69 mmol, 47%, $\geq 92\%$ *all-E*).

Analytische Daten entsprechend vorheriger Synthese.

Ethyl-(2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-6-methyl-2,4,6,8-decatetraenoat (**210**)

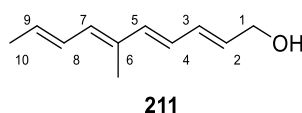


In Anlehnung an AAV 4 wurde der Ester **207** (846 mg, 4.69 mmol) mit Diethylsilan und $[\text{IrCl}(\text{coe})_2]_2$ umgesetzt. Überschüssiges DCM und H_2SiEt_2 wurden durch Destillation unter vermindertem Druck (300 mbar \rightarrow 0.05 mbar) entfernt.

Zu einer Lösung von KOSiMe_3 (2M in THF, 2.94 mL, 5.87 mmol, 1.25 Äquiv.) in THF abs. (20 mL) wurde bei 0 °C Triethylphosphonoacetat (1.16 mL, 5.87 mmol, 1.25 Äquiv.) getropft und 5 min gerührt. Das rohe Silylacetal wurde in THF abs. (24 mL) gelöst und zur Reaktionslösung gegeben. Es wurde bei 0 °C für 45 min gerührt, ehe die Reaktion durch Zugabe von ges. NH_4Cl aq. beendet wurde. Nach Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung an SiO_2 (Pentan/ Et_2O 19:1 \rightarrow 9:1) lag der Ester **210** als farblose Flüssigkeit (596 mg, 2.89 mmol, 62%, $\geq 93\%$ *all-E*) vor.

Analytische Daten entsprechend vorheriger Synthese.

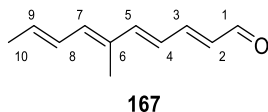
(2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-6-Methyl-2,4,6,8-decatetraenol (**211**)



Gemäß AAV 1 wurde der Ester **210** (596 mg, 2.89 mmol) mit DIBAL-H reduziert. Der Allylalkohol **211** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung an SiO_2 (*n*Hex/ EtOAc 9:1 \rightarrow 4:1) als gelbes Öl (266 mg, 1.62 mmol, 56%, $>97\%$ *all-E*) erhalten.

Analytische Daten entsprechend vorheriger Synthese.

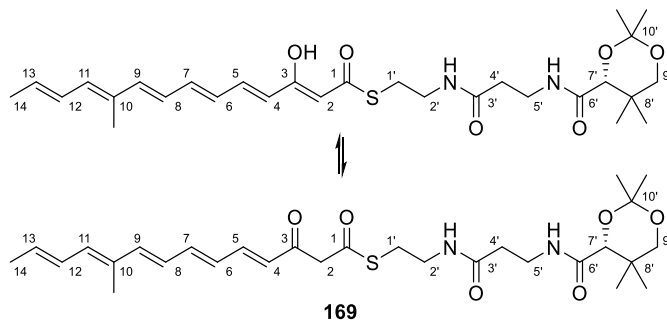
(2E,4E,6E,8E)-6-Methyl-2,4,6,8-decatetraenal (167)



Gemäß AAV 2 wurde der Alkohol **211** (287 mg, 1.75 mmol) mit MnO₂ oxidiert. Nach Säulenchromatographie an SiO₂ (nHex/EtOAc 9:1) wurde der Aldehyd **167** als gelbes Öl (170 mg, 1.05 mmol, 60%, ≥ 91% *all-E*) erhalten.

Analytische Daten entsprechend vorheriger Synthese.

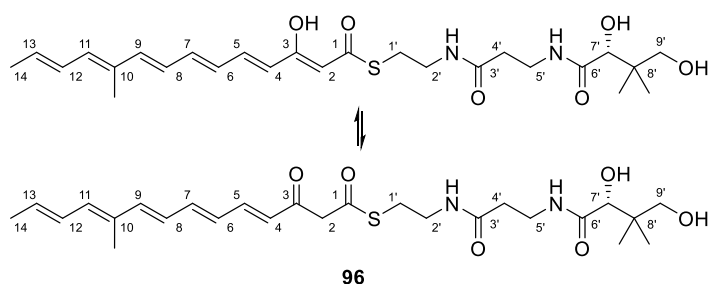
S-(O,O'-Isopropyliden-D-pantetheinyl)-(4E,6E,8E,10E,12E)-10-methyl-3-oxotetradeca-4,6,8,10,12-pentaenoat (169)



Gemäß AAV 7 wurde der Aldehyd **167** (68.3 mg, 421 μmol) mit dem Phosphonat [7] und LiHMDS umgesetzt. Nach Säulenchromatographie an SiO₂ (DCM/MeOH 1:0 → 9:1) wurde der Isopropyliden-β-ketothioester **169** als oranger Feststoff (112 mg, 205 μmol, 49%, ≤ 93% *all-E*) erhalten.

Analytische Daten entsprechend vorheriger Synthese.

S-D-Pantetheinyl-(4E,6E,8E,10E,12E)-10-methyl-3-oxotetradeca-4,6,8,10,12-pentaenoat (96)

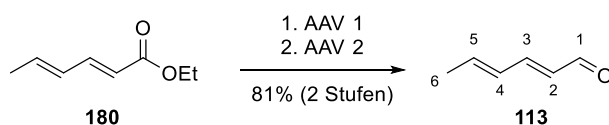


In Anlehnung an AAV 10 wurde der Isopropyliden- β -ketothioester **169** (9.6 mg, 17.6 μ mol) in TFE abs. mit TfOH für 3.5 h bei RT gerührt. Nach Aufarbeitung wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie gereinigt, wonach der β -Ketothioester **96** als amorpher orangener Feststoff (5.3 mg, 10.5 μ mol, 60%, > 85% *all-E*) erhalten wurde.

Analytische Daten entsprechend vorheriger Synthese.

(all-E)-S-(N-Acetylcysteaminyl)-3-oxodeca-4,6,8-trienthioat (146)

(2E,4E)-Hexadienal (113)



Gemäß AAV 1 wurde frisch destilliertes Ethylsorbat (**180**, 701 mg, 5.00 mmol) mit DIBAL-H reduziert. Nach Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der rohe Allylalkohol (832 mg) wurde gemäß AAV 2 direkt mit MnO₂ oxidiert. Die Reaktionsmischung wurde über Celite® filtriert. Der Filterkuchen wurde mit Et₂O (100 mL) gewaschen. Die vereinigten Produktlösungen wurden unter vermindertem Druck eingedunstet und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an SiO₂ (Pentan/Et₂O 9:1 \rightarrow 4:1) gereinigt. Der Aldehyd **113** wurde als farbloses Öl (390 mg, 4.06 mmol, 81% über 2 Stufen, \geq 97% *all-E*) erhalten.

Das gereinigte Produkt enthielt einen restlichen Anteil von ca. 2 Gew.-% Et₂O. Aufgrund der hohen Flüchtigkeit wurde auf ein vollständiges Entfernen des Et₂O verzichtet.

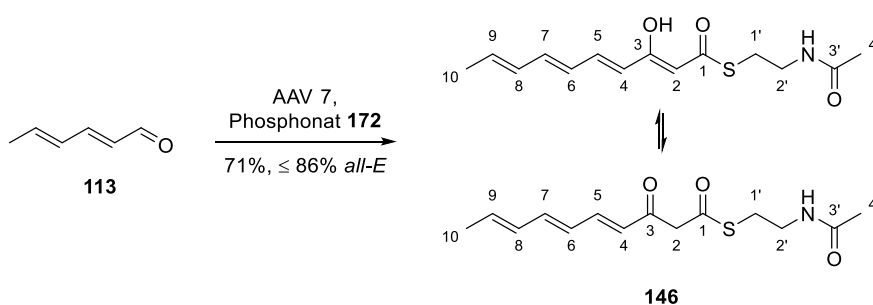
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 1-H), 7.07 (dd, 15.3, 10.1 Hz, 1H, 3-H), 6.31 (m, 2H, 4-H, 5-H), 6.06 (dd, *J* = 15.3, 8.0 Hz, 2-H), 1.91 (d, *J* = 5.8 Hz, 3H, 6-H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 194.2 (t, C-1), 152.9 (t, C-3), 142.1 (t, C-5), 130.2 (t, C-4), 130.0 (t, C-2), 19.1 (p, C-6).

R_f (*n*Hex/EtOAc 9:1) = 0.41.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[199].

Synthese mittels HWE-Funktionalisierung



Gemäß AAV 7 wurde (2*E*,4*E*)-Hexa-2,4-dienal (**113**, 48 mg, 500 μmol) mit dem Phosphonat **172** zum β-Ketothioester **146** umgesetzt. Dieser wurde nach Reinigung durch Säulenchromatographie an SiO₂ (DCM/MeCN/MeOH 88:10:2) als gelber Feststoff (100 mg, 355 μmol, 71%, ≤ 86% *all-E*) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **enol**: 12.31 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, 3-OH), 7.17 (dd, *J* = 15.0, 11.3 Hz, 1H, 5-H), 6.50 (dd, *J* = 14.8, 10.8 Hz, 1H, 7-H), 6.19 (m, 2H, 6-H, 8-H), 6.06 – 5.90 (m, 2H, 9-H, NH), 5.78 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, 4-H), 5.49 (s, 1H, 2-H), 3.49 (m, 2H, 2'-H), 3.10 (m, 2H, 1'-H), 1.97 (s, 3H, 4'-H), 1.83 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, 10-H); **keto**: 7.24 (dd, *J* = 15.2, 11.2 Hz, 1H, 5-H), 6.64 (dd, *J* = 14.8, 10.8 Hz, 1H, 7-H), 6.19 (m, 3H, 4-H, 6-H, 8-H), 6.06 – 5.90 (m, 2H, 9-H, NH), 3.85 (s, 2H, 2-H), 3.46 (m, 2H, 2'-H), 3.10 (m, 2H, 1'-H), 1.97 (s, 3H, 4'-H), 1.85 (d, *J* = 7.7 Hz, 3H, 10-H).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = **enol**: 194.2 (q, C-1), 170.5 (q, C-3'), 167.7 (q, C-3), 140.3 (t, C-7), 140.2 (t, C-5), 135.0 (t, C-9), 131.6 (t, C-8), 128.6 (t, C-6), 123.4 (t, C-4), 100.8 (t, C-2), 40.1 (s, C-2'), 28.1 (s, C-1'), 23.4 (p, C-4'), 18.8 (p, C-10); **keto**: 192.9 (q, C-1), 191.3

(q, C-3), 170.5 (q, C-3'), 145.9 (t, C-5), 144.1 (t, C-7), 137.3 (t, C-9), 131.4 (t, C-8), 127.7 (t, C-6), 127.2 (t, C-4), 55.6 (s, C-2), 39.4 (s, C-2'), 29.4 (t, C-1'), 23.3 (p, C-4'), 18.9 (p, C-10).

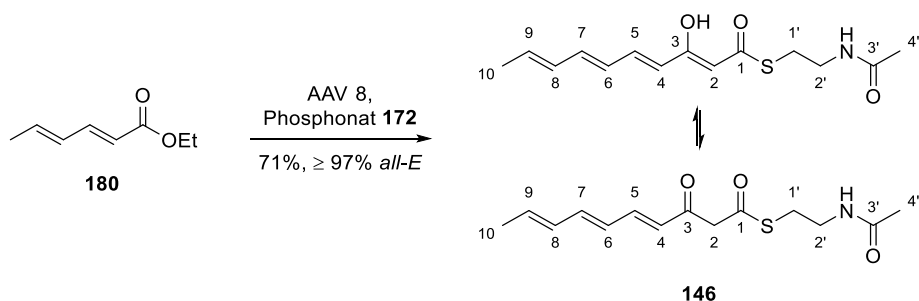
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 3293 (br. w), 3079 (w), 2936 (w), 1644 (s), 1611 (s), 1556 (s), 1435 (m), 1411 (m), 1373 (m), 1338 (m), 1293 (m), 1259 (m), 1209 (m), 1198 (m), 1187 (m), 1087 (s), 999 (s), 946 (m), 866 (m), 848 (m), 760 (m).

HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ für $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{S}$; ber. 304.0977, gef. 304.0978.

R_f (MeCN/DCM/MeOH 45:50:5) = 0.69.

λ_{max} (UPLC-DAD, MeOH/ H_2O ~9:1) = 335 nm.

Synthese mittels reduktiver HWE-Funktionalisierung

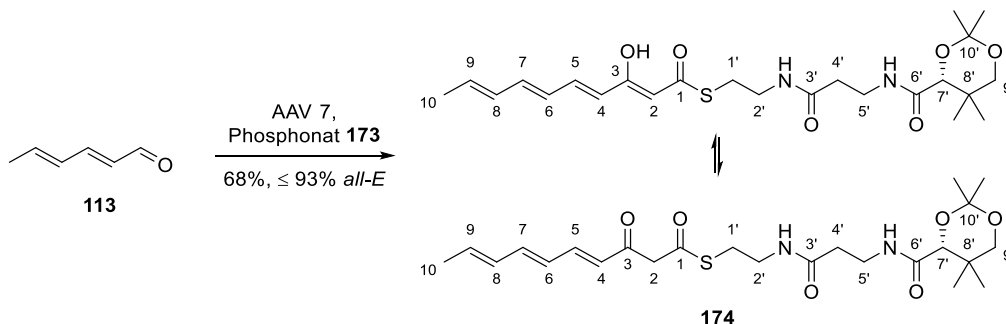


Gemäß AAV 8 wurde Ethylsorbat (**180**, 70.1 mg, 500 μmol) mit dem Phosphonat **172** zum β -Kethioester **146** umgesetzt. Dieser wurde nach Reinigung mittels Säulenchromatographie an SiO_2 (DCM/MeCN/MeOH 88:10:2) als gelber Feststoff (102 mg, 364 μmol , 72%, $\geq 97\%$ *all-E*) erhalten.

Analytische Daten entsprechend vorheriger Synthese.

(*all-E*)-S-(*O,O'*-Isopropyliden-D-pantetheinyl)-3-oxodeca-4,6,8-trienthiolat (174)

Synthese mittels HWE-Funktionalisierung



Gemäß AAV 7 wurde (*2E,4E*)-Hexa-2,4-dienal (**113**, 48 mg, 500 μmol) mit dem Phosphonat **173** zum Isopropyliden- β -ketothioester **174** umgesetzt. Dieser wurde nach Reinigung durch Säulenchromatographie an SiO_2 (DCM/MeCN/MeOH 88:10:2) als gelber Feststoff (165 mg, 343 μmol , 68%, $\leq 93\%$ *all-E*) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = **enol**: 12.28 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 3-OH), 7.16 (dd, $J = 15.0, 11.4$ Hz, 1H, 5-H), 7.03 (m, 1H, 5'-NH), 6.49 (dd, $J = 14.7, 10.7$ Hz, 1H, 7-H), 6.20 (m, 3H, 2'-NH, 6-H, 8-H), 5.93 (dq, $J = 14.9, 6.9$ Hz, 1H, 9-H), 5.77 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H, 4-H), 5.46 (s, 1H, 2-H), 4.07 (s, 1H, 7'-H), 3.67 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, 9'-H^{ax}), 3.61 – 3.41 (m, 4H, 2'-H, 5'-H), 3.27 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, 9'-H^{äq}), 3.09 (m, 2H, 1'-H), 2.43 (m, 2H, 4'-H), 1.83 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, 10-H), 1.46 (s, 3H, 10'-CH₃^{äq}), 1.41 (s, 3H, 10'-CH₃^{ax}), 1.03 (s, 3H, 8'-CH₃^{ax}), 0.96 (s, 3H, 8'-CH₃^{äq}); **keto**: 7.23 (dd, $J = 15.2, 11.2$ Hz, 1H, 5-H), 7.03 (m, 1H, 5'-NH), 6.64 (dd, $J = 15.0, 10.9$ Hz, 1H, 7-H), 6.20 (m, 4H, 2'-NH, 4-H, 6-H, 8-H), 6.02 (dq, $J = 14.7, 6.9$ Hz, 1H, 9-H), 4.07 (s, 1H, 7'-H), 3.83 (s, 2H, 2-H), 3.67 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, 9'-H^{ax}), 3.61 – 3.41 (m, 4H, 2'-H, 5'-H), 3.27 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H, 9'-H^{äq}), 3.08 (m, 2H, 1'-H), 2.43 (m, 2H, 4'-H), 1.85 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, 10-H), 1.46 (s, 3H, 10'-CH₃^{äq}), 1.41 (s, 3H, 10'-CH₃^{ax}), 1.03 (s, 3H, 8'-CH₃^{ax}), 0.96 (s, 3H, 8'-CH₃^{äq}).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = **enol**: 193.9 (q, C-1), 171.4 (q, C-3'), 170.2 (q, C-6'), 167.7 (q, C-3), 140.3 (t, C-7), 140.2 (t, C-5), 135.0 (t, C-9), 131.6 (t, C-8), 128.6 (t, C-6), 123.4 (t, C-4), 100.7 (t, C-2), 99.2 (q, C-10'), 77.3 (t, C-7'), 71.6 (s, C-9'), 40.0 (s, C-2'), 36.1 (s, C-4'), 34.9 (s, C-5'), 33.1 (s, C-8'), 29.6 (p, 10'-CH₃^{äq}), 28.1 (s, C-1'), 22.3 (p, 8'-CH₃^{ax}), 19.1 (p, 8'-CH₃^{äq}), 18.8 (p, 10'-CH₃^{ax}), 18.8 (p, C-10); **keto**: 192.7 (q, C-1), 191.3 (q, C-3), 171.5 (q,

C-3'), 170.2 (q, C-6'), 145.9 (t, C-5), 144.1 (t, C-7), 137.2 (t, C-9), 131.4 (t, C-8), 127.7 (t, C-6), 127.2 (t, C-4), 99.2 (q, C-10'), 77.3 (t, C-7'), 71.6 (s, C-9'), 55.6 (s, C-2), 39.3 (s, C-2'), 36.0 (s, C-4'), 34.8 (s, C-5'), 33.1 (q, C-8'), 29.6 (p, 10'-CH₃^{äq}), 29.3 (s, C-1'), 22.3 (p, 8'-CH₃^{ax}), 19.1 (p, 8'-CH₃^{äq}), 18.8 (p, 10'-CH₃^{ax}), 18.8 (p, C-10).

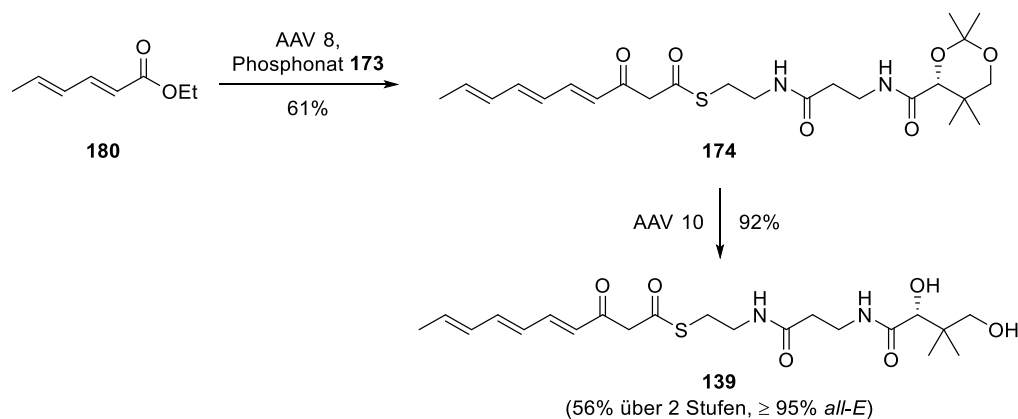
IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3298 (br. w), 2991 (w), 2937 (w), 2873 (w), 1652 (m), 1610 (m), 1551 (s), 1525 (s), 1410 (m), 1377 (m), 1330 (m), 1255 (m), 1195 (m), 1158 (m), 1084 (s), 1048 (m), 999 (s), 944 (m), 864 (s), 729 (s).

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ für C₂₄H₃₆N₂O₆S: ber. 481.2365, gef. 481.2369.

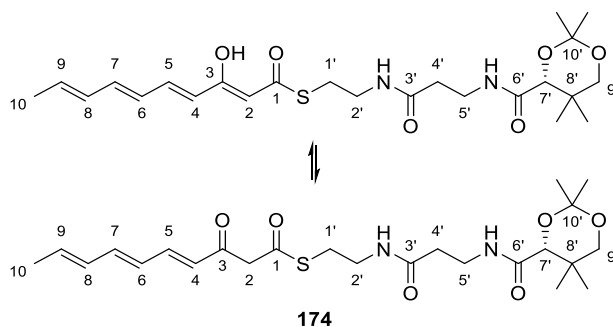
R_f (MeCN/DCM/MeOH 45:50:5) = 0.78.

(*all-E*)-*S*-*D*-Pantetheinyl-3-oxodeca-4,6,8-trienthoat (**139**)

Synthese mittels reduktiver HWE-Funktionalisierung



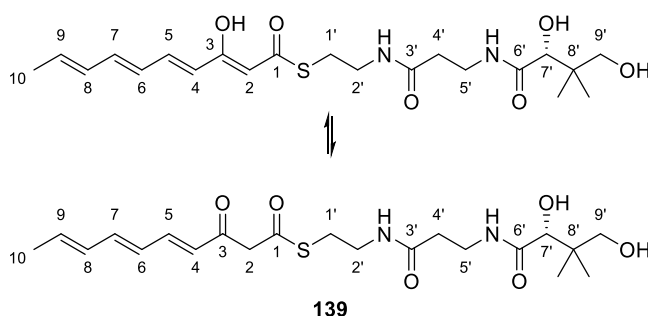
S-(*O,O'*-Isopropyliden-*D*-pantetheinyl)-(4*E*,6*E*,8*E*)-3-oxodeca-4,6,8-trienthioat (**174**)



Gemäß AAV 8 wurde Ethylsorbat (**180**, 56.1 mg, 400 μmol) mit dem Phosphonat **173** zum Isopropyliden- β -ketothioester **174** umgesetzt. Dieser wurde nach Reinigung durch Säulenchromatographie an SiO_2 (DCM/MeCN/MeOH 88:10:2) als gelber Feststoff (118 mg, 246 μmol , 61%, $\leq 96\%$ *all-E*) erhalten.

Analytische Daten entsprechend vorheriger Synthese.

S-*D*-Pantetheinyl-(4*E*,6*E*,8*E*)-3-oxodeca-4,6,8-trienthioat (**139**)



Gemäß AAV 10 wurde das Acetonid **174** (58.2 mg, 121 μmol) mit TfOH in TFE abs. entschützt. Das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an SiO_2 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 99:1 \rightarrow 90:10) gereinigt, wonach der β -Ketothioester **139** als gelber Feststoff (48.9 mg, 111 μmol , 92%, $\geq 95\%$ *all-E*) erhalten wurde.

Um eine ausreichende Löslichkeit zu erreichen, wurde für die NMR-Spektroskopie eine Mischung aus CDCl_3 und CD_3OD (9:1) verwendet. Als Referenz dienen die Signale der Restprotonen des CD_3OD .

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/CD₃OD 9:1): δ [ppm] = **enol**: 7.11 (dd, *J* = 15.0, 11.3 Hz, 1H, 5-H), 6.47 (dd, *J* = 14.8, 10.8 Hz, 1H, 7-H), 6.26 – 6.11 (m, 2H, 6-H, 8-H), 5.90 (dq, *J* = 13.9, 6.9 Hz, 1H, 9-H), 5.79 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, 4-H), 5.47 (s, 1H, 2-H), 3.51 – 3.33 (m, 6H, 2'-H, 5'-H, 9'-H), 3.05 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, 1'-H), 2.38 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, 4'-H), 1.79 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, 10-H), 0.91 (s, 3H, 8'-CH₃), 0.89 (s, 3H, 8'-CH₃); **keto**: 7.26 (dd, *J* = 15.3, 11.2 Hz, 1H, 5-H), 6.67 (dd, *J* = 14.8, 10.8 Hz, 1H, 7-H), 6.26 – 6.11 (m, 3H, 4-H, 6-H, 8-H), 6.03 (dq, *J* = 13.9, 7.1 Hz, 1H, 9-H), 3.89 (s, 2H, 2-H), 3.51 – 3.33 (m, 6H, 2'-H, 5'-H, 9'-H), 3.03 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, 1'-H), 2.37 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, 4'-H), 1.83 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, 10-H), 0.91 (s, 3H, 8'-CH₃), 0.89 (s, 3H, 8'-CH₃).

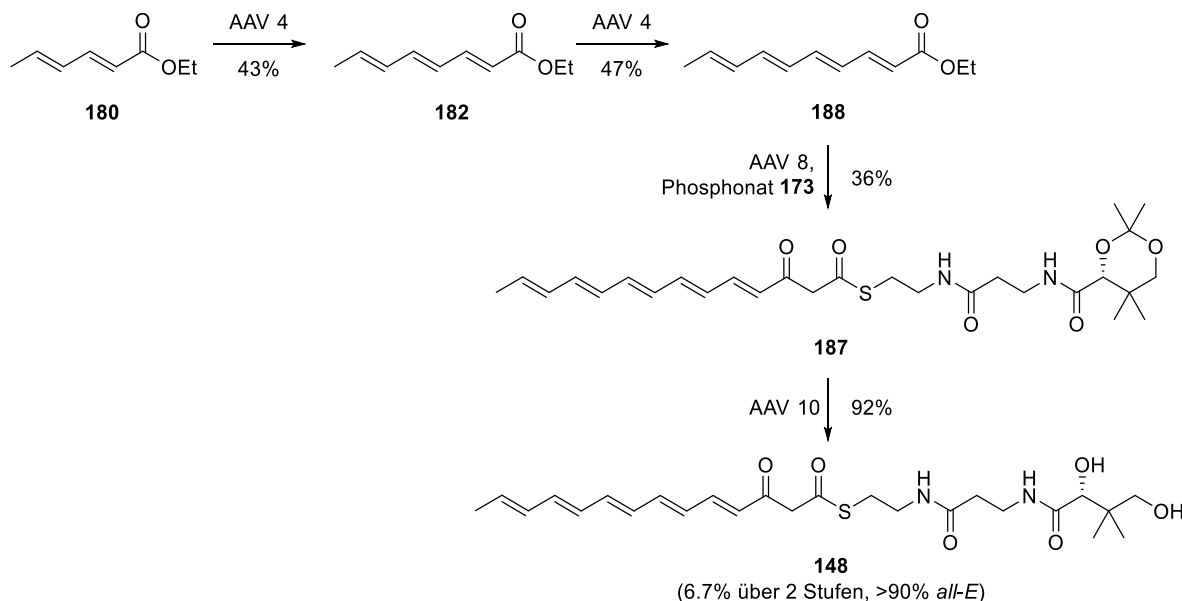
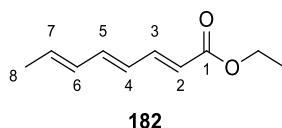
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃/CD₃OD 9:1): δ [ppm] = **enol**: 193.8 (q, C-1), 174.7 (q, C-6'), 172.4 (q, C-3'), 167.2 (q, C-3), 140.2 (t, C-7), 140.0 (t, C-5), 134.9 (t, C-9), 131.6 (t, C-8), 128.6 (t, C-6), 123.3 (t, C-4), 77.6 (t, C-7'), 70.6 (s, C-9'), 39.6 (q, C-8'), 39.2 (s, C-2'), 35.6 (s, C-4'), 35.4 (s, C-5'), 27.7 (s, C-1'), 20.9 (p, 8'-CH₃), 20.5 (p, 8'-CH₃), 18.6 (p, C-10); **keto**: 192.9 (q, C-3), 192.4 (q, C-1), 174.7 (q, C-6'), 172.5 (q, C-3'), 146.7 (t, C-5), 144.6 (t, C-7), 137.5 (t, C-9), 131.4 (t, C-8), 127.7 (t, C-6), 127.2 (t, C-4), 77.6 (t, C-7'), 70.6 (s, C-9'), 39.3 (q, C-8'), 38.9 (s, C-2'), 35.5 (s, C-4'), 35.3 (s, C-5'), 29.0 (s, C-1'), 21.0 (p, 8'-CH₃), 20.5 (p, 8'-CH₃), 18.7 (p, C-10).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3293 (br. m), 2961 (w), 2928 (w), 2877 (w), 1643 (s), 1618 (s), 1553 (s), 1436 (m), 1423 (m), 1409 (m), 1386 (m), 1341 (m), 1293 (m), 1257 (m), 1209 (m), 1188 (m), 1154 (w), 1087 (s), 1041 (m), 998 (s), 946 (m), 866 (m), 756 (w), 731 (m).

HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ für C₂₁H₃₂N₂O₆S: ber. 441.2054, gef. 441.2048.

R_f (DCM/MeOH 9:1) = 0.55.

UV/vis (UPLC-DAD, MeOH/H₂O ~9:1): λ_{\max} = 335 nm.

(all-E)-S-(d-Pantetheinyl)- 3-oxotetradeca-4,6,8,10,12-tetraenoat (148)

Ethyl-(2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienoat (182)


Gemäß AAV 4 wurde frisch destilliertes (Kugelrohr, 175 °C, 7 mbar) Ethylsorbat (**180**, 1.49 mL, 10.0 mmol) in einer reduktiven HWE-Homologisierung zu Ethyl-(2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienoat (**182**) umgesetzt, welches nach Säulenchromatographie an SiO₂ (Pentan/Et₂O 49:1 → 9:1) als farbloses Öl (718 mg, 4.32 mmol, 43%, ≥ 97% all-E) erhalten wurde.

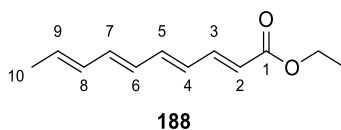
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.29 (dd, *J* = 15.3, 11.3 Hz, 1H, 3-H), 6.52 (dd, *J* = 14.9, 10.9 Hz, 1H, 5-H), 6.17 (m, 2H, 4-H, 6-H), 5.93 (dq, *J* = 14.8, 6.9 Hz, 1H, 7-H), 5.83 (d, *J* = 15.3 Hz, 1 H, 2-H), 4.19 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 1.82 (dd, *J* = 6.9, 1.1 Hz, 3H, 8-H), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 167.4 (q, C-1), 145.0 (t, C-3), 141.2 (t, C-5), 135.2 (t, C-7), 131.4 (t, C-6), 127.7 (t, C-4), 120.2 (t, C-2), 60.3 (s, OCH₂CH₃), 18.7 (p, C-8), 14.5 (p, OCH₂CH₃).

R_f (nHex/EtOAc 9:1) = 0.54.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[200].

Ethyl-(2E,4E,6E,8E)-deca-2,4,6,8-tetraenoat (**188**)



Gemäß AAV 4 wurde Ethyl-(2E,4E,6E)-octa-2,4,6-trienoat (**182**, 677 mg, 4.07 mmol) in einer reduktiven HWE-Homologisierung zu Ethyl-(2E,4E,6E,8E)-deca-2,4,6,8-tetraenoat (**188**) umgesetzt, welches nach Säulenchromatographie an SiO₂ (Pentan/Et₂O 1:0 → 19:1) als gelbliches Öl (368 mg, 1.91 mmol, 47%, ≥ 97% *all-E*) erhalten wurde.

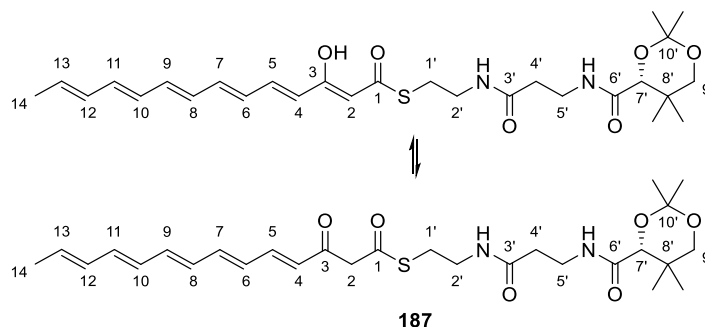
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.31 (dd, *J* = 15.2, 11.4 Hz, 1H, 3-H), 6.56 (dd, *J* = 14.7, 11.0 Hz, 1H, 5-H), 6.37 (dd, *J* = 14.8, 10.8 Hz, 1H, 7-H), 6.28 (dd, *J* = 14.7, 11.4 Hz, 1H, 4-H), 6.18 (dd, *J* = 14.8, 11.0 Hz, 6-H), 6.14 (ddq, *J* = 14.8, 10.8, 1.2 Hz, 1H, 8-H), 5.86 (dq, *J* = 14.8, 6.9 Hz, 1H, 9-H), 5.84 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, 2-H), 4.20 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 1.81 (dd, *J* = 6.9, 1.2 Hz, 1H, 10-H), 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 167.4 (q, C-1), 144.7 (t, C-3), 141.2 (t, C-5), 137.6 (t, C-7), 133.3 (t, C-9), 131.7 (t, C-8), 129.5 (t, C-6), 129.3 (t, C-4), 120.2 (t, C-2), 60.4 (s, OCH₂CH₃), 18.7 (p, C-10), 14.5 (p, OCH₂CH₃).

R_f (*n*Hex/EtOAc 9:1) = 0.42.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[135].

S-(*O,O'*-Isopropyliden-D-pantetheinyl)-(4*E*,6*E*,8*E*,10*E*,12*E*)-3-oxotetradeca-4,6,8,10,12-tetraethioat (**187**)



Gemäß AAV 8 wurde Ethyl-(2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deca-2,4,6,8-tetraenoat (**188**, 96.1 mg, 500 μ mol) in einer reduktiven HWE-Funktionalisierung mit dem Phosphonat **173** zum Isopropyliden- β -ketothioester **187** umgesetzt. Nach der Reinigung mittels Säulenchromatographie an SiO₂ (DCM/MeCN/MeOH 88:10:2 \rightarrow 75:20:5) wurde er als kräftig oranger, amorpher Feststoff (95.4 mg, 179 μ mol, 36%, \geq 97% *all-E*) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = *enol*: 12.27 (d, J = 1.3 Hz, 1H, 3-OH), 7.19 (dd, J = 15.0, 11.6 Hz, 1H, 5-H), 7.02 (m, 1H, 5'-NH), 6.56 (dd, J = 14.6, 11.1 Hz, 1H, 7-H), 6.41 (dd, J = 14.7, 10.9 Hz, 1H, 9-H), 6.36 – 6.10 (m, 6H, 6-H, 8-H, 10-H, 11-H, 12-H, 2'-NH), 5.82 (m, 2H, 4-H, 13-H), 5.47 (s, 1H, 2-H), 4.07 (s, 1H, 7'-H), 3.68 (d, J = 11.8 Hz, 1H, 9'-H^{ax}), 3.61 – 3.41 (m, 2H, 2'-H, 5'-H), 3.27 (d, J = 11.8 Hz, 1H, 9'-H^{äq}), 3.08 (m, 2H, 1'-H), 2.42 (m, 2H, 4'-H), 1.81 (m, 3H, 14-H), 1.46 (s, 3H, 10'-CH₃^{äq}), 1.41 (s, 3H 10'-CH₃^{ax}), 1.03 (s, 3H, 8'-CH₃^{ax}), 0.97 (s, 3H, 8'-CH₃^{äq}); *keto*: 7.26 (dd, J = 14.9, 11.9 Hz, 1H, 5-H), 7.02 (m, 1H, 5'-NH), 6.71 (dd, J = 14.6, 11.2 Hz, 1H, 7-H), 6.48 (dd, J = 14.7, 11.1 Hz, 1H, 9-H), 6.36 – 6.10 (m, 7H, 4-H, 6-H, 8-H, 10-H, 11-H, 12-H, 2'-NH), 5.82 (m, 1H, 13-H), 4.07 (s, 1H, 7'-H), 3.84 (s, 2H, 2-H), 3.68 (d, J = 11.8 Hz, 1H, 9'-H^{ax}), 3.61 – 3.41 (m, 2H, 2'-H, 5'-H), 3.27 (d, J = 11.8 Hz, 1H, 9'-H^{äq}), 3.08 (m, 2H, 1'-H), 2.42 (m, 2H, 4'-H), 1.81 (m, 3H, 14-H), 1.46 (s, 3H, 10'-CH₃^{äq}), 1.41 (s, 3H 10'-CH₃^{ax}), 1.03 (s, 3H, 8'-CH₃^{ax}), 0.97 (s, 3H, 8'-CH₃^{äq}).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = *enol*: 193.8 (q, C-1), 171.4 (q, C-3'), 170.2 (q, C-6'), 167.6 (q, C-3), 140.2 (t, C-7), 139.9 (t, C-5), 137.5 (t, C-9), 136.0 (t, C-11), 132.3 (t, C-13), 132.0, 131.5, 130.5, 130.2 (4 \times t, C-6, C-8, C-10, C-12), 123.7 (t, C-4), 100.9 (t, C-2), 99.2 (q, C-10'), 77.3 (t, C-7'), 71.6 (s, C-9'), 40.0 (s, C-2'), 36.1 (s, C-4'), 34.9 (s, C-5'), 33.1 (q, C-8'), 29.6 (p, 10'-CH₃^{äq}), 28.1 (s, C-1'), 22.3 (p, 8'-CH₃^{ax}), 19.1 (p, 8'-CH₃^{äq}), 18.8 (p, 10'-CH₃^{ax}),

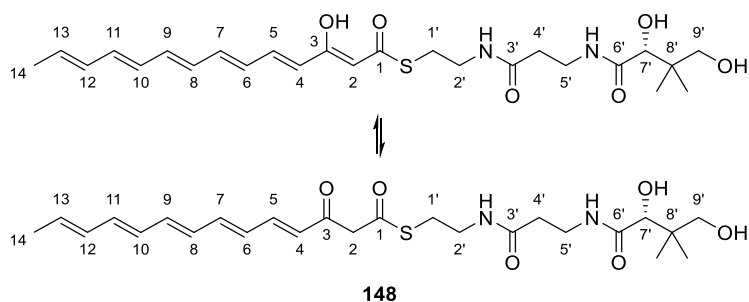
18.7 (p, C-14); **keto**: 192.7 (q, C-1), 191.2 (q, C-3), 171.5 (q, C-3'), 170.2 (q, C-6'), 145.6 (t, C-5), 144.0 (t, C-7), 139.3 (t, C-9), 137.2 (t, C-11), 133.2 (t, C-13), 131.9, 131.0, 130.0, 129.4 (4 × t, C-6, C-8, C-10, C-12), 127.1 (t, C-4), 99.2 (q, C-10'), 77.3 (t, C-7'), 71.6 (s, C-9'), 55.7 (s, C-2), 39.3 (s, C-2'), 36.0 (s, C-4'), 34.8 (s, C-5'), 33.1 (q, C-8'), 29.6 (p, 10'-CH₃^{äq}), 29.3 (s, C-1'), 22.3 (p, 8'-CH₃^{ax}), 19.1 (p, 8'-CH₃^{äq}), 18.8 (p, 10'-CH₃^{ax}), 18.7 (p, C-14).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3290 (br. w), 3080 (w), 3012 (w), 2992 (w), 2941 (w), 2910 (w), 2873 (w), 1661 (m), 1640 (m), 1623 (m), 1563 (m), 1537 (m), 1532 (m), 1437 (w), 1391 (w), 1360 (w), 1331 (w), 1290 (w), 1255 (w), 1222 (w), 1197 (m), 1179 (w), 1160 (w), 1090 (s), 1049 (w), 1005 (s), 965 (w), 947 (w), 932 (w), 868 (m), 828 (w), 762 (w), 734 (w), 684 (w), 675 (w).

HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ für C₂₈H₄₀N₂O₆S: ber. 533.2680, gef. 533.2676.

R_f (DCM/MeCN/MeOH 78:20:2) = 0.33.

S-(D-Pantetheinyl)-(4E,6E,8E,10E,12E)-3-oxotetradeca-4,6,8,10,12-tetraenthioat (**148**)



Gemäß AAV 10 wurde das Acetonid **187** (10.1 mg, 19.0 μ mol) mit TfOH in TFE abs. geschützt. Das rohe Produkt wurde durch Säulenchromatographie an SiO₂ gereinigt, wonach der β -Ketothioester **148** als kräftig oranger, amorpher Feststoff (8.6 mg, 17.5 μ mol, 92%, > 90% *all-E*) erhalten wurde.

Um eine ausreichende Löslichkeit zu erreichen, wurde für die NMR-Spektroskopie eine Mischung aus CDCl₃ und CD₃OD (9:1) verwendet. Als Referenz dienen die Signale der Restprotonen des CD₃OD.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/CD₃OD 9:1): δ [ppm] = **enol**: 7.14 (dd, J = 15.0, 11.3 Hz, 1H, 5-H), 6.54 (dd, J = 14.5, 11.2 Hz, 1H, 7-H), 6.38 (dd, J = 14.6, 10.8 Hz, 1H, 9-H), 6.35 – 6.07 (m, 5H, 6-H, 8-H, 10-H, 11-H, 12-H), 5.80 (m, 2H, 4-H, 13-H), 3.88 (s, 1H, 7'-H), 3.49 – 3.33 (m, 3H, 2'-H, 5'-H, 9'-H), 3.03 (m, 2H, 1'-H), 2.36 (m, 2H, 4'-H), 1.77 (m, 3H, 14-H), 0.91 (s,

3H, 8'-CH₃), 0.87 (s, 3H, 8'-CH₃); **keto**: 7.27 (dd, $J = 15.0, 11.3$ Hz, 1H, 5-H), 6.73 (dd, $J = 14.5, 11.3$ Hz, 1H, 7-H), 6.47 (dd, $J = 14.7, 11.0$ Hz, 1H, 9-H), 6.35 – 6.07 (m, 6H, 4-H, 6-H, 8-H, 10-H, 11-H, 12-H), 5.80 (m, 1H, H-13), 5.31 (s, 2H, 2-H), 3.49 – 3.33 (m, 3H, 2'-H, 5'-H, 9'-H), 3.03 (m, 2H, 1'-H), 2.36 (m, 2H, 4'-H), 1.77 (m, 3H, 14-H), 0.91 (s, 3H, 8'-CH₃), 0.87 (s, 3H, 8'-CH₃).

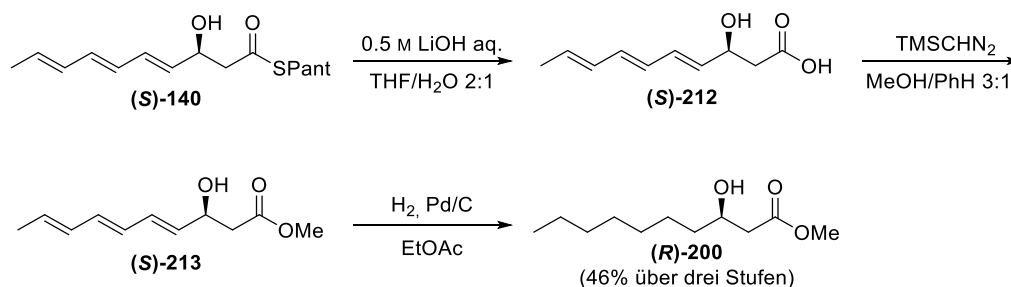
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃/CD₃OD 9:1): δ [ppm] = **enol**: 193.9 (q, C-1), 174.9 (q, C-6'), 172.7 (q, C-3'), 167.2 (q, C-3), 140.3 (t, C-7), 139.8 (t, C-5), 137.6 (t, C-9), 136.1 (t, C-11), 132.3 (t, C-13), 132.2 (t, C-12), 131.7, 130.4 (2 × t, C-8, C-10), 130.7 (t, C-6), 123.8 (t, C-4), 77.2 (t, C-7'), 70.6 (s, C-9'), 39.7 (q, C-8'), 39.4 (s, C-2'), 35.7 (s, C-4'), 35.6 (s, C-5'), 27.9 (s, C-1'), 20.9 (p, 8'-CH₃), 20.6 (p, 8'-CH₃), 18.6 (p, C-14); **keto**: 193.1 (q, C-3), 192.5 (q, C-1), 174.9 (q, C-6'), 172.8 (q, C-3'), 146.6 (t, C-5), 144.7 (t, C-7), 139.9 (t, C-9), 137.5 (t, C-11), 133.3 (t, C-13), 132.1 (t, C-12), 131.2, 130.2 (2 × t, C-8, C-10), 129.6 (t, C-6), 127.3 (t, C-4), 70.6 (s, C-9'), 53.8 (s, C-2), 39.1 (s, C-2'), 35.6 (s, C-4'), 35.5 (s, C-5'), 29.2 (s, C-1'), 21.0 (p, 8'-CH₃), 20.6 (p, 8'-CH₃), 18.6 (p, C-14).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] = 3322 (br. m), 2956 (m), 2920 (s), 2853 (m), 1724 (s), 1649 (s), 1580 (m), 1566 (d), 1538 (s), 1439 (m), 1410 (m), 1368 (m), 1260 (s), 1088 (s), 1042 (m), 1004 (s), 868 (m), 728 (m).

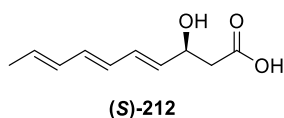
HRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺ für C₂₅H₃₆N₂O₆S: ber. 515.2186, gef. 515.2183.

R_f (MeCN/DCM/MeOH 50:45:5) = 0.57.

6.3.3 DERIVATISIERUNG DES MYCKR_B/NADPH-REDUKTIONSPRODUKTS

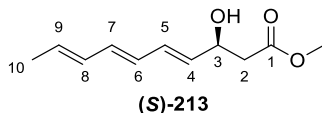


(S,4E,6E,8E)-Hydroxydeca-4,6,8-triensäure ((S)-212)



Das rohe Enzymreaktionsprodukt **(S)-140** (11.0 mg, $\leq 24.9 \mu\text{mol}$) in THF/H₂O 2:1 (1.2 mL) wurde mit 0.5 M LiOH aq. (248 μL , 124 μmol) versetzt und die Mischung für 90 min bei RT gerührt. Die klare Lösung wurde mit H₂O (5 mL, mit 1 M NaOH leicht basifiziert) verdünnt und mit CHCl₃ (3 \times 7 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H₂O (2 \times 3 mL) reextrahiert. Die vereinigten wässrigen Extrakte wurden mit 4 M HCl (1 mL) angesäuert und zügig mit CHCl₃ (3 \times 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaH₂PO₄ aq. (3 mL) und ges. NaCl aq. (3 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer wurde die rohe β -Hydroxycarbonsäure **(S)-212** neben dem verseiften Nebenprodukt **(S)-199** als leicht gelber, harziger Rückstand (4.0 mg) erhalten.

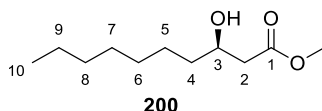
Methyl-(S,4E,6E,8E)-hydroxydeca-4,6,8-trienoat ((S)-213)



Die rohe Carbonsäure **(S)-212** (4.0 mg) in MeOH/PhH 3:1 (220 μL) wurde bei RT mit TMSCHN₂ (2 M in Hexan, 66 μL , 132 μmol) versetzt und die Reaktionslösung für 2 h gerührt. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels und überschüssigen TMSCHN₂ am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck und Säulenchromatographie an SiO₂ (Pentan/Et₂O 5:1)

wurde der Methylester (**S**)-**213** neben dem Methylester des hydrolysierten Nebenprodukts als farbloser, öliges Rückstand (3.6 mg) erhalten.

Methyl-(*R*,3)-hydroxydecanoat ((**R**)-**200**)



Pd/C (10% Pd, 3.8 mg, 3.7 μmol) wurde zum Methylester (**S**)-**213** (3.6 mg) in EtOAc (1.8 mL) gegeben. Ein Wasserstoffballon wurde angebracht und die Mischung für 90 min bei RT kräftig gerührt. Der Katalysator wurde mittels Filtration über Celite® entfernt und das Filterbett mit CHCl_3 (5 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt, wonach Methyl-(*R*,3)-hydroxydecanoat (**R**)-**200** als farbloses Öl (2.3 mg, 11.4 μmol , 46% über 3 Stufen, 99.3% *ee*) erhalten wurde.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ [ppm] = 4.00 (m, 1H, 3-H), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 2.52 (dd, $J = 16.4, 3.0$ Hz, 1H, 2- $\text{H}^{\text{pro-S}}$), 2.41 (dd, $J = 16.4, 9.1$ Hz, 1H, 2- $\text{H}^{\text{pro-R}}$), 1.55 – 1.28 (m, 12H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H, 9-H), 0.88 (m, 3H, 10-H).

$[\alpha]_{\text{D}}^{21.4} = -12.54 \pm 0.52$ ($c = 0.133$, CHCl_3); Lit.^[179]: $[\alpha]_{\text{D}}$ ((**R**)-**200**) = -11.51 ± 0.54 ($c = 0.82$, CHCl_3).

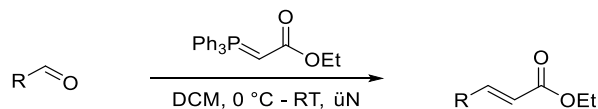
GC (60 °C \rightarrow 200 °C, 5 °C/min): (**S**)-**200**: $t_{\text{R}} = 23.81$ min, 0.35%; (**R**)-**200**: $t_{\text{R}} = 23.93$ min, 99.65%.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[179].

Die (*R*)-Konfiguration wurde unabhängig des obigen Ergebnisses von Theresa Ross nach Veresterung mit dem chiralen Derivatisierungsreagenz (*R*)-9-AMA mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie bestätigt, wobei die Integration einen Enantiomerenüberschuss $> 95\%$ aufzeigte.^[177]

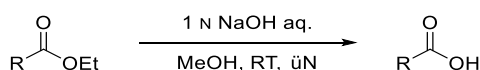
6.3.4 SYNTHESEVORSCHRIFTEN CARBONSÄURESUBSTRATE

Wittig-Reaktion zu α,β -ungesättigten Estern (AAV 11)



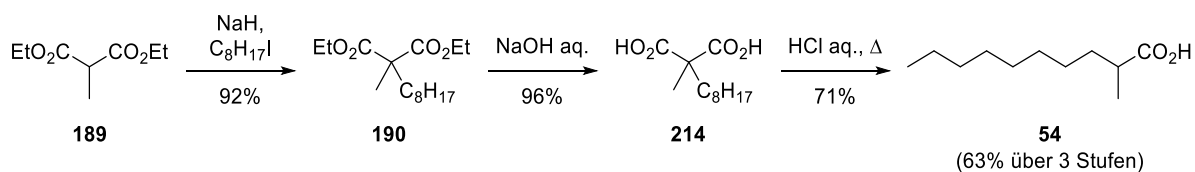
Zu Ethyl-2-(triphenyl- λ^5 -phosphanyliden)acetat (**121**, 1 M) in DCM wurde bei 0°C der entsprechende Aldehyd gegeben. Die Mischung wurde 5 min bei 0°C und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Die Ester wurden durch Säulenchromatographie der Reaktionsmischung an SiO_2 (DCM) gereinigt, wobei in manchen Fällen eine zweite chromatographische Reinigung nötig war.

Verseifung der Carbonsäureester (AAV 12)

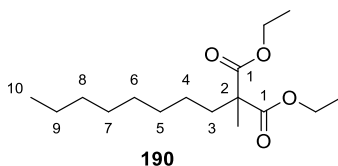


Zu dem entsprechenden Ester in MeOH (0.25 M) wurde 1 N NaOH aq. gegeben und die Mischung anschließend mit MeOH verdünnt, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Es wurde bei RT über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Feststoff in 1 N NaOH aq. aufgenommen. Die Lösung wurde dreimal mit Et_2O gewaschen, mit konz. HCl angesäuert und dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten EtOAc-Extrakte wurden mit ges. NaCl aq. gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Die Reinigung der Carbonsäuren erfolgte durch Säulenchromatographie an SiO_2 .

2-Methyldecansäure (**54**)



Diethyl-2-methyl-2-octylmalonat (**190**)



NaH (204 mg, 8.50 mmol, 1.50 mmol) wurde in DMF (25 mL) suspendiert und bei 0 °C mit Diethylmethylmalonat (**189**, 966 µL, 5.67 mmol, 1.00 Äquiv.) versetzt. Die Suspension wurde bei 0 °C für 30 min gerührt, ehe 1-Iodoctan (1.50 mL, 8.30 mmol, 1.46 Äquiv.) zugegeben wurde. Die Mischung wurde auf RT erwärmt und für zwei Stunden gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. NH₄Cl aq. (50 mL) beendet und das Gemisch mit Et₂O (3 × 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H₂O (10 mL) und ges. NaCl aq. (10 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Säulenchromatographie an SiO₂ (*n*Hex/EtOAc 19:1) wurde Diethyl-2-methyl-2-octylmalonat (**190**), als farbloses Öl (1.50 g, 5.22 mmol, 92%) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.16 (qd, *J* = 7.2, 0.6 Hz, 4H, 2 × OCH₂CH₃), 1.82 (m, 2H, 3-H), 1.37 (s, 3H, 2-CH₃), 1.22 (m, 18H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H, 9-H, 2 × OCH₂CH₃), 0.86 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, 10-H).

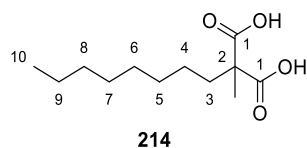
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.7 (2 × q, 2 × C-1), 61.2 (2 × s, 2 × OCH₂CH₃), 53.8 (q, C-2), 35.6 (s, C-3), 32.0, 30.0, 29.4, 29.3, 24.3, 22.8 (6 × s, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9), 19.9 (p, 2-CH₃), 14.2 (2 × p, 2 × OCH₂CH₃).

HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ für C₁₆H₃₀O₄: ber. 287.2217, gef. 287.2227.

R_f (*n*Hex/EtOAc 9:1) = 0.49.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[201].

2-Methyl-2-octylmalonsäure (214)



Diethyl-2-methyl-2-octylmalonat (**190**, 1.01 g, 3.53 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde mit 5.5 N NaOH (20 mL, 110 mmol, 31.2 Äquiv.) vermischt. Die Emulsion wurde bei 100 °C für 33 h kräftig gerührt. Die klare Lösung wurde mit H₂O (60 mL) verdünnt und mit Et₂O (2 × 20 mL) gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit konz. HCl (20 mL) angesäuert und mit EtOAc (3 × 50 mL) extrahiert. Die vereinigten EtOAc-Extrakte wurden mit ges. NaCl aq. (7.5 mL) gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer wurde 2-Methyl-2-octylmalonsäure (**214**) als farbloses Öl (783 mg, 3.40 mmol, 96%) erhalten, welches ohne weitere Reinigung weiter umgesetzt wurde.

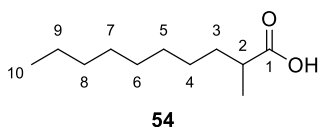
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.02 (br. s, 2H, 2 × COOH), 1.89 (m, 2H, 3-H), 1.48 (s, 3H, 2-CH₃), 1.28 (m, 12H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H, 9-H), 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, 10-H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 178.8 (2 × q, 2 × C-1), 54.1 (q, C-2), 35.7 (C-3), 32.0, 30.0, 29.4, 29.4, 24.4, 22.8 (6 × s, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9), 19.9 (p, 2-CH₃), 14.2 (p, C-10).

HRMS (ESI) *m/z* [M-H]⁻ für C₁₂H₂₂O₄: ber. 229.1434, gef. 229.1437.

R_f (*n*Hex/EtOAc 2:1) = 0.42 (tailing).

2-Methyldecansäure (54)



2-Methyl-2-octylmalonsäure (**214**, 468 mg, 2.03 mmol) wurde im Kugelrohr für 3 h bei 225 °C erhitzt bis die CO₂-Entwicklung nachließ. Der Druck wurde gesenkt (≤ 300 mbar) und die decarboxylierte Säure abdestilliert. 2-Methyldecansäure (**54**) wurde so als gelbliches Öl (270 mg, 1.45 mmol, 71%) erhalten.

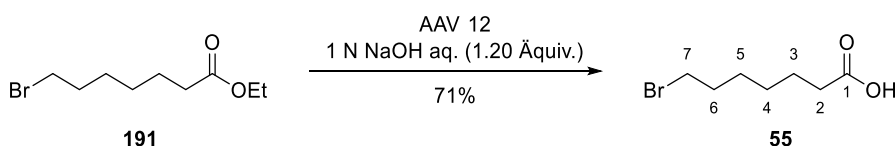
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.14 (br. s, 1H, COOH), 2.45 (sext, *J* = 7.0 Hz, 1H, 2-H), 1.68 (m, 1H, 3-HH), 1.42 (m, 1H, 3-HH), 1.28 (m, 12H, 4-H, 5-H, 6-H, 7-H, 8-H, 9-H), 1.17 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, 2-CH₃), 0.87 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, 10-H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 184.0 (q, C-1), 39.6 (C-2), 33.7 (C-3), 32.0, 29.7, 29.6, 29.4, 27.3, 22.8 (6 × s, C-4, C-5, C-6, C-7, C-8, C-9), 16.9 (p, 2-CH₃), 14.2 (p, C-10).

HRMS (ESI) *m/z* [M-H]⁻ für C₁₁H₂₂O₂: ber. 185.1536, gef. 185.1537.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[201].

7-Bromheptansäure (**55**)



Ethyl-7-bromheptanoat (**191**, 292 µL, 1.50 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde gemäß AAV 12 mit 1 N NaOH (1.80 mL, 1.20 Äquiv.) verseift. Nach der Aufarbeitung und Säulenchromatographie an SiO₂ (*n*Hex/EtOAc 4:1) wurde 7-Bromheptansäure (**55**) als leicht gelbes Öl (222 mg, 1.06 mmol, 71%) erhalten.

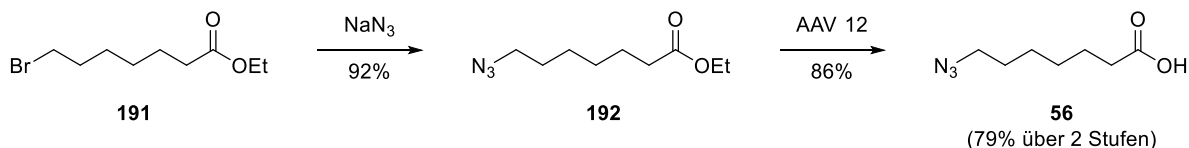
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 11.48 (br. s, 1H, COOH), 3.40 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, 7-H), 2.36 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, 2-H), 1.86 (quin., *J* = 6.7 Hz, 2H, 6-H), 1.65 (quin., *J* = 7.4 Hz, 2H, 3-H), 1.46 (m, 2H, 4-H), 1.37 (m, 2H, 5-H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 180.3 (q, C-1), 34.0 (s, C-2), 33.9 (s, C-7), 32.6 (s, C-6), 28.3 (s, C-4), 27.9 (s, C-6), 24.5 (s, C-3).

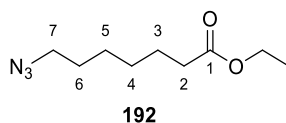
R_f (*n*Hex/EtOAc 2:1) = 0.23 (tailing).

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[202].

7-Azidheptansäure (**56**)



Ethyl-7-azidheptanoat (**192**)



Eine Mischung aus Ethyl-7-bromheptanoat (**191**, 1.00 mL, 5.13 mL, 1.00 Äquiv.) und NaN_3 (400 mg, 6.16 mmol, 1.20 Äquiv.) in DMF (13 mL) wurde für 26 h bei 80 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit H_2O (25 mL) verdünnt und mit Et_2O (3 × 20 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit H_2O (10 mL) und ges. NaCl (10 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck entfernt. Ethyl-7-azidheptanoat (**192**) wurde als farbloses Öl (940 mg, 4.72 mmol, 92%) erhalten und ohne weitere Reinigung verwendet.

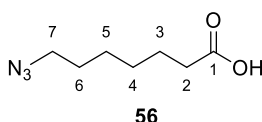
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 4.08 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3.22 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, 7-H), 2.26 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, 2-H), 1.58 (m, 4H, 3-H, 6-H), 1.33 (m, 4H, 4-H, 5-H), 1.21 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, OCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 173.7 (q, C-1), 60.2 (s, OCH_2CH_3), 51.4 (s, C-7), 34.2 (C-2), 28.7, 28.6 (2 × s, C-3, C-6), 26.4, 24.8 (2 × s, C-4, C-5), 14.3 (p, OCH_2CH_3).

HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ für $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$: ber. 222.1213, gef. 222.1209.

R_f ($n\text{Hex}/\text{EtOAc}$ 9:1) = 0.30.

7-Azidheptansäure (**56**)



Ethyl-7-azidheptanoat (**192**, 299 mg, 1.50 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde gemäß AAV 12 mit 1 N NaOH (3.00 mL, 2.00 Äquiv.) verseift. Nach Aufarbeitung wurde 7-Azidheptansäure (**56**) als gelbliches Öl (221 mg, 1.29 mmol, 86%) erhalten.

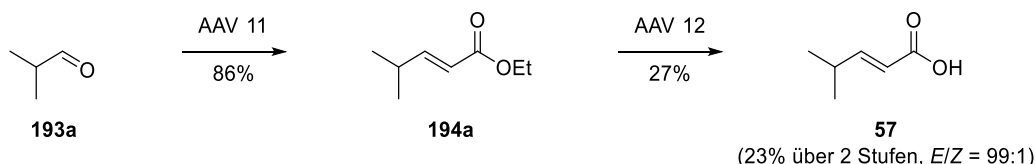
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 11.44 (br. s, 1H, COOH), 3.24 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, 7-H), 2.34 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, 2-H), 1.61 (m, 4H, 3-H, 6-H), 1.37 (m, 4H, 4-H, 5-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 180.4 (q, C-1), 51.4 (s, C-7), 34.0 (C-2), 28.7, 28.6 (2 × s, C-3, C-6), 26.4, 24.5 (2 × s, C-4, C-5).

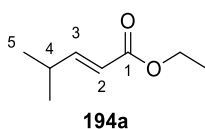
HRMS (ESI) m/z $[M-H]^-$ für $C_7H_{13}N_3O_2$: ber. 170.0924, gef. 170.0923.

R_f (n Hex/EtOAc 2:1) = 0.19 (tailing).

(E)-4-Methylpent-2-ensäure (57)



Ethyl-(E)-4-methylpent-2-enoat (**194a**)



Methylpropanal (**193a**, 1.74 mL, 19.1 mmol, 1.14 Äquiv.) wurde gemäß AAV 11 mit dem Phosphorylid **121** (5.84 g, 16.8 mmol, 1.00 Äquiv.) umgesetzt. Ethyl-(E)-4-methylpent-2-enoat (**194a**) wurde als gelbliches Öl (2.06 g, 14.5 mmol, 86%, $E/Z = 97:3$) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.92 (dd, $J = 15.7, 6.8$ Hz, 1H, 3-H), 5.74 (dd, $J = 15.7, 1.5$ Hz, 1H, 2-H), 4.16 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 2.43 (oct.d, $J = 6.8, 1.5$ Hz, 1H, 4-H), 1.26 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, OCH_2CH_3), 1.04 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H, 5-H, 4- CH_3).

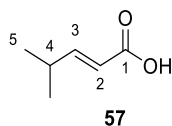
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 167.1 (q, C-1), 155.4 (t, C-3), 118.7 (t, C-2), 60.2 (s, OCH_2CH_3), 31.0 (t, C-4), 21.3 ($2 \times$ p, C-5, 4- CH_3), 14.3 (p, OCH_2CH_3).

HRMS (ESI) m/z $[M+H]^+$ für $C_8H_{14}O_2$: ber. 143.1067, gef. 143.1063.

R_f (n Hex/EtOAc 9:1) = 0.54.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[203].

(E)-4-Methylpent-2-ensäure (**57**)



Ethyl-(E)-4-methylpent-2-enoat (**194a**, 197 mg, 1.38 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde gemäß AAV 12 mit 1 N NaOH (1.66 mL, 1.20 Äquiv.) verseift. (E)-4-Methylpent-2-ensäure (**57**) wurde nach

Säulenchromatographie an SiO₂ (*n*Hex/EtOAc 3:1) als gelbes Öl, welches beim Stehen spontan kristallisierte, (41.9 mg, 367 μmol, 27%, *E/Z* = 99:1) erhalten.

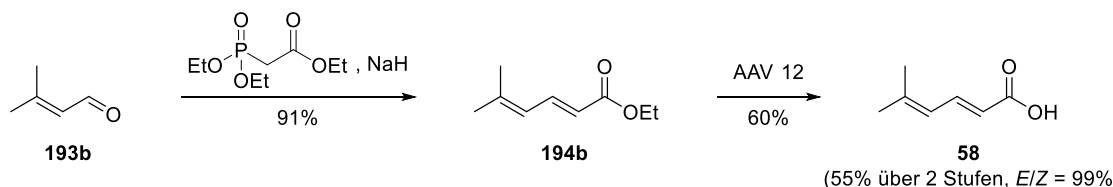
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 11.10 (br. s, 1H, COOH), 7.06 (dd, *J* = 15.7, 6.7 Hz, 1H, 3-H), 5.78 (dd, *J* = 15.7, 1.3 Hz, 1H, 2-H), 2.49 (oct.d, *J* = 6.7, 1.3 Hz, 1H, 4-H), 1.08 (d, 6H, 5-H, 4-CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.1 (q, C-1), 158.5 (t, C-3), 118.0 (t, C-2), 31.2 (t, C-4), 21.2 (2 × p, C-5, 4-CH₃).

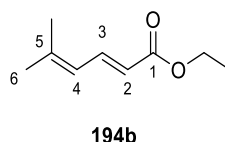
*R*_f (*n*Hex/EtOAc 1:1) = 0.41 (tailing).

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[204].

(*E*)-5-Methylhexa-2,4-diensäure (**58**)



Ethyl-(*E*)-5-methylhexa-2,4-dienoat (**194b**)



Gemäß Lit.^[183] wurde NaH (847 mg, 35.3 mmol, 1.10 Äquiv.) in THF abs. (100 mL) auf 0 °C gekühlt und tropfenweise mit Triethylphosphonoacetat (7.01 mL, 35.3 mmol, 1.10 Äquiv.) versetzt. Die Mischung wurde 20 min bei 0 °C gerührt, bis die H₂-Entwicklung nachließ. Anschließend wurde (*E*)-Methylcrotonal (**193b**, 3.00 mL, 32.1 mmol, 1.00 Äquiv.) langsam zugegeben. Es wurde auf RT erwärmt und 18 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. NH₄Cl aq. (10 mL) beendet. Die wässrige Phase wurde abgetrennt und mit Et₂O (3 × 25 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit ges. NaHCO₃ aq. (5 mL) und ges. NaCl aq. (5 mL) gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt mittels

Säulenchromatographie an SiO₂ (Pentan/Et₂O 19:1) gereinigt. Ethyl-(*E*)-5-methylhexa-2,4-dienoat (**194b**) wurde als farbloses Öl (4.50 g, 29.2 mmol, 91%, *E/Z* = 99:1) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.55 (dd, *J* = 15.2, 11.6 Hz, 1H, 3-H), 5.97 (d, *J* = 11.6 Hz, 1H, 4-H), 5.75 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, 2-H), 4.19 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 1.88 (s, 3H, 6-H), 1.86 (s, 3H, 5-CH₃), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

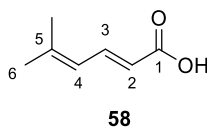
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 167.8 (q, C-1), 146.4 (q, C-5), 141.1 (t, C-3), 123.8 (t, C-2), 118.7 (t, C-4), 60.2 (s, OCH₂CH₃), 26.7 (p, C-6), 19.1 (p, 5-CH₃), 14.5 (p, OCH₂CH₃).

HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ für C₉H₁₄O₂: ber. 155.1067, gef. 155.1066.

R_f (*n*Hex/EtOAc 9:1) = 0.23.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[183].

(*E*)-5-Methylhexa-2,4-diensäure (**58**)



Ethyl-(*E*)-5-methylhexa-2,4-dienoat (**194b**, 268 mg, 1.74 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde gemäß AAV 12 mit 1 N NaOH (2.09 mL, 1.20 Äquiv.) verseift. (*E*)-5-Methylhexa-2,4-diensäure (**58**) wurde nach Säulenchromatographie an SiO₂ (*n*Hex/EtOAc 4:1) als weißer Feststoff (133 mg, 1.05 μmol, 60%, *E/Z* = 99:1) erhalten.

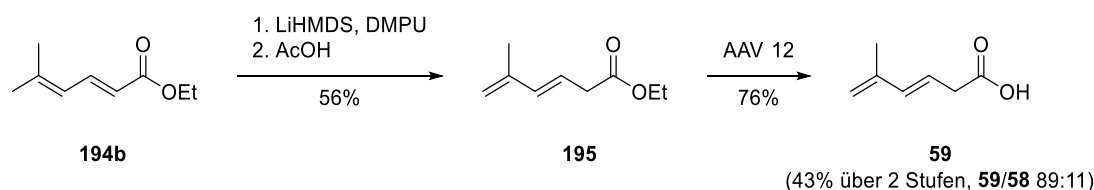
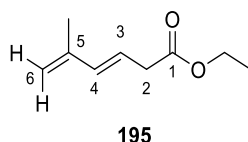
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 11.89 (br. s, 1H, COOH), 7.65 (dd, *J* = 15.3, 11.8 Hz, 1H, 3-H), 6.02 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, 4-H), 5.76 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, 2-H), 1.90 (s, 3H, 6-H), 1.89 (s, 3H, 5-CH₃).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 173.6 (q, C-1), 148.2 (q, C-5), 123.8 (t, C-3), 117.8 (t, C-4), 26.8 (p, C-6), 19.2 (p, 5-CH₃).

HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ für C₇H₁₀O₂: ber. 127.0754, gef. 127.0755.

R_f (*n*Hex/EtOAc 2:1) = 0.19 (tailing).

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[205].

(E)-5-Methylhexa-3,5-diensäure (59)

Ethyl-(E)-5-methylhexa-3,5-dienoat (195)


LiHMDS (770 mg, 4.60 mmol, 1.15 Äquiv.) in THF abs. (20 mL) wurde mit DMPU (576 μL , 4.60 mmol, 1.15 Äquiv.) versetzt. Die Mischung wurde in einem Ethylenglykol/Ethanol (2:1)-Trockeneisbad auf $-35\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Ethyl-(E)-5-methylhexa-2,4-dienoat (**194b**, 617 mg, 4.00 mmol, 1.00 Äquiv.) in THF abs. (5 mL) wurde langsam zugegeben. Die orange-rote Mischung wurde 6 h bei $-35\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt und anschließend in AcOH aq. (10 Gew.-%, 10 mL) gegeben. Die wässrige Phase wurde mit Hexan ($3 \times 10\text{ mL}$) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit ges. NaCl aq. (12 mL) gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck am Rotationsverdampfer entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an SiO_2 (*n*Hex/EtOAc 39:1) gereinigt. Ethyl-(E)-5-methylhexa-3,5-dienoat (**195**) wurde als gelbliches Öl, das mit dem α,β -ungesättigten Isomer **194b** verunreinigt war (342 mg, 2.22 mmol, 56%, 96% Reinheit (NMR)) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.21 (d, $J = 15.4\text{ Hz}$, 1H, 4-H), 5.73 (dt, $J = 15.4, 7.2\text{ Hz}$, 1H, 3-H), 4.93 (m, 2H, 6-H), 4.14 (q, $J = 7.1\text{ Hz}$, 2H, OCH_2CH_3), 3.12 (d, $J = 7.2\text{ Hz}$, 2H, 2-H), 1.84 (s, 3H, 5- CH_3), 1.25 (t, $J = 7.1\text{ Hz}$, OCH_2CH_3).

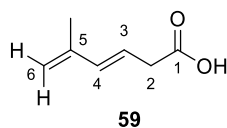
$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 171.9 (q, C-1), 141.6 (q, C-5), 136.4 (t, C-4), 121.8 (t, C-3), 116.3 (s, C-6), 60.8 (s, OCH_2CH_3), 38.3 (s, C-2), 18.6 (p, 5- CH_3), 14.3 (p, OCH_2CH_3).

HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ für $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_2$: ber. 155.1067, gef. 155.1065.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] = 2958 (m), 2925 (m), 2857 (m), 1737 (s), 1604 (w), 1456 (m), 1366 (m), 1292 (m), 1259 (m), 1160 (s), 1115 (m), 1027 (m), 966 (m), 886 (m), 863 (m), 810 (w).

R_f (*n*Hex/EtOAc 4:1) = 0.67.

(E)-5-Methylhexa-3,5-diensäure (59)



Ethyl-(E)-5-methylhexa-2,4-dienoat (**195**, 290 mg, 1.88 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde gemäß AAV 12 mit 1 N NaOH (3.76 mL, 2.00 Äquiv.) verseift. (E)-5-Methylhexa-3,5-diensäure (**59**) wurde nach Säulenchromatographie an SiO₂ (*n*Hex/EtOAc 7:1) als gelbes Öl, das mit dem α,β -ungesättigten Isomer **58** verunreinigt war (181 mg, 1.43 mmol, 76%, 89% Reinheit (NMR)) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 10.86 (br. s, 1H, COOH), 6.25 (d, J = 15.6 Hz, 1H, 4-H), 5.72 (dt, J = 15.6, 7.2 Hz, 1H, 3-H), 4.97 (m, 1H, 6-H^{cis}), 4.95 (m, 1H, 6-H^{trans}), 3.20 (dd, J = 7.2, 1.3 Hz, 2H, 2-H), 1.86 (dd, J = 1.3, 0.8 Hz, 3H, 5-CH₃).

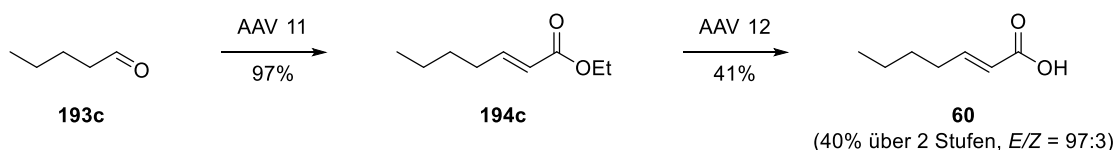
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 178.4 (q, C-1), 141.5 (q, C-5), 137.1 (t, C-4), 120.8 (t, C-3), 116.8 (s, C-6), 38.0 (s, C-2), 18.6 (p, 5-CH₃).

HRMS (ESI) m/z [M-H]⁻ für C₇H₁₀O₂: ber. 125.0597, gef. 125.0594.

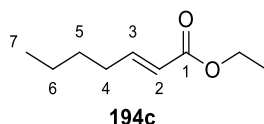
R_f (*n*Hex/EtOAc 2:1) = 0.15 (tailing).

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[206].

(E)-Hept-2-ensäure (60)



Ethyl-(E)-hept-2-enoat (194c)



Pentanal (**193c**, 2.05 mL, 19.3 mmol, 1.15 Äquiv.) wurde gemäß AAV 11 mit Ylid **121** (5.85 g, 16.8 mmol, 1.00 Äquiv.) umgesetzt. Ethyl-(E)-hept-2-enoat (**194c**) wurde als farbloses Öl (2.55 g, 16.3 mmol, 97%, E/Z = 96:4) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.96 (dt, *J* = 15.7, 7.1 Hz, 1H, 3-H), 5.80 (dt, *J* = 15.7, 1.3 Hz, 1H, 2-H), 4.17 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2.19 (qd, *J* = 7.1, 1.3 Hz, 2H, 4-H), 1.43 (m, 2H, 5-H), 1.34 (m, 2H, 6-H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, OCH₂CH₃), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, 7-H).

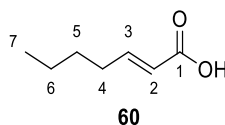
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 166.8 (q, C-1), 149.5 (t, C-3), 121.3 (t, C-2), 60.2 (s, OCH₂CH₃), 31.9 (s, C-4), 30.2 (s, C-5), 22.3 (s, C-6), 14.3 (p, OCH₂CH₃), 13.9 (p, C-7).

HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ für C₉H₁₆O₂: ber. 157.1223, gef. 157.1223.

R_f (*n*Hex/EtOAc 9:1) = 0.49.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[207].

(*E*)-Hept-2-ensäure (60)



Ethyl-(*E*)-hept-2-enoat (**194c**, 234 mg, 1.50 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde gemäß AAV 12 mit 1 N NaOH (1.80 mL, 1.20 Äquiv.) verseift. (*E*)-Hept-2-ensäure (**60**) wurde nach Säulenchromatographie an SiO₂ (*n*Hex/EtOAc 3:1) als weißer, wachsartiger Feststoff (79.7 mg, 622 μmol, 41%, *E/Z* = 97:3) erhalten.

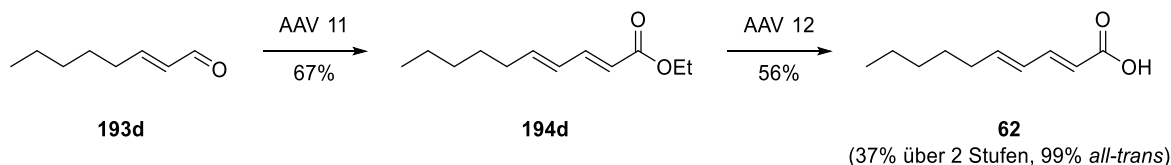
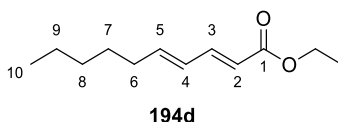
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 11.04 (br. s, 1H, COOH), 7.09 (dt, *J* = 15.6, 7.0 Hz, 1H, 3-H), 5.82 (dt, *J* = 15.6, 1.5 Hz, 1H, 2-H), 2.24 (qd, *J* = 7.0, 1.5 Hz, 2H, 4-H), 1.45 (m, 2H, 5-H), 1.35 (m, 2H, 6-H), 0.91 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, 7-H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.3 (q, C-1), 152.7 (t, C-3), 120.7 (t, C-2), 32.1 (s, C-4), 30.1 (s, C-5), 22.3 (s, C-6), 13.9 (p, C-7).

HRMS (ESI) *m/z* [M-H]⁻ für C₇H₁₂O₂: ber. 127.0754, gef. 127.0752.

R_f (*n*Hex/EtOAc 2:1) = 0.29 (tailing).

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[208].

(2E,4E)-Deca-2,4-diensäure (62)

Ethyl-(2E,4E)-deca-2,4-dienoat (194d)


(*E*)-Oct-2-enal (**193d**, 2.49 mL, 16.7 mmol, 1.15 Äquiv.) wurde gemäß AAV 11 mit dem Phosphorylid **121** (5.06 g, 14.5 mmol, 1.00 Äquiv.) umgesetzt. Ethyl-(2*E*,4*E*)-deca-2,4-dienoat (**194d**) wurde als gelbliches Öl (1.90 g, 9.65 mmol, 67%, 99% *all-trans*) erhalten.

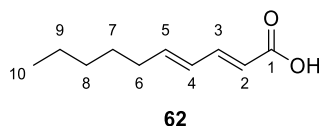
¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.24 (dd, *J* = 15.3, 9.8 Hz, 1H, 3-H), 6.13 (m, 2H, 4-H, 5-H), 5.76 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, 2-H), 4.18 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 2.14 (m, 2H, 6-H), 1.41 (m, 2H, 7-H), 1.28 (m, 7-H, 8-H, 9-H, OCH₂CH₃), 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, 10-H).

¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 167.4 (q, C-1), 145.2 (t, C-3), 144.9 (t, C-5), 128.4 (t, C-4), 119.2 (t, C-2), 60.3 (s, OCH₂CH₃), 33.1 (s, C-6), 31.5 (s, C-8), 28.5 (s, C-7), 22.6 (s, C-9), 14.4 (p, OCH₂CH₃), 14.1 (p, C-10).

HRMS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ für C₁₂H₂₀O₂: ber. 197.1536, gef. 197.1063.

R_f (*n*Hex/EtOAc 9:1) = 0.62.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[209].

(2E,4E)-Deca-2,4-diensäure (62)


Ethyl-(2*E*,4*E*)-deca-2,4-dienoat (**194d**, 365 mg, 1.86 mmol, 1.00 Äquiv.) wurde gemäß AAV 12 mit 1 N NaOH (3.72 mL, 2.00 Äquiv.) verseift. (2*E*,4*E*)-Deca-2,4-diensäure (**62**) wurde nach Säulenchromatographie an SiO₂ (*n*Hex/EtOAc 4:1) als gelbes Öl (229 mg, 1.05 mmol, 56%, *E/Z* = 99:1) erhalten.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 12.08 (br. s, 1H, COOH), 7.35 (m, 1H, 3-H), 6.19 (m, 2H, 4-H, 5-H), 5.78 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, 2-H), 2.18 (m, 2H, 6-H), 1.44 (m, 2H, 7-H), 1.30 (m, 4H, 8-H, 9-H), 0.89 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, 10-H).

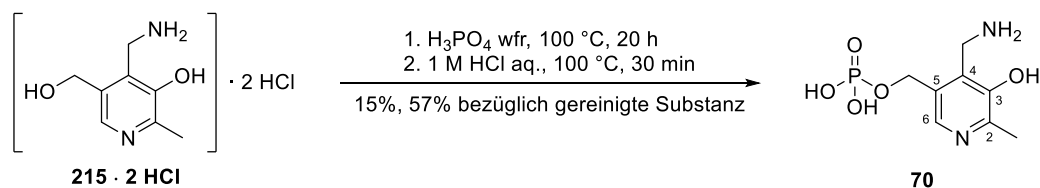
¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 173.3 (q, C-1), 147.7 (t, C-3), 146.5 (t, C-5), 128.3 (t, C-4), 118.4 (t, C-2), 33.2 (s, C-6), 31.5 (s, C-8), 28.4 (s, C-7), 22.6 (s, C-9), 14.1 (p, C-10).

HRMS (ESI) *m/z* [M-H]⁻ für C₁₀H₁₆O₂: ber. 167.1067, gef. 167.1067.

R_f (*n*Hex/EtOAc 2:1) = 0.34 (tailing).

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[205]

6.3.5 SYNTHESE VON PYRIDOXAMINPHOSPHAT (70)



In Anlehnung an Lit.^[175] wurde Pyridoxamindihydrochlorid (**215 · 2 HCl**, 1.00 g, 4.15 mmol, 1.00 Massenäquiv.) mit wasserfreier Phosphorsäure (aus 2.86 g P₄O₁₀ und 7.14 g 85% H₃PO₄, ges. 10.0 Massenäquiv.) versetzt. Das entstehende HCl-Gas wurde mit N₂ ausgetrieben und nach Beenden der Gasentwicklung wurde bei 100 °C für 20 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf RT abgekühlt, mit trockenem EtOH (100 mL) versetzt und bei 0 °C gerührt, wobei sich ein voluminöser weißer Niederschlag bildete. Der Feststoff wurde über eine Glasfritte abfiltriert und mit EtOH abs. (3 × 20 mL) und Et₂O abs. (3 × 20 mL) gewaschen. Nach dem Trocknen unter Vakuum wurde das rohe PMP (**70**) als beiger Feststoff (1.85 g) in Mischung mit einer nicht bestimmten Menge an Pyridoxamin (**215**) und Polyphosphaten erhalten. Ein Teil des Rohprodukts (498 mg) wurde mittels Säulenchromatographie an Cellulose (iPrOH/25% NH₄OH aq./H₂O 9:1:0 → 6:2:2) gereinigt, wonach PMP (**70**) als weißes, lockeres Pulver (159 mg, 641 μmol, 15%, 57% bezogen auf das gereinigte Rohprodukt) erhalten wurde.

¹H-NMR (500 MHz, D₂O): δ [ppm] = 7.53 (s, 1H, 6-H), 4.75 (d, $J^{\text{H-P}} = 6.4$ Hz, 2H, 5-CH₂), 4.20 (s, 2H, 4-CH₂), 2.34 (s, 3H, 2-CH₃).

¹³C-NMR (500 MHz, D₂O): δ [ppm] = 162.7 (q, C-3), 144.5 (q, C-2), 134.5 (d, $J^{\text{C-P}} = 7.6$ Hz, q, C-5), 132.9 (q, C-4), 123.2 (t, C-6), 61.5 (d, $J^{\text{C-P}} = 4.3$ Hz, s, 5-CH₂), 36.1 (s, 4-CH₂), 14.9 (p, 2-CH₃).

³¹P-NMR (202 MHz, D₂O): δ [ppm] = 3.0 (br. s).

UPLC-MS (ESI) m/z [M+H]⁺ für C₈H₁₃N₂O₅P: ber. 249.06, gef. 249.11; m/z [M-H]⁻ ber. 247.05, gef. 247.10.

R_f (iPrOH/25% NH₄OH aq./H₂O 6:2:2) = 0.24.

Die analytischen Daten stehen in Einklang mit Lit.^[210].

II. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. Barker, D. Stevens, S. F. Bloomfield, *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *91*, 7–21.
- [2] D. Jin, X. Kong, B. Cui, S. Jin, Y. Xie, X. Wang, Y. Deng, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13368.
- [3] E. B. Hirsch, B. R. Raux, J. W. Lancaster, R. L. Mann, S. N. Leonard, *PLoS One* **2014**, *9*, e111250.
- [4] J.-P. Latgé, *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 310–350.
- [5] E. A. Mortimer, E. Wolinsky, A. J. Gonzaga, C. H. Rammelkamp, *Br. Med. J.* **1966**, *1*, 319–322.
- [6] R. H. Alford, J. A. Kasel, P. J. Gerone, V. Knight, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1966**, *122*, 800–804.
- [7] L. Novotny, L. Dvorska, A. Lorencova, V. Beran, I. Pavlik, *Vet. Med. (Praha)*. **2012**, *49*, 343–358.
- [8] J. C. Koella, O. Restif, *Ecol. Lett.* **2001**, *4*, 207–214.
- [9] B. F. Kochin, J. J. Bull, R. Antia, *PLoS Biol.* **2010**, *8*, e1000524.
- [10] D. D. Chaplin, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, 3–23.
- [11] W. H. Organisation, “Coronavirus disease (COVID-19) Situation Dashboard,” <https://covid19.who.int/>, **2022**, zuletzt abgerufen am 1.11.2022.
- [12] M. Nicola, Z. Alsaifi, C. Sohrabi, A. Kerwan, A. Al-Jabir, C. Iosifidis, M. Agha, R. Agha, *Int. J. Surg.* **2020**, *78*, 185–193.
- [13] M. P. George, H. Masur, K. A. Norris, S. M. Palmer, C. J. Clancy, J. F. McDyer, *Ann. Am. Thorac. Soc.* **2014**, *11*, 211–220.
- [14] S. Sendil, I. Shrimanker, Q. Mansoor, J. Goldman, V. K. Nookala, *Cureus* **2020**, *12*, e6887.
- [15] W. M. Dankner, J. C. Lindsey, M. J. Levin, *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2001**, *20*, 40–48.
- [16] J. W. Sanders, J. W. Martin, M. Hooke, J. Hooke, *Clin. Infect. Dis.* **2000**, *30*, 936–938.
- [17] F. Almeida, M. L. Rodrigues, C. Coelho, *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, Artikel 214.
- [18] E. Gabler-Sandberger, *Dtsch. Arztebl.* **1998**, *95*, A-902-903.
- [19] J. J. Weems, B. J. Davis, O. C. Tablan, L. Kaufman, W. J. Martone, *Infect. Control* **1987**, *8*, 71–75.
- [20] H. Laue-Gizzi, "Untersuchungen zur Häufigkeit von Pilzinfektionen bei immunsupprimierten hämatologisch-onkologischen Patienten und mykologisch-hygienische Untersuchungen zur Expositionsprophylaxe", Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, **2006**.
- [21] S. K. Fridkin, W. R. Jarvis, *Clin. Microbiol. Rev.* **1996**, *9*, 499–511.
- [22] M. von Lilienfeld-Toal, J. Wagener, H. Einsele, O. A. Cornely, O. Kurzai, *Dtsch. Arztebl. Int.* **2019**, *116*, 271–278.
- [23] M. Niimi, N. A. Firth, R. D. Cannon, *Odontology* **2010**, *98*, 15–25.
- [24] D. Sanglard, "Resistance to Antifungal Drugs" in *Essentials of Clinical Mycology* (Hrsg.: C. Kauffman, P. Pappas, J. Sobel), Springer, New York, **2011**, S. 135–151.
- [25] R. Laniado-Laborín, M. N. Cabrales-Vargas, *Rev. Iberoam. Micol.* **2009**, *26*, 223–227.
- [26] D. A. Stevens, M. Diaz, R. Negroni, F. Montew-Gei, L. G. M. Castro, S. A. P. Sampaio, D. Borelli, A. Restrepo, L. Franco, J. L. Bran, et al., *Chemotherapy* **1997**, *43*, 371–377.
- [27] S. Keady, M. Thacker, *Intensive Crit. Care Nurs.* **2006**, *22*, 59–62.
- [28] V. Goulden, M. J. D. Goodfield, *Pediatr. Dermatol.* **1995**, *12*, 53–54.

- [29] G. Höfle, H. Steinmetz, K. Gerth, H. Reichenbach, *Liebigs Ann. der Chemie* **1991**, 1991, 941–945.
- [30] S. M. Ringel, R. C. Greenough, S. Roemer, D. Connor, A. L. Gutt, B. Blair, G. Kanter, M. von Strandtmann, *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1977**, 30, 371–375.
- [31] B. Julien, Z. Tian, R. Reid, C. D. Reeves, *Chem. Biol.* **2006**, 13, 1277–1286.
- [32] S. B. Girois, F. Chapuis, E. Decullier, B. G. P. Revol, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2006**, 25, 138–149.
- [33] D. P. Kontoyiannis, R. E. Lewis, *Lancet* **2002**, 359, 1135–1144.
- [34] K. S. Madden, F. A. Mosa, A. Whiting, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 7877–7899.
- [35] I. V. Maucher, “Nystatin,” https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Nystatin_98, **2019**, zuletzt abgerufen am 01.11.2022.
- [36] Redaktion Gelbe Liste, “Amphotericin B,” https://www.gelbe-liste.de/wirkstoffe/Amphotericin-B_2971, **2016**, zuletzt abgerufen am 01.11.2022.
- [37] D. S. Palacios, I. Dailey, D. M. Siebert, B. C. Wilcock, M. D. Burke, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, 108, 6733–6738.
- [38] S. M. Hammond, “*Biological Activity of Polyene Antibiotics*” in *Progress in Medicinal Chemistry* (Hrsg.: G.P. Ellis, G.B. West), Elsevier, Amsterdam, **1977**, S. 105–179.
- [39] Y. M. Te Welscher, M. R. Van Leeuwen, B. De Kruijff, J. Dijksterhuis, E. Breukink, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, 109, 11156–11159.
- [40] J. Kotler-Brajtburg, G. Medoff, G. S. Kobayashi, S. Boggs, D. Schlessinger, R. C. Pandey, K. L. Rinehart, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, 15, 716–722.
- [41] A. E. Oxford, H. Raistrick, P. Simonart, *Biochem. J.* **1939**, 33, 240–248.
- [42] C. Kotake, T. Yamasaki, T. Moriyama, M. Shinoda, N. Komiyama, T. Furumai, M. Konishi, T. Oki, *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1992**, 45, 1442–1450.
- [43] L. E. Johnson, A. Dietz, *Appl. Microbiol.* **1968**, 16, 1815–1821.
- [44] N. Bedorf, D. Schomburg, K. Gerth, H. Reichenbach, G. Höfle, *Liebigs Ann. der Chemie* **1993**, 1993, 1017–1021.
- [45] K. Gerth, P. Washausen, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1996**, 49, 71–75.
- [46] F. C. Odds, A. J. P. Brown, N. A. R. Gow, *Trends Microbiol.* **2003**, 11, 272–279.
- [47] F. Reusser, *Biochemistry* **1968**, 7, 293–299.
- [48] D. B. Jump, M. Torres-Gonzalez, L. K. Olson, *Biochem. Pharmacol.* **2011**, 81, 649–660.
- [49] J. Pospíšil, I. E. Markó, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 3516–3517.
- [50] P. Knauth, H. Reichenbach, *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2000**, 53, 1182–90.
- [51] K. J. Weissman, P. F. Leadlay, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3, 925–936.
- [52] U. Sundermann, S. Kushnir, F. Schulz, *Nachrichten aus der Chemie* **2011**, 59, 29–35.
- [53] C. Hertweck, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2009**, 48, 4688–4716; *Angew. Chemie* **2009**, 121, 4782–4811.
- [54] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 380–416.
- [55] E. J. N. Helfrich, J. Piel, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, 33, 231–316.
- [56] A. T. Keatinge-Clay, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 1050–1073.

- [57] A. T. Keatinge-Clay, R. M. Stroud, *Structure* **2006**, *14*, 737–748.
- [58] 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.
- [59] A. Garg, C. Khosla, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16324–16327.
- [60] K. J. Weissman, *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 348–371.
- [61] N. Kandziora, J. N. Andexer, S. J. Moss, B. Wilkinson, P. F. Leadlay, F. Hahn, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3563–3567.
- [62] S. Bali, K. J. Weissman, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1935–1942.
- [63] 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.
- [64] S. Bali, H. M. O’Hare, K. J. Weissman, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 478–484.
- [65] J. Beld, E. C. Sonnenschein, C. R. Vickery, J. P. Noel, M. D. Burkart, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 61–108.
- [66] J. Beld, K. Finzel, M. D. Burkart, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1293–1299.
- [67] A. Witkowski, A. K. Joshi, S. Smith, *Biochemistry* **1997**, *36*, 16338–16344.
- [68] D. M. Roberts, C. Bartel, A. Scott, D. Ivison, T. J. Simpson, R. J. Cox, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1116–1126.
- [69] J. Franke, C. Hertweck, *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 1179–1192.
- [70] T. Hollmann, G. Berkhan, L. Wagner, K. H. Sung, S. Kolb, H. Geise, F. Hahn, *ACS Catal.* **2020**, 4973–4982.
- [71] V. Agarwal, S. Diethelm, L. Ray, N. Garg, T. Awakawa, P. C. Dorrestein, B. S. Moore, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4452–4455.
- [72] M. W. McCarthy, D. P. Kontoyiannis, O. A. Cornely, J. R. Perfect, T. J. Walsh, *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, S474–S483.
- [73] M. M. Mullis, I. M. Rambo, B. J. Baker, B. K. Reese, *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2518.
- [74] K. Gerth, S. Pradella, O. Perlova, S. Beyer, R. Müller, *J. Biotechnol.* **2003**, *106*, 233–253.
- [75] G. Höfle, N. Bedorf, H. Steinmetz, D. Schomburg, K. Gerth, H. Reichenbach, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1996**, *35*, 1567–1569; *Angew. Chemie* **1996**, *108*, 1671–1673.
- [76] J. Muñoz-Dorado, F. J. Marcos-Torres, E. García-Bravo, A. Moraleda-Muñoz, J. Pérez, *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 781.
- [77] R. Garcia, R. Müller, "The Family Polyangiaceae" in *The Prokaryotes*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2014**, S. 247–279.
- [78] S. Schneiker, O. Perlova, O. Kaiser, K. Gerth, A. Alici, M. O. Altmeyer, D. Bartels, T. Bekel, S. Beyer, E. Bode, et al., *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1281–1289.
- [79] H. B. Levine, S. M. Ringel, J. M. Cobb, *Chest* **1978**, *73*, 202–206.
- [80] K. Gerth, P. Washausen, G. Höfle, H. Irschik, H. Reichenbach, *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1996**, *49*, 71–75.
- [81] L. Vetcher, H. G. Menzella, T. Kudo, T. Motoyama, L. Katz, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3734–3736.
- [82] F. Hahn, F. M. Guth, *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37*, 1300–1315.
- [83] K. H. Sung, G. Berkhan, T. Hollmann, L. Wagner, W. Blankenfeldt, F. Hahn, *Angew. Chemie Int. Ed.*

- 2018, 57, 343–347; *Angew. Chemie* **2018**, 130, 349–353.
- [84] G. Berkhan, C. Merten, C. Holec, F. Hahn, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, 55, 13589–13592; *Angew. Chemie* **2016**, 128, 13787–13790.
- [85] F. Hemmerling, K. E. Lebe, J. Wunderlich, F. Hahn, *ChemBioChem* **2018**, 19, 1006–1011.
- [86] D. A. Herbst, C. A. Townsend, T. Maier, *Nat. Prod. Rep.* **2018**, 35, 1046–1069.
- [87] S. J. Moss, C. J. Martin, B. Wilkinson, *Nat. Prod. Rep.* **2004**, 21, 575.
- [88] A. T. Keatinge-Clay, *Chem. Rev.* **2017**, 117, 5334–5366.
- [89] F. P. Maloney, L. Gerwick, W. H. Gerwick, D. H. Sherman, J. L. Smith, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, 113, 10316–10321.
- [90] R. Gurney, C. M. Thomas, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, 90, 11–21.
- [91] A. S. Rahman, J. Hothersall, J. Crosby, T. J. Simpson, C. M. Thomas, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 6399–6408.
- [92] J. Piel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99, 14002–14007.
- [93] R. A. John, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1995**, 1248, 81–96.
- [94] G. Wu, *Amino Acids* **2009**, 37, 1–17.
- [95] N. B. Livanova, N. A. Chebotareva, T. B. Eronina, B. I. Kurganov, *Biochem.* **2002**, 67, 1089–1098.
- [96] G. A. Hunter, G. C. Ferreira, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **2009**, 55, 102–110.
- [97] X. M. He, H. Liu, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 701–754.
- [98] S. Pascarella, F. Bossa, *Protein Sci.* **1994**, 3, 701–705.
- [99] Y.-L. Du, K. S. Ryan, *Nat. Prod. Rep.* **2019**, 36, 430–457.
- [100] M. D. Toney, *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, 544, 119–127.
- [101] S. L. Ink, L. M. Henderson, *Annu. Rev. Nutr.* **1984**, 4, 455–470.
- [102] M. D. Toney, J. F. Kirsch, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 23900–23903.
- [103] E. W. Miles, U. Banik, Z. Lu, S. A. Ahmed, K. D. Parris, C. C. Hyde, D. R. Davies, " *Crystallographic and kinetic studies of the tryptophan synthase $\alpha\beta_2$ complex with a mutation in β subunit lysine-87 that binds pyridoxal phosphate*" in *Biochemistry of Vitamin B6 and PQQ*, Birkhäuser, Basel, **1994**, S. 113–117.
- [104] M. D. Toney, J. F. Kirsch, *Science* **1989**, 243, 1485–1488.
- [105] S. Futaki, H. Ueno, A. Martinez del Pozo, M. A. Pospischil, J. M. Manning, D. Ringe, B. Stoddard, K. Tanizawa, T. Yoshimura, K. Soda, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 22306–22312.
- [106] A. J. Romo, H. Liu, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2011**, 1814, 1534–1547.
- [107] A. C. Eliot, J. F. Kirsch, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, 73, 383–415.
- [108] R. Ueoka, M. Bortfeld-Miller, B. I. Morinaka, J. A. Vorholt, J. Piel, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2018**, 57, 977–988; *Angew. Chemie* **2018**, 130, 989–993.
- [109] T. Milano, A. Paiardini, I. Grgurina, S. Pascarella, *BMC Struct. Biol.* **2013**, 13, 26.
- [110] M. Holmquist, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2000**, 1, 209–235.
- [111] M. E. Horsman, T. P. A. Hari, C. N. Boddy, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, 33, 183–202.
- [112] K. Jensen, H. Niederkrüger, K. Zimmermann, A. L. Vagstad, J. Moldenhauer, N. Brendel, S. Frank, P.

- Pöplau, C. Kohlhaas, C. A. Townsend, et al., *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 329–339.
- [113] M. Jenner, J. P. Afonso, C. Kohlhaas, P. Karbaum, S. Frank, J. Piel, N. J. Oldham, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 5262–5265..
- [114] F. T. Wong, X. Jin, I. I. Mathews, D. E. Cane, C. Khosla, *Biochemistry* **2011**, *50*, 6539–6548.
- [115] D. L. Ollis, P. D. Carr, *Protein Pept. Lett.* **2009**, *16*, 1137–1148.
- [116] D. L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag, et al., *Protein Eng. Des. Sel.* **1992**, *5*, 197–211.
- [117] C. J. Thibodeaux, W. Chang, H. Liu, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 1681–1709..
- [118] T. Hiratsuka, H. Suzuki, A. Minami, H. Oikawa, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 1076–1079.
- [119] F. J. Leeper, S. E. Shaw, P. Satish, *Can. J. Chem.* **1994**, *72*, 131–141.
- [120] W. Huang, S. J. Kim, J. Liu, W. Zhang, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 5344–5347.
- [121] F. J. Leeper, P. Padmanabhan, G. W. Kirby, G. N. Sheldrake, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 505–506.
- [122] A. J. Hughes, J. F. Detelich, A. T. Keatinge-Clay, *Medchemcomm* **2012**, *3*, 956.
- [123] O. Vergnolle, F. Hahn, A. Baerga-Ortiz, P. F. Leadlay, J. N. Andexer, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1011–1014.
- [124] C. R. Huit-Roehl, E. A. Hill, M. M. Adams, A. L. Vagstad, J. W. Li, C. A. Townsend, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1443–1449.
- [125] I. H. Gilbert, M. Ginty, J. A. O'Neill, T. J. Simpson, J. Staunton, C. L. Willis, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 1587–1590.
- [126] H.-M. Ge, T. Huang, J. D. Rudolf, J. R. Lohman, S.-X. Huang, X. Guo, B. Shen, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 3958–3961.
- [127] A. S. Olson, H. Chen, L. Du, P. H. Dussault, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 11644–11648.
- [128] A. H. Thomas, *Analyst* **1976**, *101*, 321.
- [129] J. H. Sahrner, H. Sucipto, S. C. Wenzel, M. Groh, R. W. Hartmann, R. Müller, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 946–953.
- [130] 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.
- [131] M. Petermichl, S. Loscher, R. Schobert, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2016**, *55*, 10122–10125; *Angew. Chemie* **2016**, *128*, 10276–10279.
- [132] U. S. Dakarapu, A. Bokka, P. Asgari, G. Trog, Y. Hua, H. H. Nguyen, N. Rahman, J. Jeon, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 5792–5795.
- [133] J. Dale, C.-H. de Verdier, J. Glomset, N. A. Sørensen, *Acta Chem. Scand.* **1954**, *8*, 1235–1256.
- [134] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan, "Appendix I: Properties of HPLC Solvents" in *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, Hoboken, **2009**, S. 879–886.
- [135] H. Sun, R. Kong, D. Zhu, M. Lu, Q. Ji, C. W. Liew, J. Lescar, G. Zhong, Z.-X. Liang, *Chem. Commun.* **2009**, 7399–7401.
- [136] J. M. Hamilton-Miller, *Bacteriol. Rev.* **1973**, *37*, 166–196.

- [137] G. Berkhan, F. Hahn, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53*, 14240–14244; *Angew. Chemie* **2014**, *126*, 14464–14468.
- [138] M. Schröder, "In Vitro-Studien Isolierter Ketoreduktase-Domänen Der Polyketidbiosynthese", Dissertation, Universität Bayreuth, **2021**.
- [139] N. M. Gaudelli, C. A. Townsend, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 6412–6426.
- [140] J. Sakaki, S. Kobayashi, M. Sato, C. Kaneko, *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 2262–2264.
- [141] J. J. Molloy, T. Morack, R. Gilmour, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2019**, *58*, 13654–13664; *Angew. Chemie* **2019**, *131*, 13789–13800.
- [142] T. Hoye, L. Kopel, T. Ryba, *Synthesis (Stuttg.)* **2006**, *2006*, 1572–1574.
- [143] J. M. Takacs, M. A. Helle, F. L. Seely, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 1257–1260.
- [144] M. J. Chae, A. R. Jeon, T. Livinghouse, D. K. An, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 3281.
- [145] L. I. Zakharkin, I. M. Khorlina, *Tetrahedron Lett.* **1962**, *3*, 619–620.
- [146] J. S. Cha, S. S. Kwon, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5486–5487.
- [147] J. I. Song, D. K. An, *Chem. Lett.* **2007**, *36*, 886–887.
- [148] M.-J. Chae, J.-I. Song, D.-K. An, *Bull. Korean Chem. Soc.* **2007**, *28*, 2517–2518.
- [149] A. Thenappan, D. J. Burton, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4639–4642.
- [150] K. Belecki, C. A. Townsend, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14339–14348.
- [151] P. G. M. Wuts, T. W. Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, **2006**.
- [152] V. Agarwal, S. Diethelm, L. Ray, N. Garg, T. Awakawa, P. C. Dorrestein, B. S. Moore, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4452–4455.
- [153] K. Hun Park, Y. Jin Yoon, S. Gyeong Lee, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9737–9740.
- [154] S. Kobayashi, R. S. Reddy, Y. Sugiura, D. Sasaki, N. Miyagawa, M. Hirama, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2887–2888.
- [155] Y. Marcus, *Pure Appl. Chem.* **1990**, *62*, 139–147.
- [156] K. E. Lewis, H. Steiner, *J. Chem. Soc.* **1964**, 3080–3092.
- [157] J. A. Piccirilli, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 59–64.
- [158] K. Ramalingam, K. M. Lee, R. W. Woodard, A. B. Blecker, H. Kende, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, *82*, 7820–7824.
- [159] A. Marchler-Bauer, S. H. Bryant, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W327–W331.
- [160] S. Lu, J. Wang, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, G. H. Marchler, J. S. Song, et al., *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D265–D268.
- [161] L. A. Kelley, S. Mezulis, C. M. Yates, M. N. Wass, M. J. E. Sternberg, *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 845–858.
- [162] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612.
- [163] National Center for Biotechnology Information, Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), "Protein ABK32260.1," <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABK32260.1>, **2016**, zuletzt abgerufen am 01.11.2022.

- [164] F. Hemmerling, "Untersuchung der Biosynthese des Ambruticin-Mittelfragments", Dissertation, Leibniz Universität Hannover, **2017**.
- [165] M. N. Wass, L. A. Kelley, M. J. E. Sternberg, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W469–W473.
- [166] T. Ose, A. Fujino, M. Yao, N. Watanabe, M. Honma, I. Tanaka, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41069–41076.
- [167] F. Madeira, Y. mi Park, J. Lee, N. Buso, T. Gur, N. Madhusoodanan, P. Basutkar, A. R. N. Tivey, S. C. Potter, R. D. Finn, et al., *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W636–W641.
- [168] N. Watanabe, M. M. Cherney, M. J. van Belkum, S. L. Marcus, M. D. Flegel, M. D. Clay, M. K. Deyholos, J. C. Vederas, M. N. G. James, *J. Mol. Biol.* **2007**, *371*, 685–702.
- [169] T. Yoshimura, M. Wakayama, D. W. Kim, N. Esaki, K. Soda, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58*, 363–365.
- [170] J. G. Thomas, A. Ayling, F. Baneyx, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1997**, *66*, 197–238.
- [171] 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" in *The Proteomics Protocols Handbook* (Hrsg.: J.M. Walker), Humana Press, Totowa, **2005**, S. 571–607.
- [172] R. Montioli, C. Zamparelli, C. Borri Voltattorni, B. Cellini, *Protein J.* **2017**, *36*, 174–185.
- [173] M. Herold, K. Kirschner, *Biochemistry* **1990**, *29*, 1907–1913.
- [174] L. Marschall, P. Sagmeister, C. Herwig, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *101*, 501–512.
- [175] E. A. Peterson, H. A. Sober, A. Meister, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 570–571.
- [176] R. Rej, R. E. Vanderlinde, *Clin. Chem.* **1975**, *21*, 1585–1591.
- [177] J. Wunderlich, T. Roß, M. Schröder, F. Hahn, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 4955–4959.
- [178] 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.* **2004**, *101*, 1345–1349.
- [179] R. Palos Pacheco, R. J. Eismin, C. S. Coss, H. Wang, R. M. Maier, R. Polt, J. E. Pemberton, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 5125–5132.
- [180] M. Schröder, T. Roß, F. Hemmerling, F. Hahn, *ACS Chem. Biol.* **2022**, *17*, 1030–1037.
- [181] F. Perez, [SerialBasics], Serial Cloner 2.6.1, **2013**.
- [182] J. Arnemann, "DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung" in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (Hrsg.: A.M. Gressner, T. Arndt), Springer, Berlin, Heidelberg, **2019**, S. 719–719.
- [183] C. Curti, A. Sartori, L. Battistini, N. Brindani, G. Rassu, G. Pelosi, A. Lodola, M. Mor, G. Casiraghi, F. Zanardi, *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21*, 6433–6442.
- [184] D. Garayalde, E. Gómez-Bengoa, X. Huang, A. Goeke, C. Nevado, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4720–4730.
- [185] J. A. Henderson, A. J. Phillips, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *47*, 8499–8501; *Angew. Chemie* **2008**, *120*, 8627–8629.
- [186] M. J. Robins, Y. Peng, V. L. Damaraju, D. Mowles, G. Barron, T. Tackaberry, J. D. Young, C. E. Cass, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6040–6053.
- [187] J. M. Crawford, B. C. R. Dancy, E. A. Hill, D. W. Udworthy, C. A. Townsend, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**,

- 103, 16728–16733,.
- [188] Y. Mao, F. Mathey, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1162–1163.
- [189] F.-D. Boyer, P.-H. Ducrot, V. Henryon, J. Soulié, J.-Y. Lallemand, *Synlett* **1992**, *1992*, 357–359.
- [190] S. E. Denmark, T. Kobayashi, C. S. Regens, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 4745–4759.
- [191] D. Petrović, R. Brückner, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 6524–6527.
- [192] T. K. M. Shing, T. Ying, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 2187–2194.
- [193] B. DeBoef, W. R. Counts, S. R. Gilbertson, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 799–804.
- [194] M. J. Riveira, M. P. Mischne, *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18*, 2382–2388.
- [195] K. J. Hale, S. Manaviazar, V. M. Delisser, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 9181–9188.
- [196] A. Eske, B. Goldfuss, A. G. Griesbeck, A. de Kiff, M. Kleczka, M. Leven, J.-M. Neudörfl, M. Vollmer, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 1818–1829.
- [197] J. Llaveria, Á. Beltrán, M. M. Díaz-Requejo, M. I. Matheu, S. Castellón, P. J. Pérez, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2010**, *49*, 7092–7095; *Angew. Chemie* **2010**, *122*, 7246–7249.
- [198] N. Lahmar, J. Aatar, T. Ben Ayed, H. Amri, M. Bellassoued, *J. Organomet. Chem.* **2006**, *691*, 3018–3026.
- [199] N. Jiang, A. J. Ragauskas, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3689–3692.
- [200] J. D. Goodreid, K. Wong, E. Leung, S. E. McCaw, S. D. Gray-Owen, A. Lough, W. A. Houry, R. A. Batey, *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 2170–2181.
- [201] E. C. Maki, J. Rodstein, J. G. Millar, K. S. Barbour, L. M. Hanks, J. D. Barbour, *J. Chem. Ecol.* **2011**, *37*, 714–716.
- [202] T. Suzuki, Y. Nagano, A. Kouketsu, A. Matsuura, S. Maruyama, M. Kurotaki, H. Nakagawa, N. Miyata, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1019–1032.
- [203] J. K. Park, H. H. Lackey, M. D. Rexford, K. Kovnir, M. Shatruk, D. T. McQuade, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5008–5011.
- [204] N. Duguet, A. Harrison-Marchand, J. Maddaluno, K. Tomioka, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5745–5748.
- [205] M. Abarbri, J.-L. Parrain, J.-C. Cintrat, A. Duchêne, *Synthesis (Stuttg.)* **1996**, *1996*, 82–86.
- [206] G. Salerno, C. Gallo, G. P. Chiusoli, M. Costa, *J. Organomet. Chem.* **1986**, *317*, 373–381.
- [207] V. Shekhar, D. K. Reddy, Y. Venkateswarlu, *Helv. Chim. Acta* **2012**, *95*, 1593–1599.
- [208] J. M. Concellón, C. Concellón, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1728–1731.
- [209] M. Dawei, L. Xiyan, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 3189–3198.
- [210] M. Sakai, H. Hirata, H. Samaya, K. Sekiguchi, H. Itano, T. Asai, H. Dohra, M. Hara, N. Watanabe, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, *71*, 2408–2419.

III. ANHANG

Verwendete Sequenzen

His₆-AmbF_HP_x

Gensequenz – 3024 bp

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGCCGCGTGACAGGGTCC
 TGCGGCACTGAGCAGCAGCGAACCTCGTCGTTCCAGATGCAGGCATTGAACTGCATGTTATCCGGGTGTTGATGGTCATG
 CCGTTGAATTTGCCACCCTGGGTAGTGGTGTCCGCTGTTTGTGCTGGGTGGTCTGCTGGCCACCCATGATGCCCTGACC
 CTGAACCCGGATATCCTGAGCCTGGGTCAGACCTATCGCGTTATTATGGTTTCATCCGCTGGTGCCGGTCTGATGCGAACT
 GCCTCGTGGTGAACGACCATGGATTTTATTGTTCCGTCAGGTTGAAGGTGTGCGTCAGAGTCTGGGTCTGTCAAGCGTTG
 TTCTGGTTGGTTATAGCTTTGGTGGTCTGGTTGCCAGGCCTATGTTGCACAGTTTCCGGAACGTGCCAGCAAACCTGGTT
 CTGGCGTGTAACCAAGTATCCGGCAAGTGTGTTAATGGTATGCATCTGGTTCGACAGCAGAAGCACAGCGTCATCCAGA
 TGGTCTGCGTGCTCTGCAGTTTGCAGATGTTAGCAAATTTCCGCTGTATAGCCAGCTGAGCACCCGCTGCGTCCGGAAA
 CCCTGGCATATCCGGCAATTCGACCCCTGATTGTAGCCGGTGCCGAAGATCGTTATGTGCCGACCATTCATGCTGAACGC
 CTGGCAGCGCAAATCCGAACGCAACCTGCATATTGTTGGAAGGTGCAGGTCAATTTCTGGGCCTGAGCCATGGTGGTGT
 TCTGGTACATCTGGTTAATGGTTTTGTTCTGGGAGATCGTACCGCACCAGCCCGTAGTCCGGCAGTTAGCGCGAGCCGTC
 GTGGTGGCCTGCGTAAAAATGAGCCAAGAAAGCGTGGGTGCACTGAAATCATATCTGGAAGAAGGTGAAATGCAAGCGGT
 GTTGAAGCATCACCGTTGCTGGTCAGGTGGGTTACCTGCTGAACCGTCTGCTGTCTGGTCAAGAAGCACCGAGCAGTCC
 GTATCATTGCTTTTTTATGCCGAGTGGCCTGGAAGCGTGGATGCAGCACTGCGTTTTGGTCTGCTCGTGCAAAAACCTGA
 GCCGTGGCCTGGGTGATGCAAAAACCCCTGGTACTGGATCCGGAAGGTGCCCTGCGTCTGCTCATTGAAATTTCTGCCTCAA
 GAGCGGCTGTTCCCGATCTGATTTTTGTGGGTGAAAGTCGTGAACCTGCTGCGTCTGCTGCAGTCAGCGGAAGATGTGGG
 TGCAGCGTATGTTACCACCGCATGTGATGATGCGACCCCTGGAACCCGTTGCAGCCGAATGTGCACGTCGCGGTATTGTTA
 GCGTCTGGGCGAACTGCACGCAGATACAGGCGAACTGGTTTTCTGCACGCTGCGTAGCAAACCCGATGTTGTGGTCTG
 GATGAAGCAATTGCAGTTTTGAACTGCCGTTTTGGTGTGTTGTGCCATTCGTCGTTTTCATGAATCAGGTGTTTGGACCCG
 TCAGCCGGAAGAATTTGCAGTTGCTGTTCCGGGTAGCATGGCAGGTCTGCACTGACCGTGGTTCGTGAAAAATATTCTGC
 GTCGCTTTCGTGCGGTTGTGACCAATGATAACCACAGCAAACCTGCGTGAATTTGCCGTTGATCAGCGTCGCACCAAAGAA
 GCACATCGTAGTTACGTTAATCCGGTACTGCTGGAAAGTCTGGATGCATTTGGGCTGGCAGGTGCTCAGCGCCATGCCGA
 TCGTCTGGTTATGAAATGAACTGATGATGGTAGCAGCGCACGTGTTAATCTGTATCTGGTTACCAGCGCAAGCT
 TTCGCGGTACATACCGTTTCAGAAATGACAGTCTGTTCTGGGTACACATGATATTACACGTGATTATTGGGCTGATCTG
 GAACGTCGATTTCCCTGTAACCGGATTTTGGCCGTGTTTTCTGCAGCGGGTCCGGCAACCGCAGTGGAAACAGCAGT
 TAAACTGGCCTGCTGGCAGCGCTAAAGGTAGCGCACTGCTGGTTCTGAAAGGTAGCCGATTTTTACCCTGCTGGGTG
 CCCTGGTGAGCCATGCAGAACCAGGTTAGTCCGCTGGAAGCCCTGGTTGAAAGCTGTCCGTTGGTCAAAAGTTATTGCGGTT
 GATCCGTTTGGCGAAGGGCAGCGGCAGAACTGGAAGCCTGACAGTGTGATGTTGGTTTTGTGTGGCTGGAAC
 ACTGCAGAGTGATTGGGGTGGACTGCGTTCAGTTCGGATGCGGTGCTGGAAGTTATTGATCGTCATCGTGAACGTAGCG
 GTTACTCGTTGGCCTGATGAAACCTATAACCAGTCTGGGTTGTGGTCTGATGTTTCAATTGGCAGGGTAAACTGGCTCGT
 CCGGATGTGGTTGCGGTTTGTGTTGGTTGGACCGATTGTCAGCTGCTGGCTGGCTATGTTCTGACCACCGAAGAAGTTC
 CGCAGCGCACGTCAGCGCAATGAAGCAGTGGTTAGTGCAGTGAAGAAGCAGCTGCGTTGCCAGCTGACAGCACATGCAA
 CACTGCGCCTGCTGGATGTTCTGAAAGAAGATCGTATTCTGGCACAGATTGCCGAAACCGAAGCTCGTTTTCTGGTGGC
 CTGAATGATTTTGGCCGAGAATGTGGTATGGTTAAACGTGTTTGGGGTGAAGGTCTGTTTTGGGCAGTTCAGTTTGTATCT
 GGACGGTTGGCCTCGTTTTGTTCTGATTGGTTTAGCAGCTTCTGTGGTCTGAATGCTGCGCGATCCTGTTGCACCGG
 TGGCCGTTAGCATGCAGCCGCTGACACCGGCATGTATTCCGCTTGAACCGCTTATGATATTCCAGCAGCCGAACTGGAT
 GCGGCAATGGGTACCTGAAACCGCTGCTGGGTAAGGCGTTGAAGGTATTGTTGCCAGCGTTGCAGATGATGTAGAACC
 CCGTGGTGTGCGGCTGCGCTGAACTGTTCCGTCGCATTTCTGCGTGGTTTTCAAACCCACTAA

Proteinsequenz – 1007 aa, 109 kDa

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMPRAQGPAALSSSEPRRSDAGIELHVI PGVDGHAVEFATLGSVPLFVLGGLLATHDAL
 LNPDIILSLGQTYRIMVHPPGAGRSELPRGELTMDFIVRQVEGVRQSLGLSSVVLVGYSFGGGLVAQAYVAQFPERASKLV
 LACTTSDPASVVMHMLVAEEAQRHPDGLRALQFADVSKFPLYSQLSTRLRPETLAYPAIPTLIVAGAEDRYVPTIHAER
 LARANPNATLHIVEGAGHFLGLSHGGVVLVHLVNGFVLGDRTPARSPAVSASRRRGLRKMSSQESVGALKSYLEEGERIASG
 VEASPVAGQVGYLLNRLLSGQEAAPSYPYHCFMPSGLEAVDAALRFRRRAKLSRGLGDAKTLVLVDEGALRRHFELPQ

ERLFPDLIFVGESRELLRLLQSAEDVGAAYVTTACDDATLETVAaecARRGIVSVLgELHADtGELVSARLRskPDVVVL
DEAIAGfELPFgVCAIRRFHESGVWTRQPEEFaVRVPGSMAGPALtVVRENILRRfRAVVtNDTTANLRAIaVDQRRTKE
AHRsYVNPVLLesLDAfGLAGRQRHADRRgYEIERDDGSSARVINLYLVtSASFRGHTGSEIAQSVLgTHDI TRDYWADL
ERRIPREtDFGRVfPAAgPATAVETAVKLGLLAAARKGSALLLVKGSPIfTRLGALVSHAEPGSPLEALVESCPWSKVIaV
DPfGEGAAAeLEAKLTsDDVGFVWLEtLQSDWGLRSVPDAVLEVIDRHRERSGyLVGvDEtYtSLGCGRMfHWQGLAR
PDVVAVCVGWtDCQLLAGYVLTTEEVAARARQRNEAVVSALQEQLRCQLTAHATLRLLDVLKEDRILAQIAETERRfSGA
LNDFAAEcGMVKRWGEGLFwAVQFDLDGwPRFVRDWFSSFLWSECLRDPVAPVAVSMQPLTPACIRVEPRYDIPAAELD
AAMGTLKRVLGKGVeGIVASVADdVERRGDARRAEfFRILRGFKtT*

His₆-AmbF_Px (nach Reeves *et al.*)

Gensequenz – 1371 bp

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGAGTCTGGATGCATTTGG
GCTGGCAGGTCGTCAGCGCCATGCCGATCGTCGTGGTTATGAAATTGAACGTGATGATGGTAGCAGCCACGTGTTATTA
ATCTGTATCTGGTTACCAGCGCAAGCTTTCGCGGTACATACCGGTTTCAGAAATTGCACAGTCTGTTCTGGGTACACATGAT
ATTACACGTGATTATGGGCTGATCTGGAACGTCTGATTCCTCTGTAACCGGATTTTGCCCGTGTCTTCTGCAGCGGG
TCCGCAACCGCAGTGAAACAGCAGTTAAACTGGGCTGCTGGCAGCGCTAAAGGTAGCGCACTGCTGGTTCTGAAAG
GTAGCCGATTTTTACCGTCTGGGTGCCCTGGTGAGCCATGCAGAACCGGTTAGTCCGCTGGAAGCCCTGGTTGAAAGC
TGTCGCTGGTCAAAAGTTATTGCGGTTGATCCGTTTGGCGAAGGGGACGCGCAGAACTGGAAGCCAACTGACCAGTGA
TGATGTTGGTTTTGTGTGGCTGAAACACTGCAGAGTGATTGGGGTGGACTGCGTTCAGTTCGCGATGCGGTGCTGGAAG
TTATTGATCGTCATCGTGAACGTAGCGGTTACCTGGTTGGCGTTGATGAAACCTATAACAGTCTGGGTTGTGGTCGTATG
TTTTATTGGCAGGGTAAACTGGCTCGTCCGATGTGGTTGCGGTTTTGTTGGTTGGACCGATTGTCAGCTGCTGGCTGG
CTATGTTCTGACCACGAAGAAGTTGCCGCACGCGCACGTGACGCGCAATGAAGCAGTGGTTAGTGCACtGCAAGAACAGC
TGCGTTGCCAGCTGACAGCACATGCAACACTGCGCCTGCTGGATGTTCTGAAAGAAGATCGTATTCTGGCACAGATTGCC
GAAACCGAACGTGTTTTTCTGGTGCCCTGAATGATTTTGCCGCAGAAATGTGGTATGGTTAAACGTGTTGGGGTGAAGG
TCTGTTTTGGGCAGTTCAGTTTTGATCTGGACGGTTGGCCTCGTTTTGTTGCTGATTGGTTTAGCAGCTTCTGTGGTCTG
AATGCTGCGCGATCCTGTTGCACCGGTGGCCGTTAGCATGCAGCCGCTGACACCGGCATGTATTCCGCTTGAACCGCT
TATGATATTCCAGCAGCCGAACCTGGATGCGGCAATGGGTACGCTGAAACCGCTGCTGGGTAAAGCGCTTGAAGGTATTGT
TGCCAGCGTTGCAGATGATGTAGAACCCTGGTGTGCGCGTTCGCTGAACTGTTCCGTCGATTCTGCGTGGTTTTCA
AAACCACCTAA

Proteinsequenz – 456 aa, 50.0 kDa

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMSLDAfGLAGRQRHADRRgYEIERDDGSSARVINLYLVtSASFRGHTGSEIAQSVLgTHD
ITRDYWADLERRIPREtDFGRVfPAAgPATAVETAVKLGLLAAARKGSALLLVKGSPIfTRLGALVSHAEPGSPLEALVES
CPWSKVIaVDPFEGAAAeLEAKLTsDDVGFVWLEtLQSDWGLRSVPDAVLEVIDRHRERSGyLVGvDEtYtSLGCGRM
fHWQGLARPDVVAVCVGWtDCQLLAGYVLTTEEVAARARQRNEAVVSALQEQLRCQLTAHATLRLLDVLKEDRILAQIA
ETERRfSGALNDFAAEcGMVKRWGEGLFwAVQFDLDGwPRFVRDWFSSFLWSECLRDPVAPVAVSMQPLTPACIRVEPR
YDIPAAELDAAMGTLKRVLGKGVeGIVASVADdVERRGDARRAEfFRILRGFKtT*

His₆-AmbF_Px^N

Gensequenz – 760 bp

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAtaTGACCGCACCCAGCCGtAG
TCCGGCAGTTAGCGCGAGCCGTCGTGGTGGCCTGCGTAAAATGAGCCAAGAAAGCGTGGGTGCACtGAAATCATATCTGG
AAGAAGGTGAAATTGCAAGCGGTGTTGAAGCATACCGGTTGCTGGTCAGGTGGGTTACCTGCTGAACCGTCTGCTGTCT
GGTCAAGAAGCACCAGCAGTCCGATCATTGCTTTTTTATGCCGAGTGGCCTGGAAGCCGTGGATGCAGCACTGCGTTTT
TGGTCGTCGTCGTGCAAACTGAGCCGTGGCCTGGGTGATGCAAAAACCTGGTACTGGATCCGGAAGGTGCCCTGCGTC
GTCATTTTTGAATTTCTGCCTCAAGAGCGGCTGTTCCCGGATCTGATTTTTGTGGGTGAAAGTCGTGAACtGCTGCGTCTG
CTGCAGTCAGCGGAAGATGTGGGTGCAGCGTATGTTACCACCGCATGTGATGATGCGACCCCTGGAACCGTTCAGCCGA
ATGTGCACGTGCGGTTATTGTTAGCGTCTTGGGCGAACTGCACGCAGATACAGGCGAACTGGTTTTCTGCAGCTCTGCGTA
GCAAACCGGATGTTGGTTCTGGATGAAGCAATTGCAAGTTTTGAACTGCCGTTTTGGTGTGTTGTGCCATTCGTCGTTTT
CATGAATCAGGTGTTTGGACCCGTCAGCCGGAAGAATAAG

Proteinsequenz – 252 aa, 27.2 kDa

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTAPARSPAVSASRRGGLRKMSESVSGALKSYLEEGETIASGVEASPVAGQVGYLLNRLLS
GQEAPSSPYHCFMPSGLEAVDAALRFGRRAKLSRGLGDAKTLVLDPEGALRRHFELPQERLFPDLIFVGESRELLRL
LQSAEDVGAAYVTACDDATLETVAECARRGIVSVLDELHADTSELVLSARLRSKPDVVVLDEAIAGFELPFGVCAIRRF
HESGVWTRQPEE*

His₆-AmbF_Px^C

Gensequenz – 1531 bp

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAtaTGATGGCAGGTCCTGCACT
GACCGTGGTTTCGTGAAAAATATTCGCGTCGCTTTTCGTGCGGTTGTGACCAATGATACCACAGCAAACCTGCGTGCAATTG
CCGTTGATCAGCGTCGCACCAAAGAAGCACATCGTAGTTACGTTAATCCGGTACTGCTGGAAAAGTCTGGATGCATTTGGG
CTGGCAGGTCGTCAGCGCCATGCCGATCGTCGTGGTTATGAAATTGAACGTGATGATGGTAGCAGCGCACGTGTTATTAA
TCTGTATCTGGTTACCAGCGCAAGCTTTCGCGGTCATACCGGTTTCAGAAATTGCACAGTCTGTTCTGGGTACACATGATA
TTACACGTGATTATTTGGGCTGATCTGGAACGTGATATTCCTCGTGAAACGGATTTTGGCCGTGTTTTCTGCAGCGGGT
CCGGCAACCGCAGTGGAAACAGCAGTTAACTGGGCCTGCTGGCAGCGCGTAAAGGTAGCGCACTGCTGGTTCTGAAAGG
TAGCCCGATTTTACCCTGCTGGGTGCCCTGGTGAGCCATGCAGAACCGGTTAGTCCGCTGGAAGCCCTGGTTGAAAGCT
GTCCGTGGTCAAAAAGTTATTGCGGTTGATCCGTTTGGCGAAGGGGCAGCGCAGAACTGGAAGCCAAACTGACCAAGTAT
GATGTTGGTTTTGTGTGGCTGGAAACACTGCAGAGTGATTGGGGTGGACTGCGTTCAGTTCGGATGCGGTGCTGGAAGT
TATTGATCGTCATCGTGAACGTAGCGGTTACCTGGTTGGCGTTGATGAAACCTATACCAGTCTGGGTTGTGGTTCGTATGT
TTCATTTGGCAGGGTAACTGGCTCGTCCGGATGTGGTTGCGGTTTGTGTTGGTTGGACCGATTGTCAGCTGCTGGCTGGC
TATGTTCTGACCACCGAAGAAGTTGCCGCACGCGCACGTCAGCGCAATGAAGCAGTGGTTAGTGCACCTGCAAGAACAGCT
GCGTTGCCAGCTGACAGCACATGCAACTGCGCCTGCTGGATGTTCTGAAAGAAGATCGTATTCGGCACAGATTGCCG
AAACCGAACGTCGTTTTCTGGTGCCCTGAATGATTTTGGCCGAGAATGTGGTATGGTTAAACGTGTTTGGGGTGAAGGT
CTGTTTTGGGCAGTTCAGTTTATGATCTGGACGGTTGGCCTCGTTTTGTTGCTGATTGGTTTAGCAGCTTCTGTGGTCTGA
ATGCTGCGCGATCCTGTTGCACCGGTGGCCGTTAGCATGCAGCCGCTGACACCGCATGTATTCGCGTTGAACCGCGTT
ATGATATTCCAGCAGCCGAACCTGGATGCGGCAATGGGTACGCTGAAACGCGTGGTAAAGGCGTTGAAGGTATTGTT
GCCAGCGTTGCAGATGATGTAGAACCGGTGGTATGCGCGTCGCGCTGAACTGTTCCGTCGCATTCTCGCTGGTTTTCAA
AACCACCTAAG

Proteinsequenz – 509 aa, 56.1 kDa

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMMAGPALTVVRENI LRRFRAVVTNDTTANLRAIAVDQRRKKEAHRSYVNPVLLLES LDAFG
LAGRQRHADRRGYEIERDDGSSARVINLYLVTSASFRGHTGSEIAQSVLGDITRDYWADLERRIPRETFGRVFPFPAAG
PATAVETAVKLGLLAARKGSALLVLKGSPIFTRLGALVSHAEPGSPLEALVESCPWSKVIADVDFGEGAAAEELEAKLTS
DVGFWLETLQSDWGLRSLVPAVLEVIDRHRERSGYLVGVDETYTSLGCGRMFHWQGLARPDVVAVCVGWTDQQLLAG
YVLTTEEVAARARQRNEAVVSALQEQLRCQLTAHATLRLLDVLEKEDRILAQIAETERRFSGALNDFAAECGMVKRVWEG
LFWAVQFDLDGWPRFVRDWFSSFLWSECLRDVPAVAVSMQPLTPACIRVEPRYDIPAAELDAAMGTLKRVLKGKVEGIV
ASVADDVERRGDARRAELFRRIILRGFKTT*

His₆-AmbF_Px^{NC}

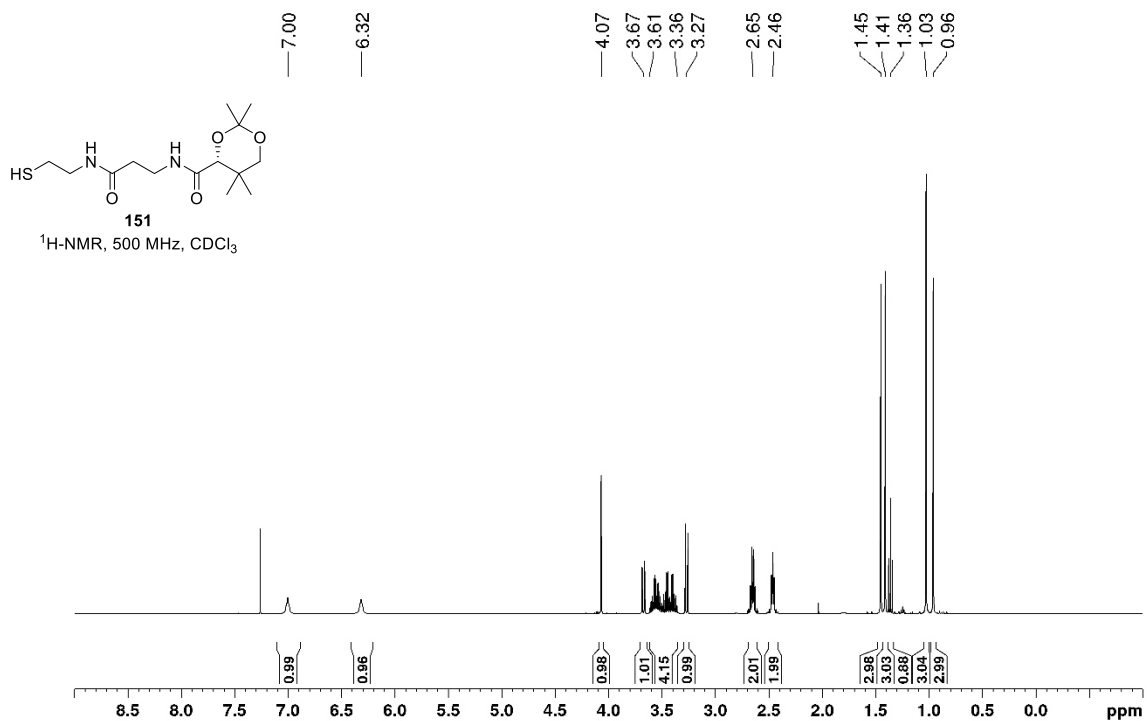
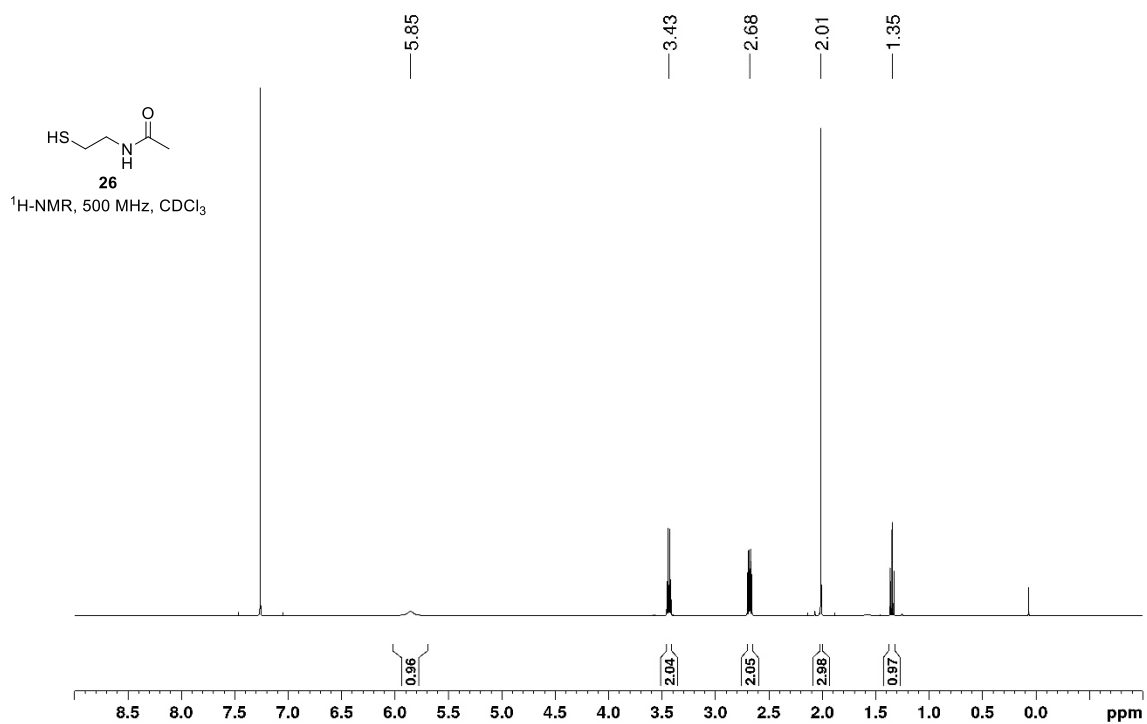
Gensequenz – 2248 bp

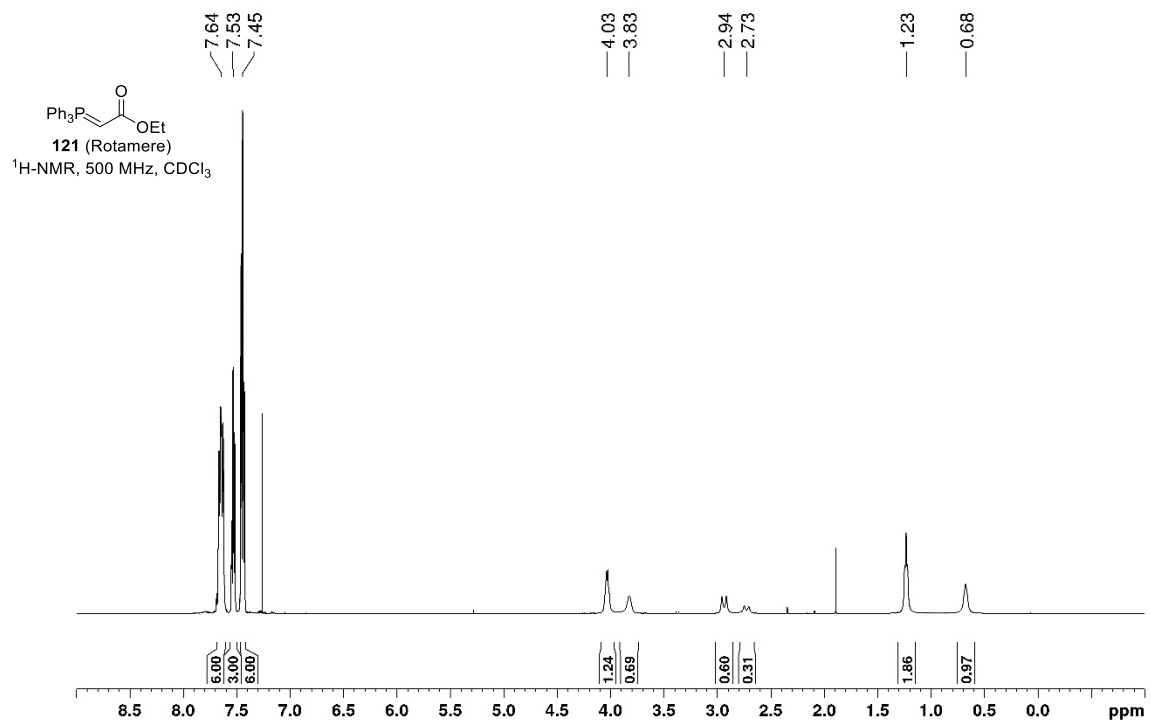
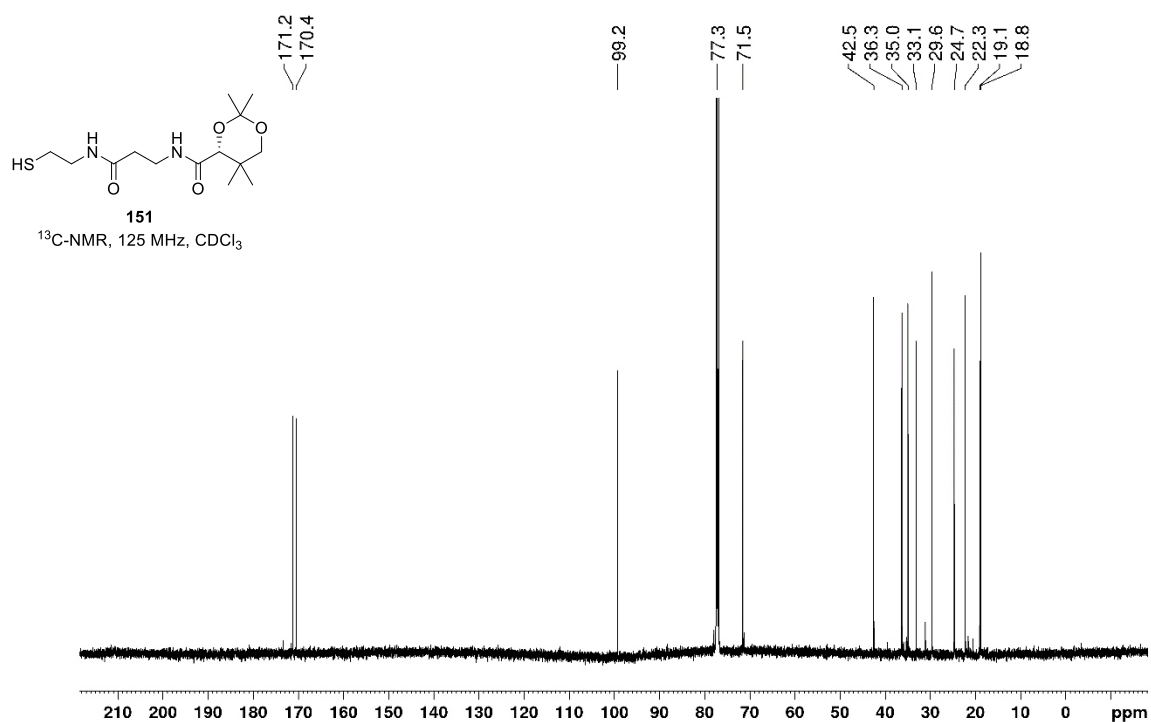
ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCCAtaTGACCGCACACAGCCGTTAG
TCCCGCAGTTAGCGCGAGCCGTCGTGGTGGCCTGCGTAAAATGAGCCAAGAAAGCGTGGGTGCACTGAAATCATATCTGG
AAGAAGGTGAAATTGCAAGCGGTGTTGAAGCATACCCGGTTGCTGGTCAGGTGGGTTACCTGCTGAACCGTCTGCTGTCT
GGTCAAGAAGCACCAGCAGTCCGTATCATTGCTTTTTATGCCAGTGGCCTGGAAGCCGTTGGATGCAGCACTGCGTTT
TGGTCGTCGTCGTGAAAACCTGAGCCGTGGCCTGGGTGATGCAAAAACCCCTGGTACTGGATCCGGAAGGTGCCCTGCGTC
GTCATTTTGAATTTCTGCCTCAAGAGCGGCTGTTCCCGGATCTGATTTTTGTGGGTGAAAGTCTGAACTGCTGCGTCTG
CTGCAGTCAGCGGAAGATGTGGGTGCAGCGTATGTTACCACCGCATGTGATGATGCGACCCTGGAACCGTTGCAGCCGA
ATGTGCACGTCGCGTATTGTTAGCGTCTGCGGCGAACTGCACGCAGATACAGGCGAACTGGTTTTCTGCAGTCTGCGTA
GCAACCGGATGTTGTGGTCTGGATGAAGCAATTGCAGGTTTTGAACTGCCGTTTGGTGTGTTGTGCCATTCTGCTGTTTT
CATGAATCAGGTGTTTTGGACCCGTCAGCCGGAAGAAATTTGCAGTTCGTGTTCCGGGTAGCATGGCAGGTCCTGCAGTGC
CGTGGTTCGTGAAAATATTCTGCGTCGCTTTTCGTGCGGTTGTGACCAATGATACCACAGCAAACCTGCGTGCAATTGCCG

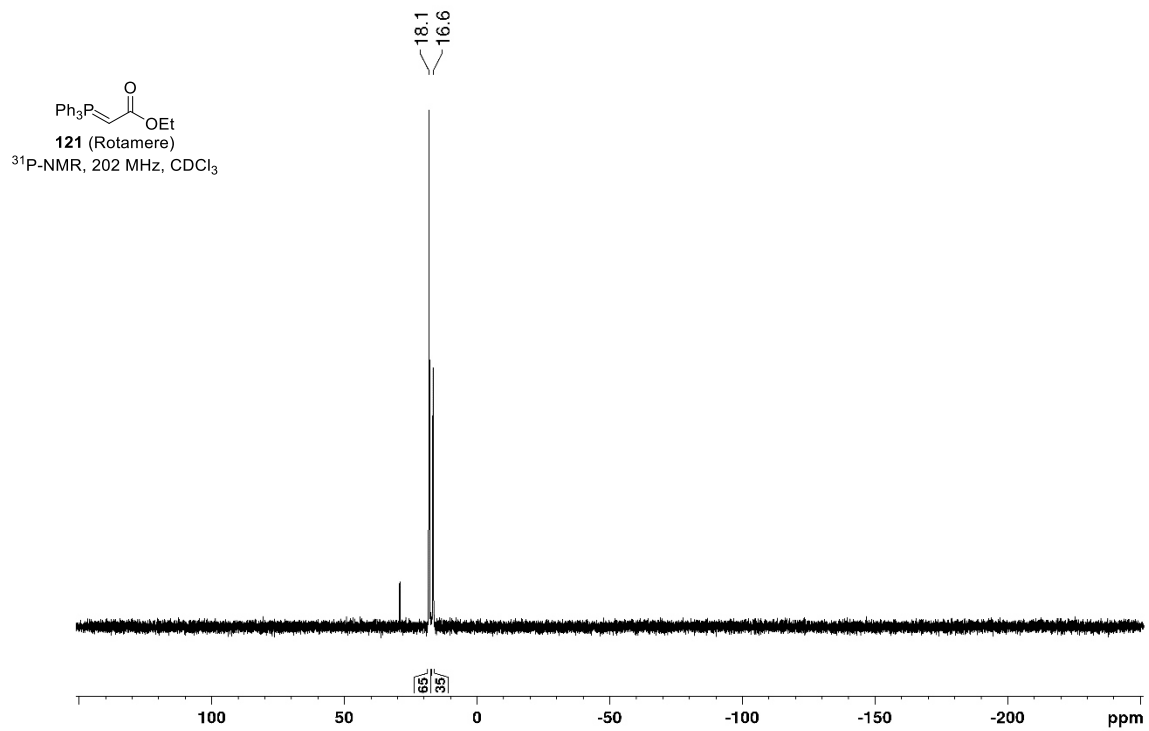
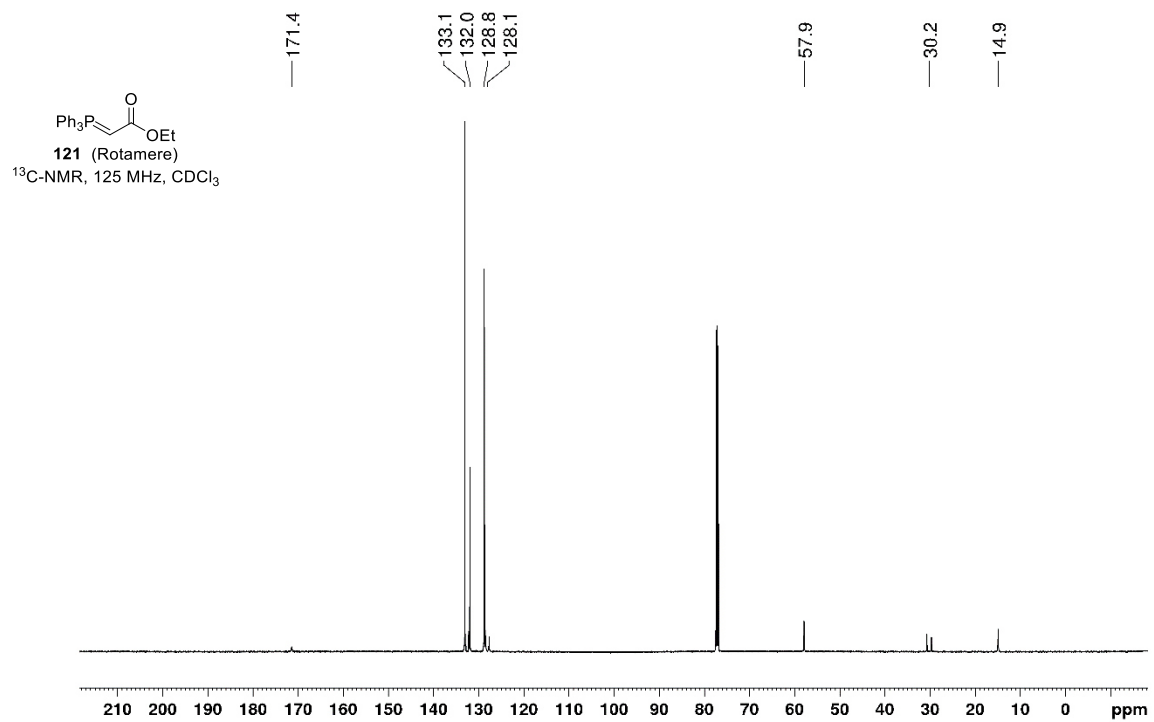
TTGATCAGCGTCGCACCAAAGAAGCACATCGTAGTTACGTTAATCCGGTACTGCTGGAAAAGTCTGGATGCATTTGGGCTG
GCAGGTCGTGACGCGCCATGCCGATCGTCGTGGTTATGAAATTGAACGTGATGATGGTAGCAGCGCACGTGTTATTAATCT
GTATCTGGTTACCAGCGCAAGCTTTTCGCGGTCATACCGGTTTCAGAAAATTGCACAGTCTGTTCTGGGTACACATGATATTA
CACGTGATTATTTGGGCTGATCTGGAACGTGATATTCCTCGTAAAACGGATTTTGGCCGTGTTTTTCTCGACGCGGGTCCG
GCAACCGCAGTGGAAACAGCAGTTAAACTGGGCCTGCTGGCAGCGCGTAAAGGTAGCGCACTGCTGGTTCTGAAAGGTAG
CCGATTTTTTACCCTGCTGGGTGCCCTGGTGGCCATGCAGAACCGGTTAGTCCGCTGGAAGCCCTGGTTGAAAGCTGTC
CGTGGTCAAAAAGTTATTGCGGTTGATCCGTTTGGCGAAGGGGCGAGCGCAGAACTGGAAGCCAAACTGACCAGTGATGAT
GTTGGTTTTGTGTGGCTGGAACACTGCAGAGTGATTGGGGTGGACTGCGTTTCCGATGCGGTGCTGGAAGTTAT
TGATCGTCATCGTGAACGTAGCGGTTACCTGGTTGGCGTTGATGAAACCTATACCAGTCTGGGTTGTGGTCGTATGTTTC
ATTGGCAGGGTAAACTGGCTCGTCCGATGTGGTTGCGGTTTGTGTTGGTTGGACCGATTGTGAGCTGCTGGCTGGCTAT
GTTCTGACCACCGAAGAAGTTGCCGCGACGCGCACGTCAGCGCAATGAAGCAGTGGTTAGTGCAGTGCAGAACAGCTGCC
TTGCCAGCTGACAGACATGCAACTGCGCCTGCTGGATGTTCTGAAAGAAGATCGTATTCTGGCACAGATTGCCGAAA
CCGACGTCGTTTTTCTGGTGCCCTGAATGATTTTGGCGCAGAATGTGGTATGGTTAAACGTGTTTGGGGTGAAGGTCTG
TTTTGGGCGAGTTTCACTGATCTGGACGGTTGGCCCTCGTTTTTGTTCGTGATTGGTTTACGAGCTTTCTGTGGTCTGAATG
TCTGCGCGATCCTGTTGCACCGGTGGCCGTTAGCATGCAGCCGCTGACACCGGCATGTATTGCGGTTGAACCGGTTATG
ATATCCAGCAGCCGAAGTGGATGCGCAATGGGTACGCTGAAACGCGTCTGGGTAAAGGCGTTGAAGGTATTGTTGCC
AGCGTTGCAGATGATGTAGAACGCCGTGGTATGCGCGTTCGCGTGAACGTTCCGTCGCATTCTGCGTGGTTTTCAAAC
CACCTAAG

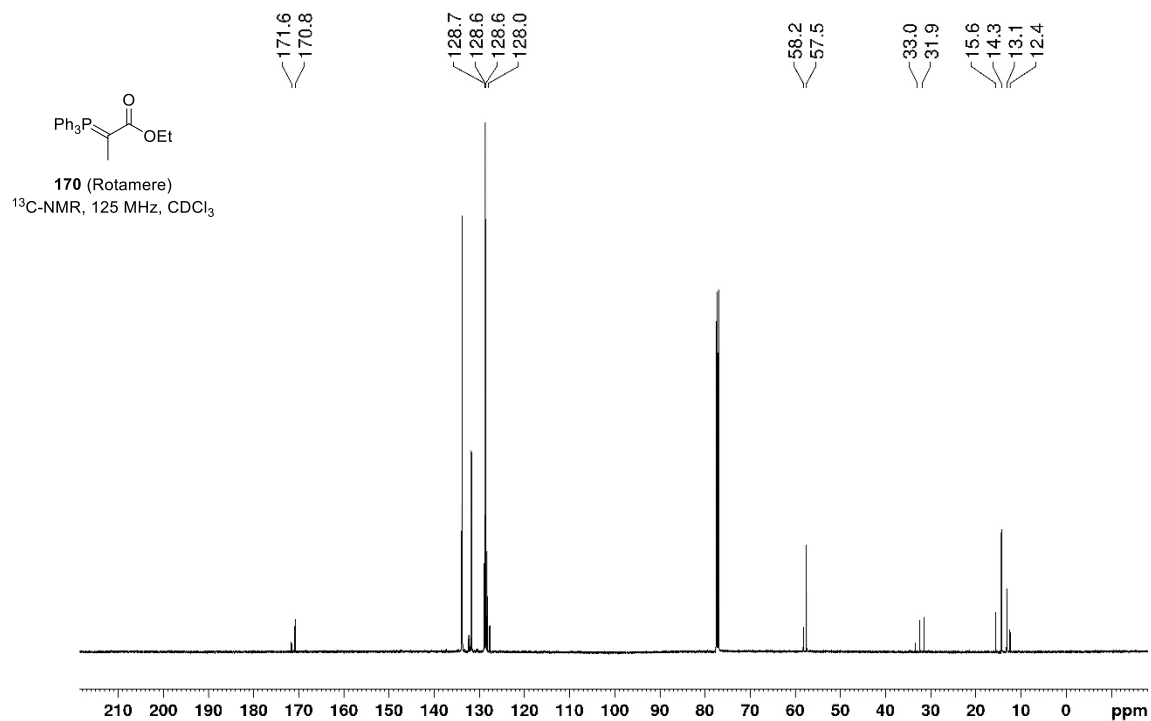
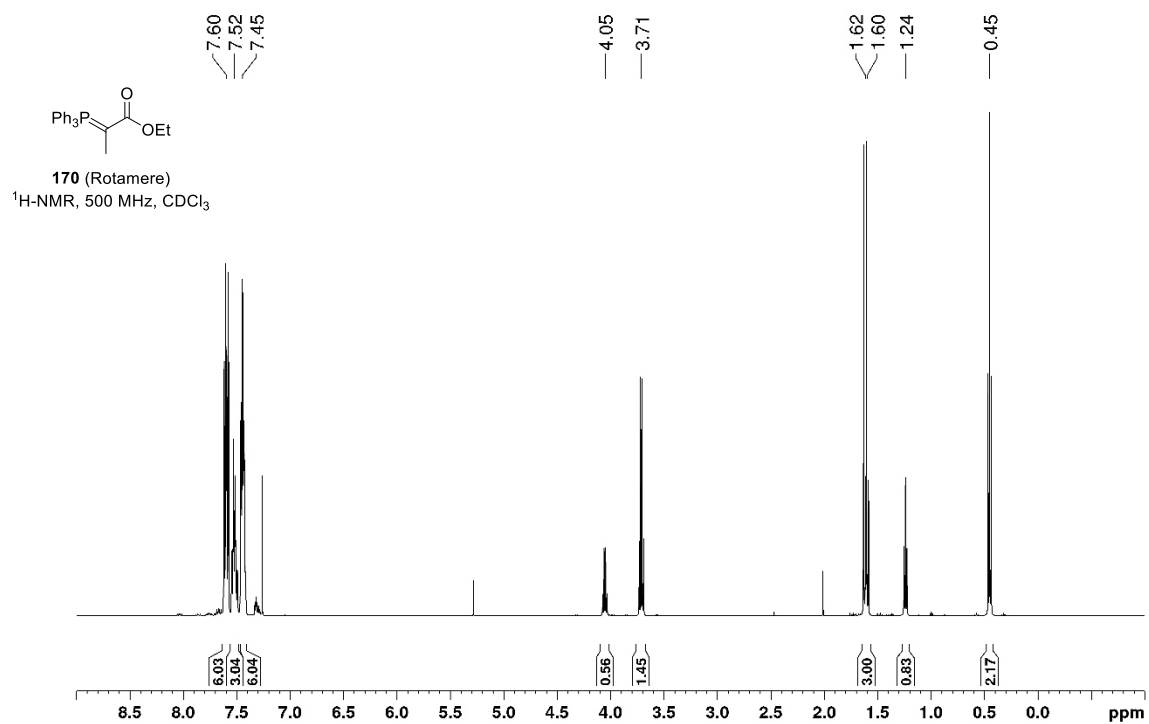
Proteinsequenz – 748 aa, 81.8 kDa

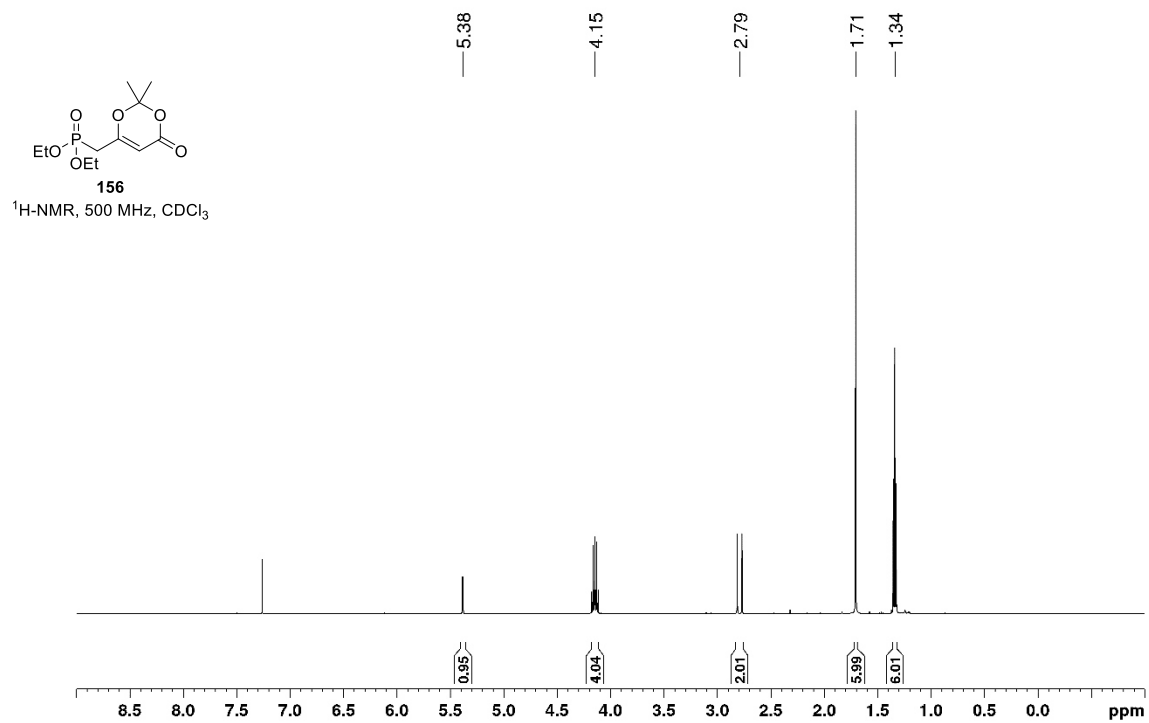
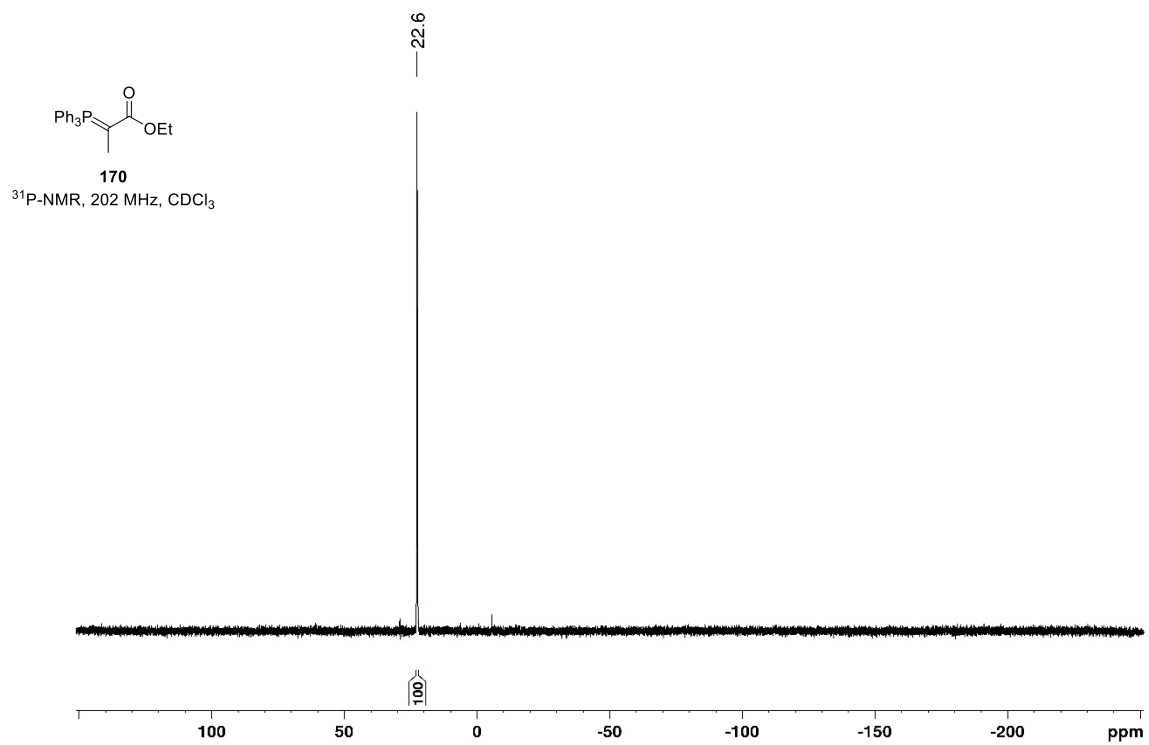
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMTAPARSPAVSASRRGGLRKMSQESVGALKSYLEEGLIASGVEASPVAGQVGYLLNRLLS
GQEAPSSPYHCFMPSGLEAVDAALRFGRRAKLSRGLGDAKTLVLDPEGALRRHFEFLPQERLFPDLIFVGESRELLRL
LQSAEDVGAAYVTTACDDATLETVAECARRGIVSVLDELHADTDELVSARLRKPDVVVLDEAIAGFELPFVCAIRRF
HESGVWTRQPEEFVAVRVPMSMAGPALTVVRENILRRFRVVTNDTTANLRAIAVDQRRTKEAHRSYVNPVLESDFGL
AGRQRHADRRGYEIERDDGSSARVINLYLVTSASFRGHTGSEIAQSVLGHDI TRDYWADLERRIPREDFGRVFPAGP
ATAVETAVKLGLLAARKGSALLVVKGSPIFTRLGALVSHAEPGSPLEALVESCPWSKVI AVDPFGEAAAELEAKLTSDD
VGFVWLETQSDWGGRLRSPDAVLEVIDRHRERSGYLVGVDETYTSLGCGRMFHWQGLARPDVVAVCVGWTDCQLLAGY
VLTTEEVAARARQRNEAVVSALQEQLRCQLTAHATLRLLDVLKEDRILAQIAETERRFSGALNDFAAECGMVKRVWGEGL
FWAVQFDLDGWPRFVRDWFSSFLWSECLRDPVAVVAVSMQPLTPACIRVEPRYDIPAAELDAAMGTLKRVLGKGVGIV
SVADDVERRGDARRAELFRILRGFKTT*

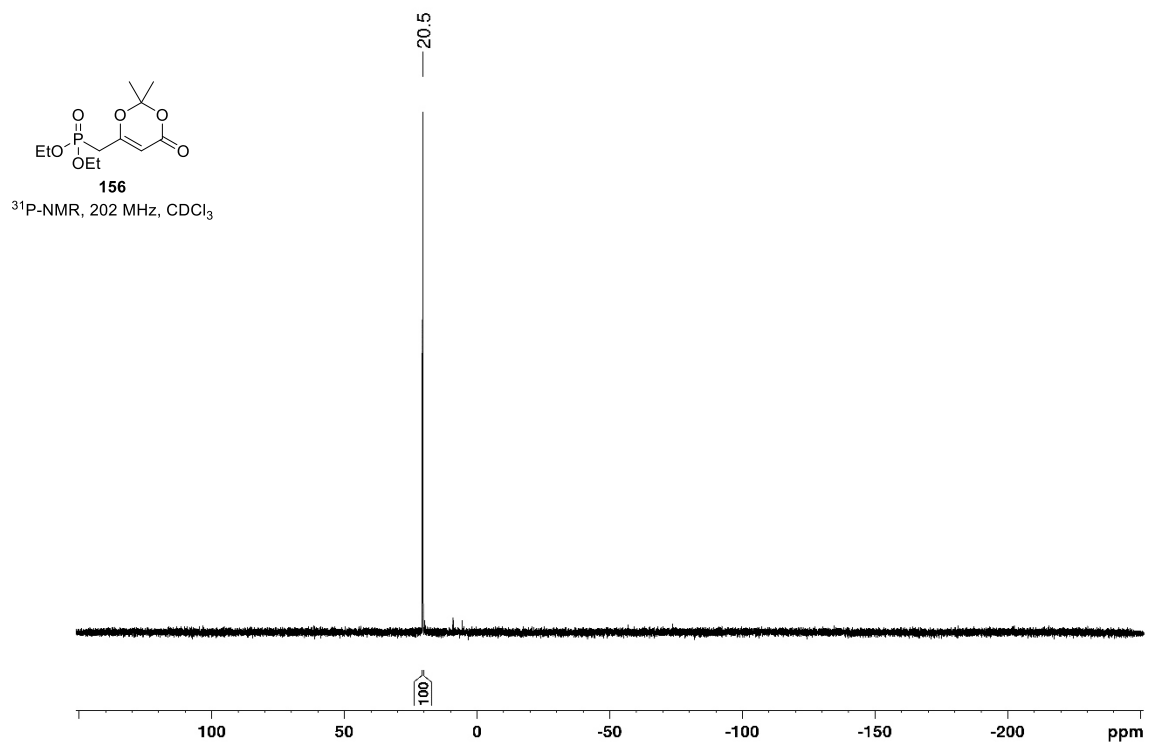
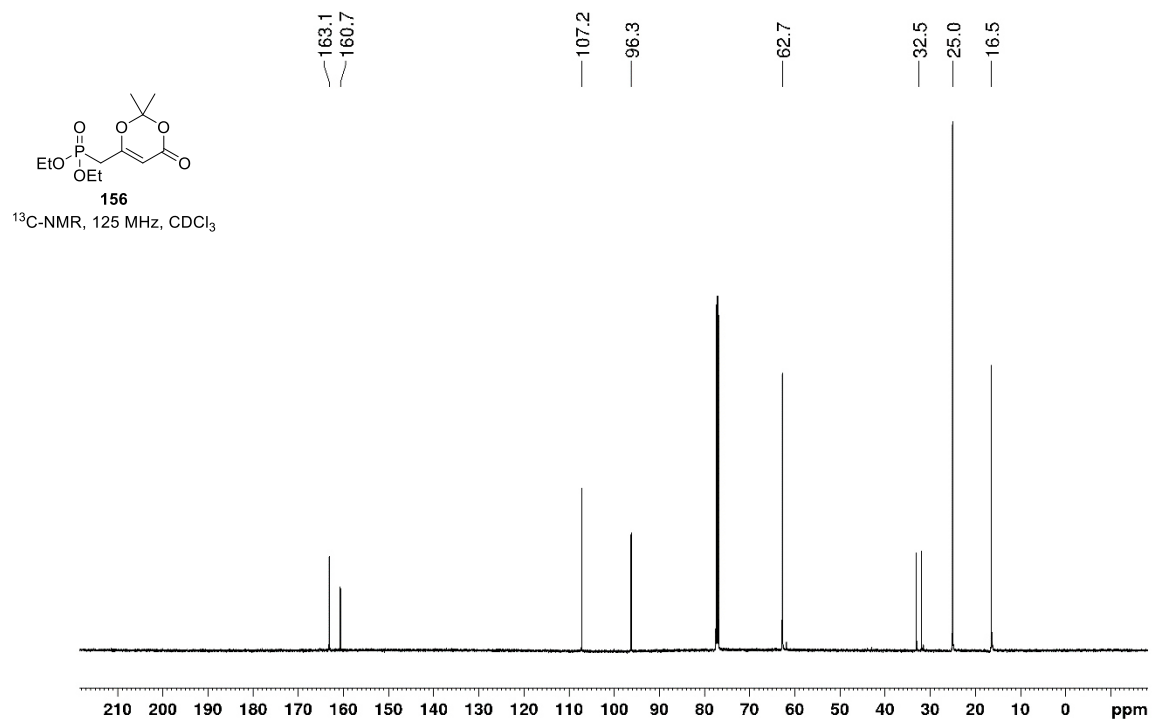


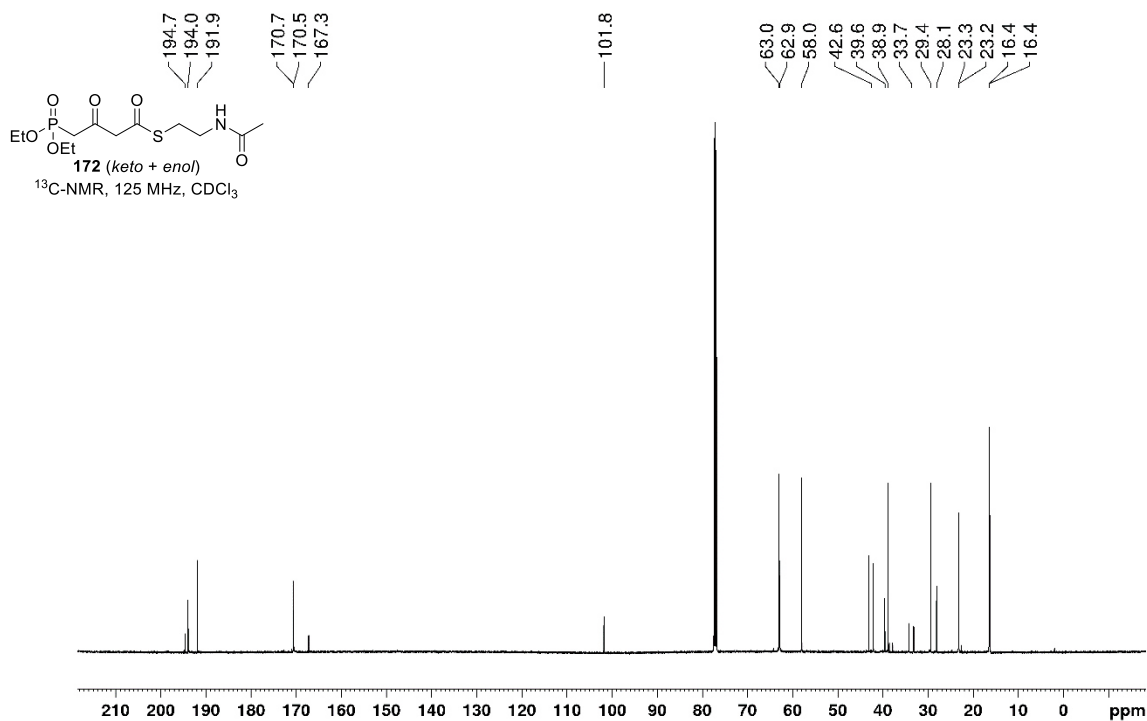
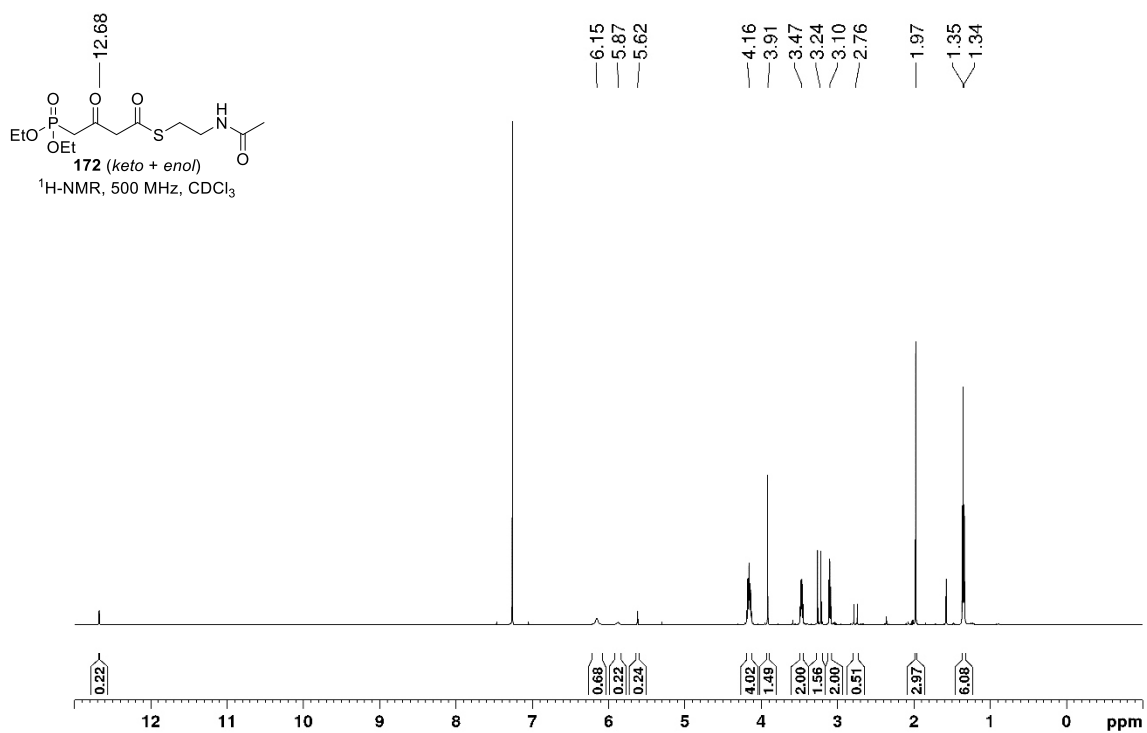


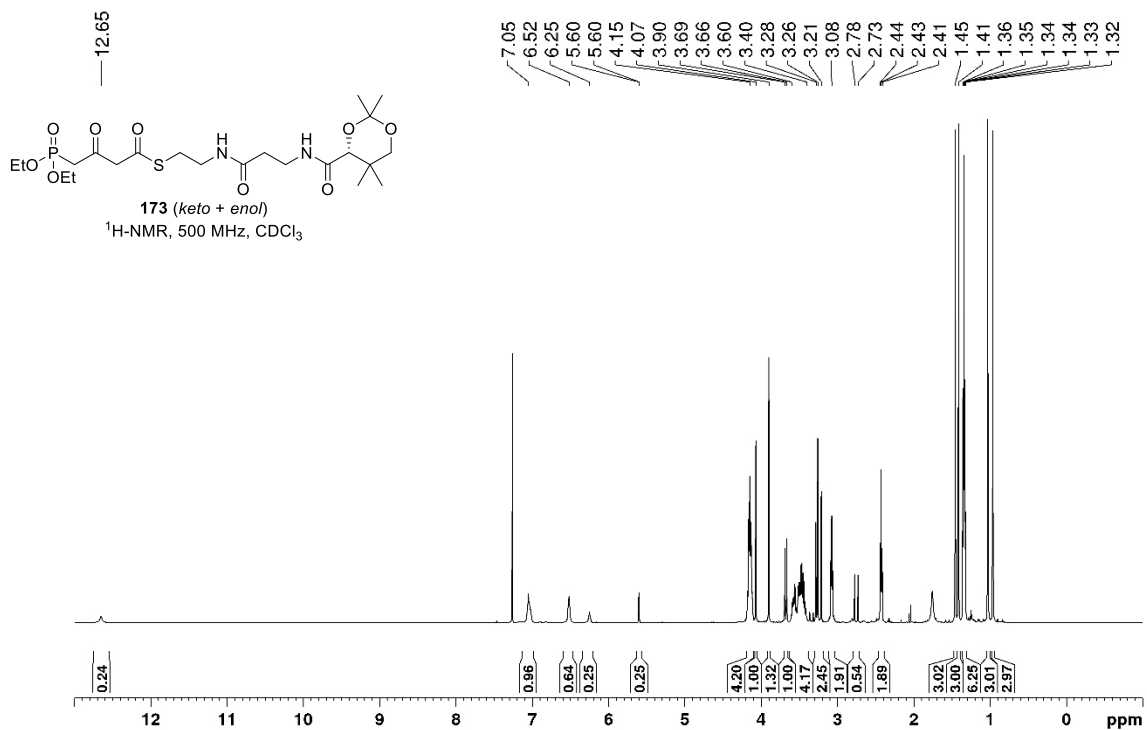
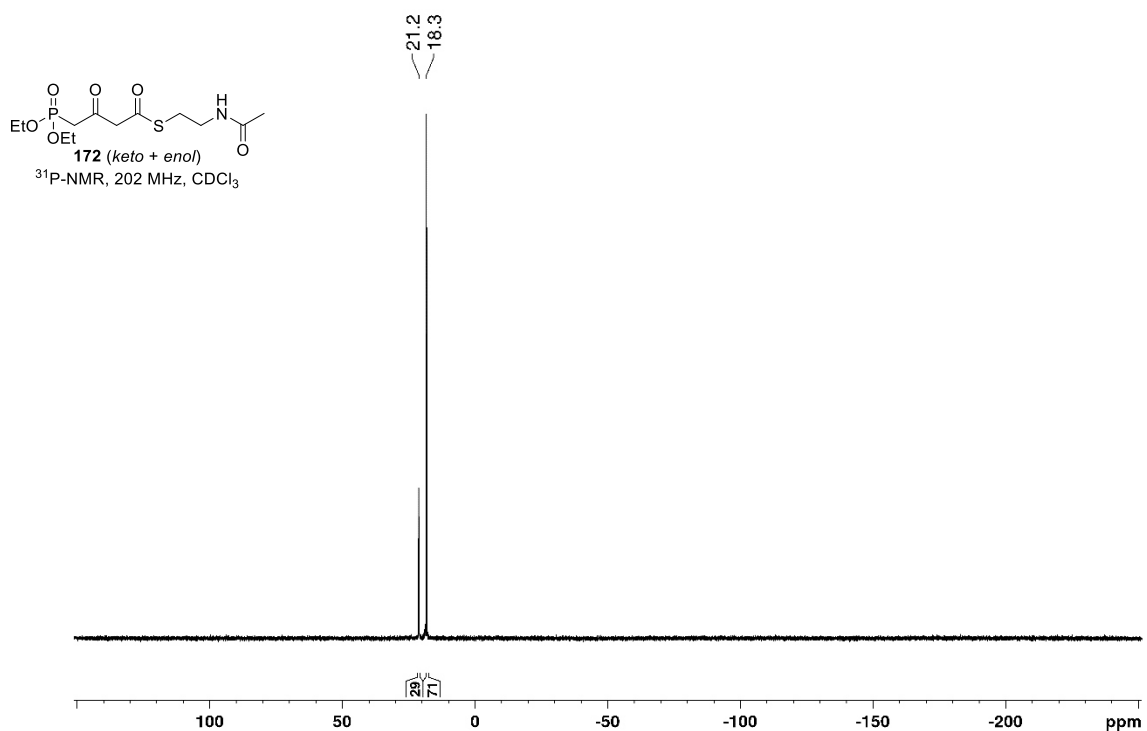


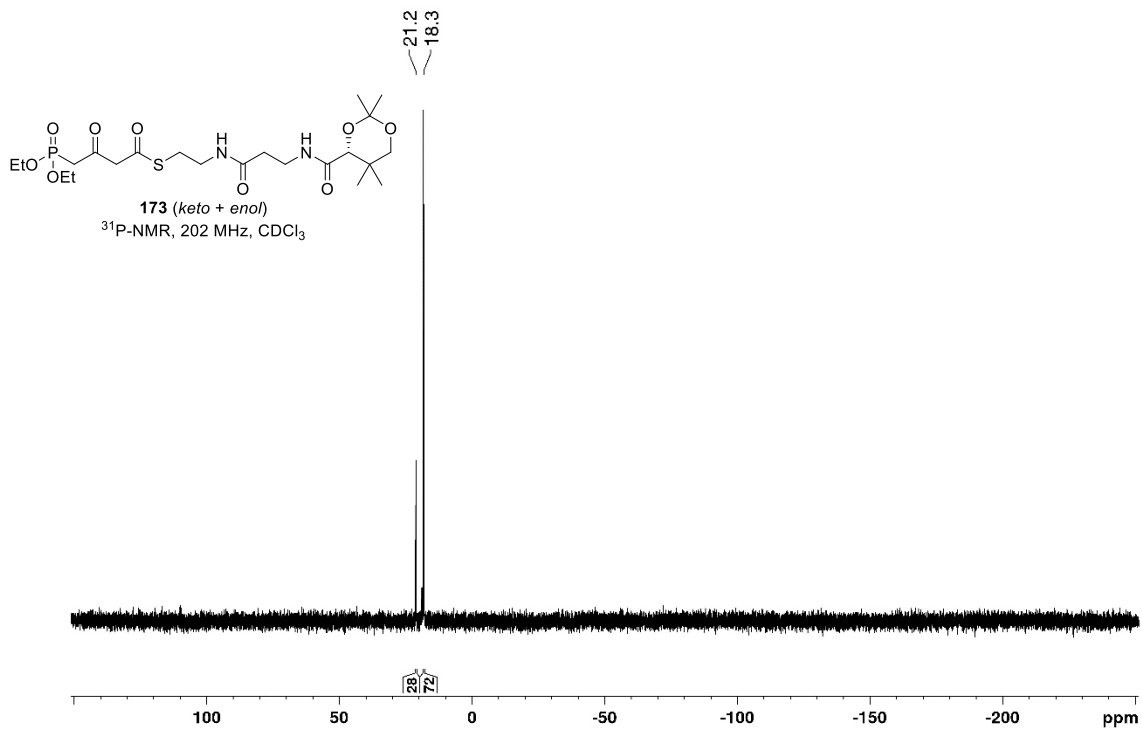
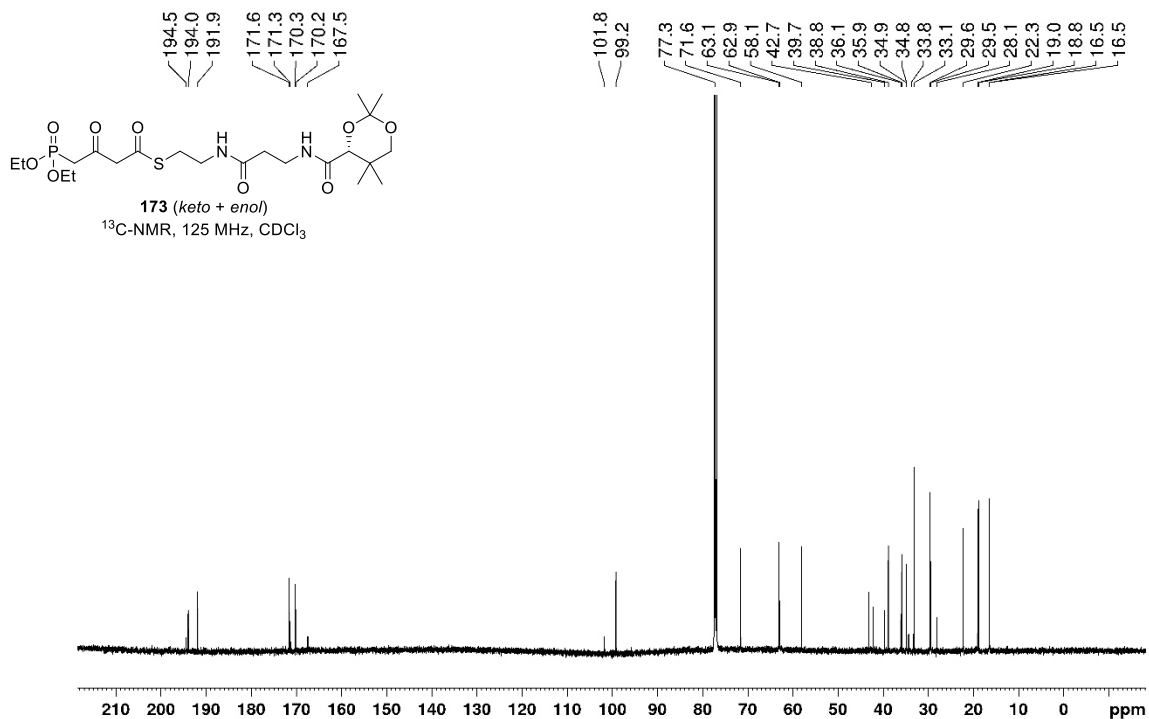


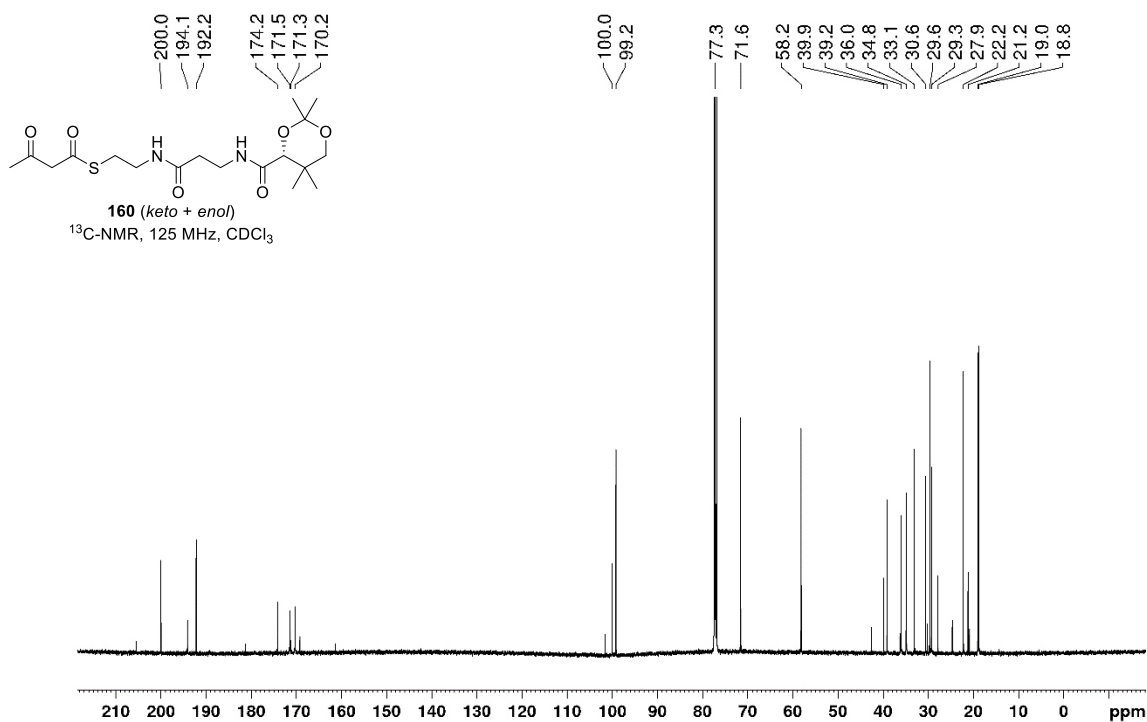
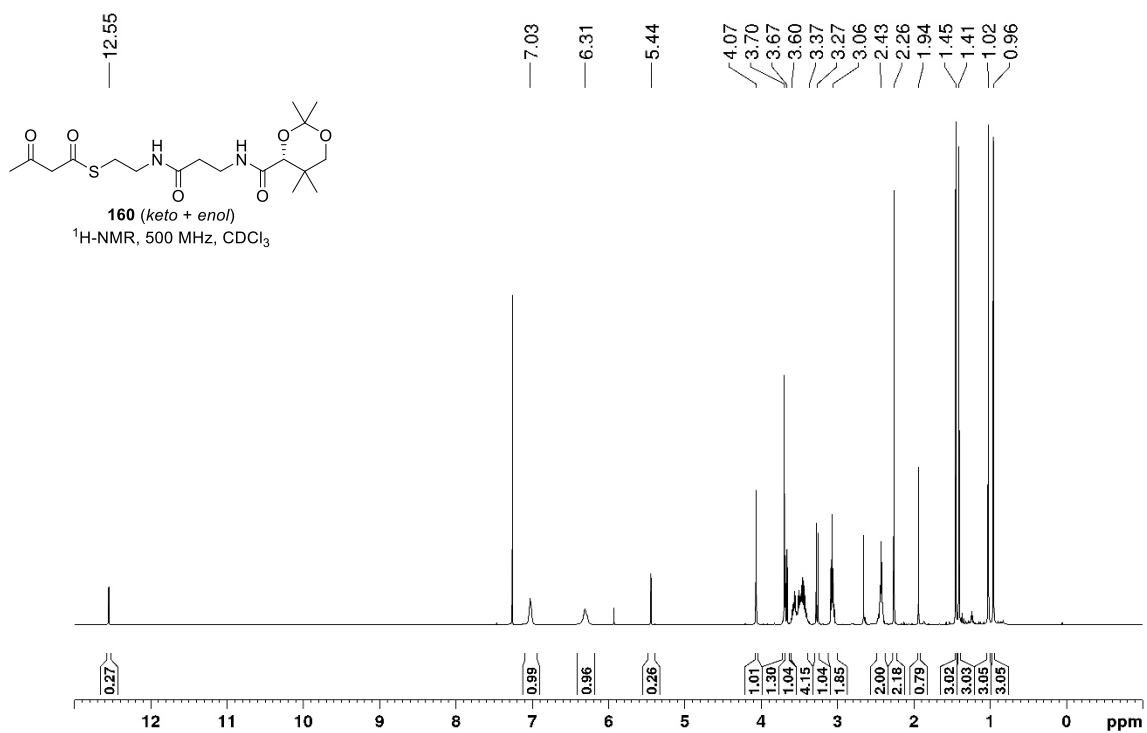


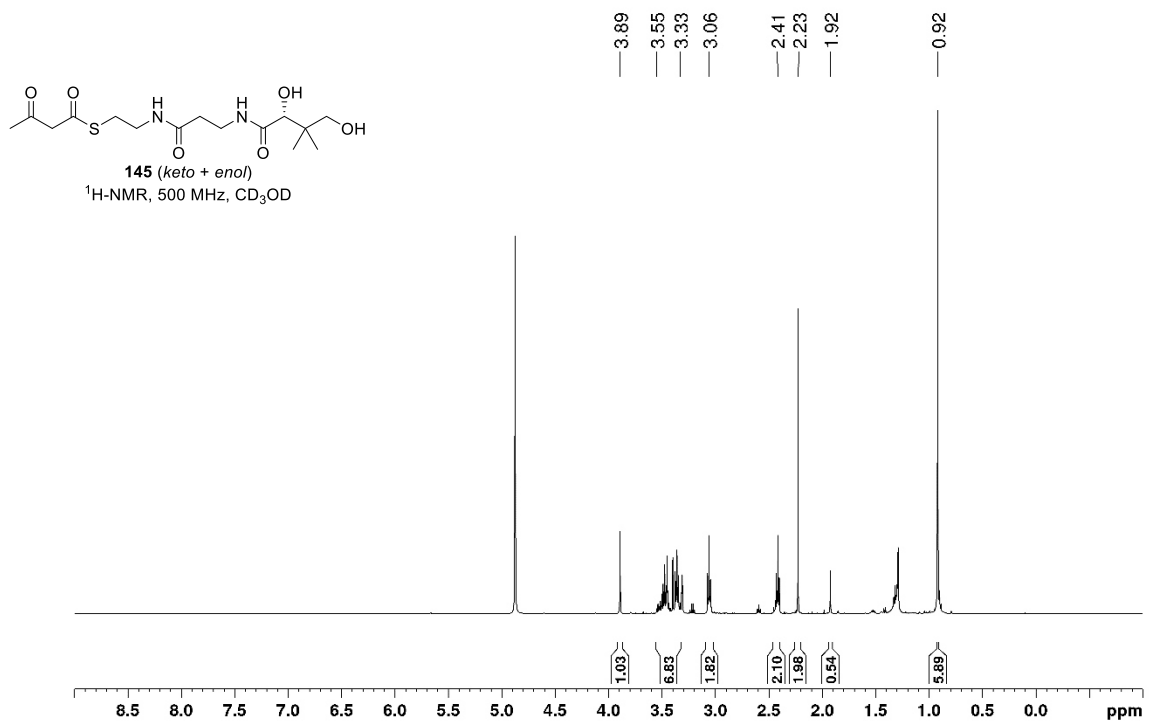


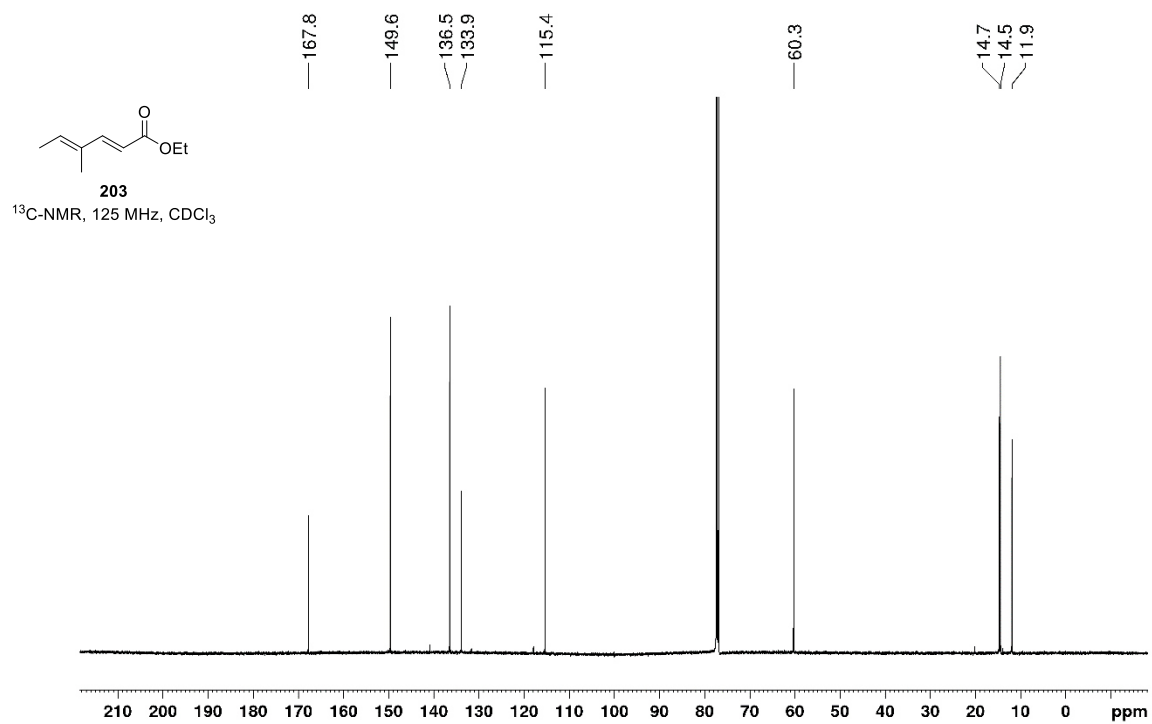
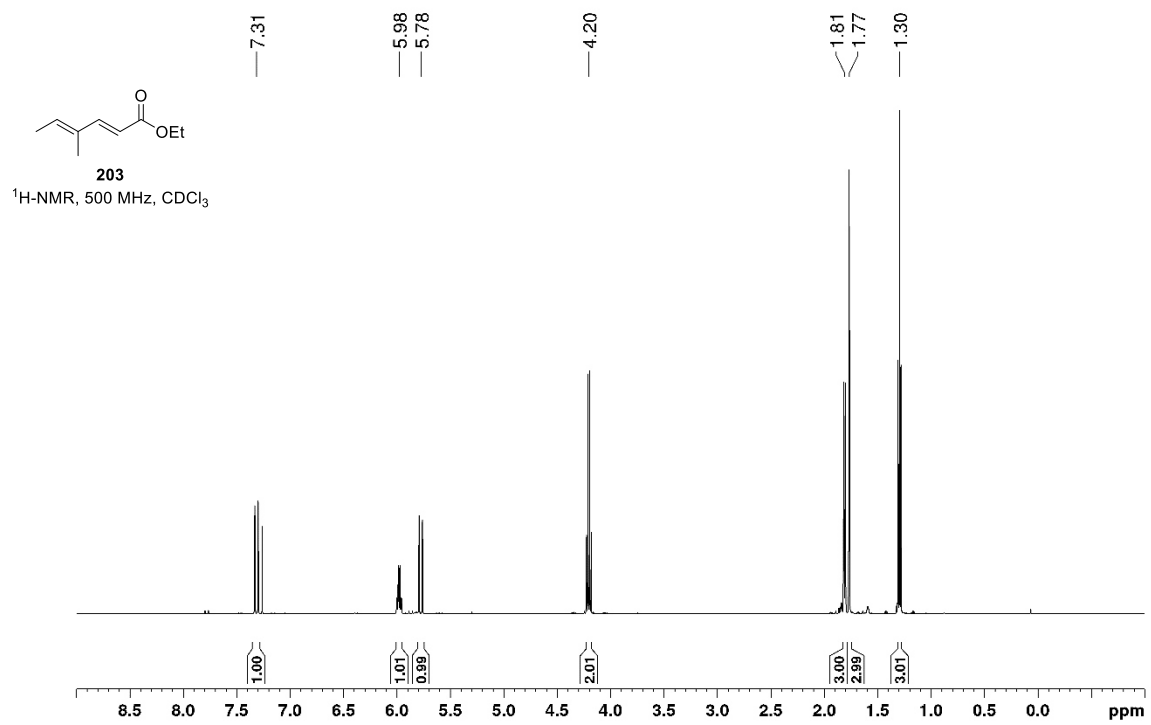


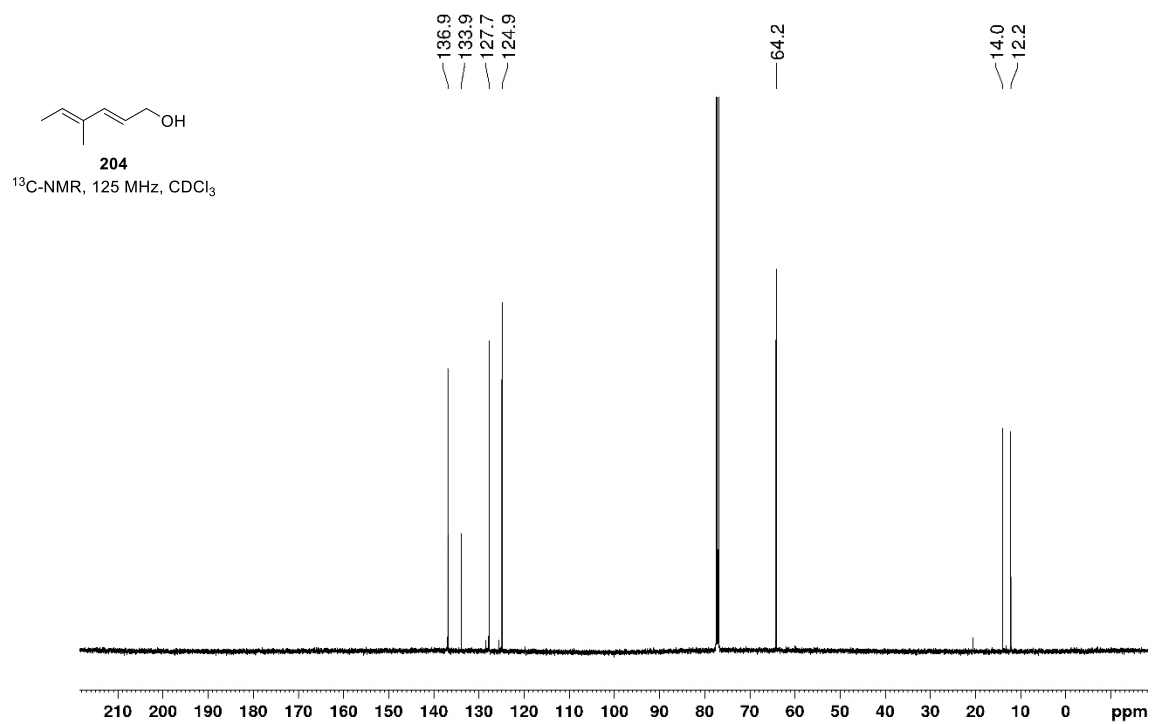
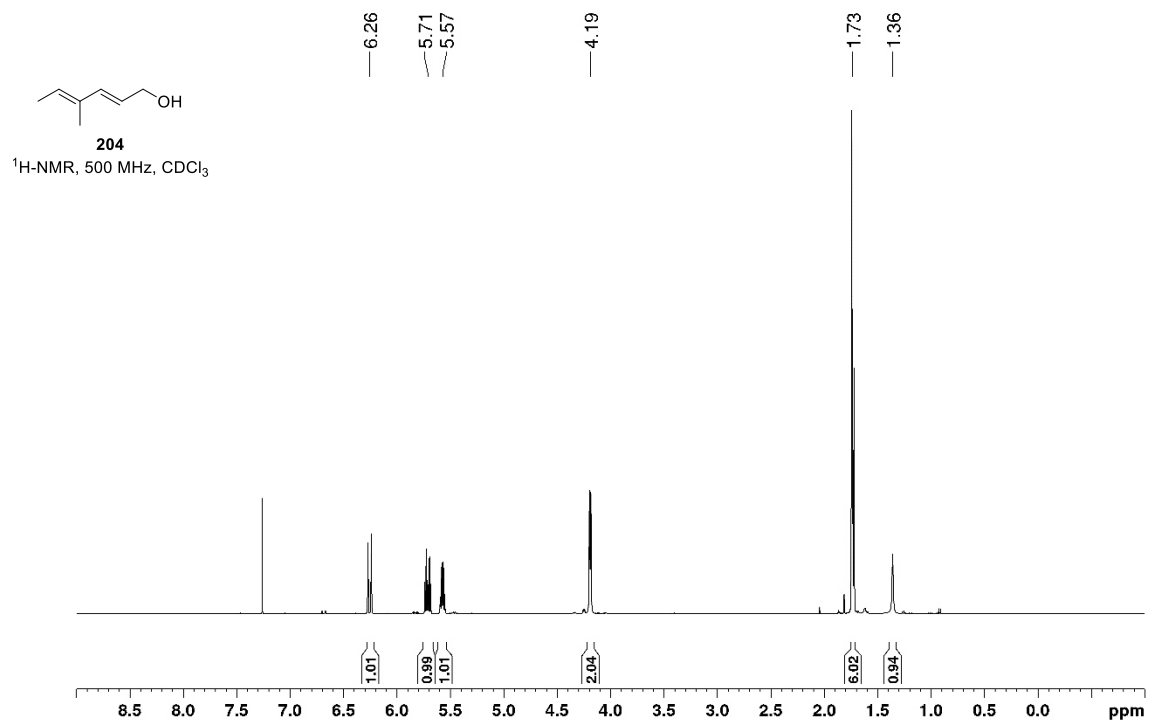


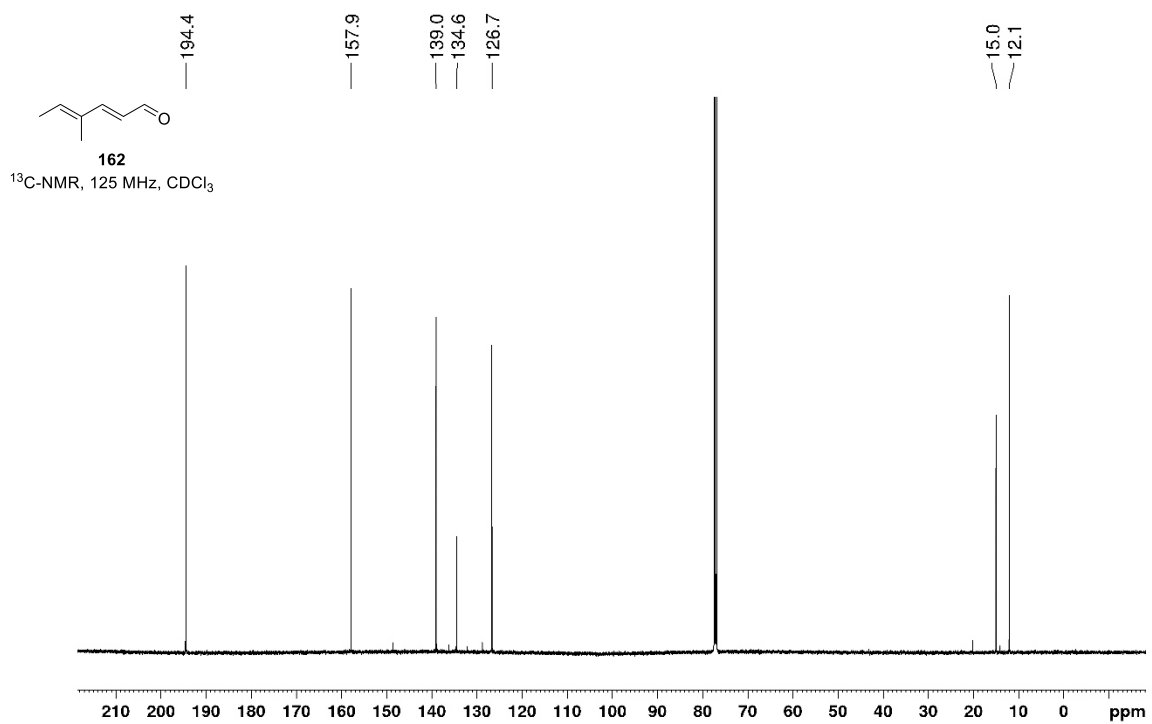
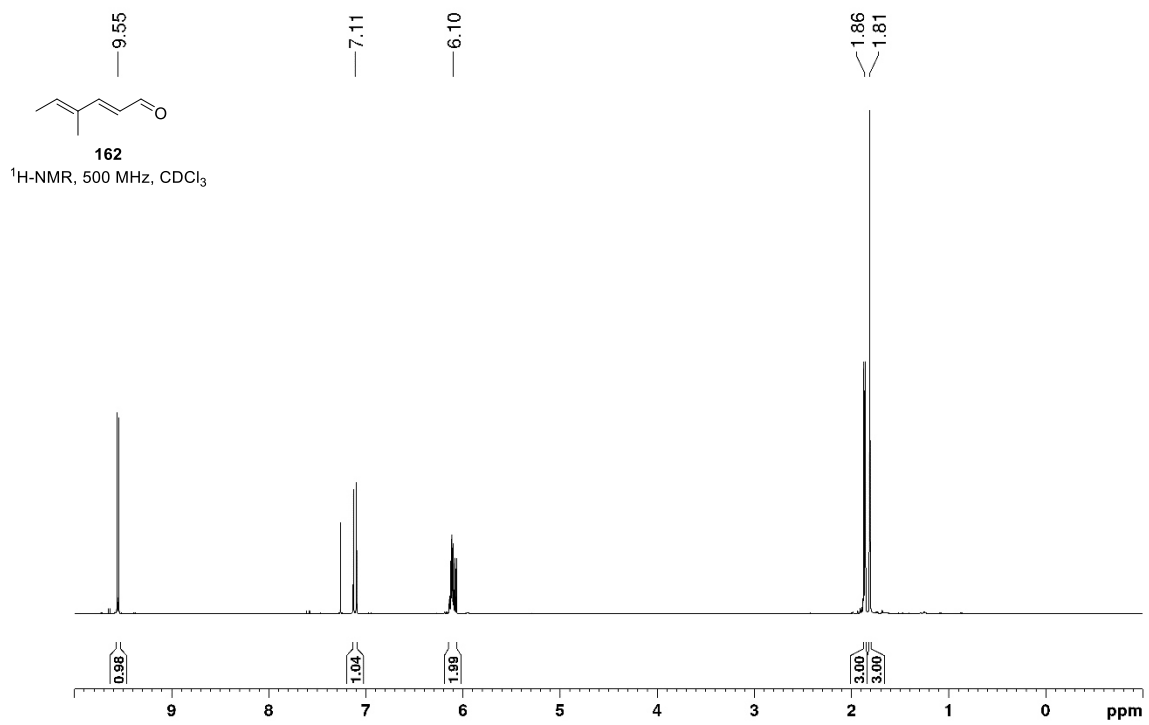


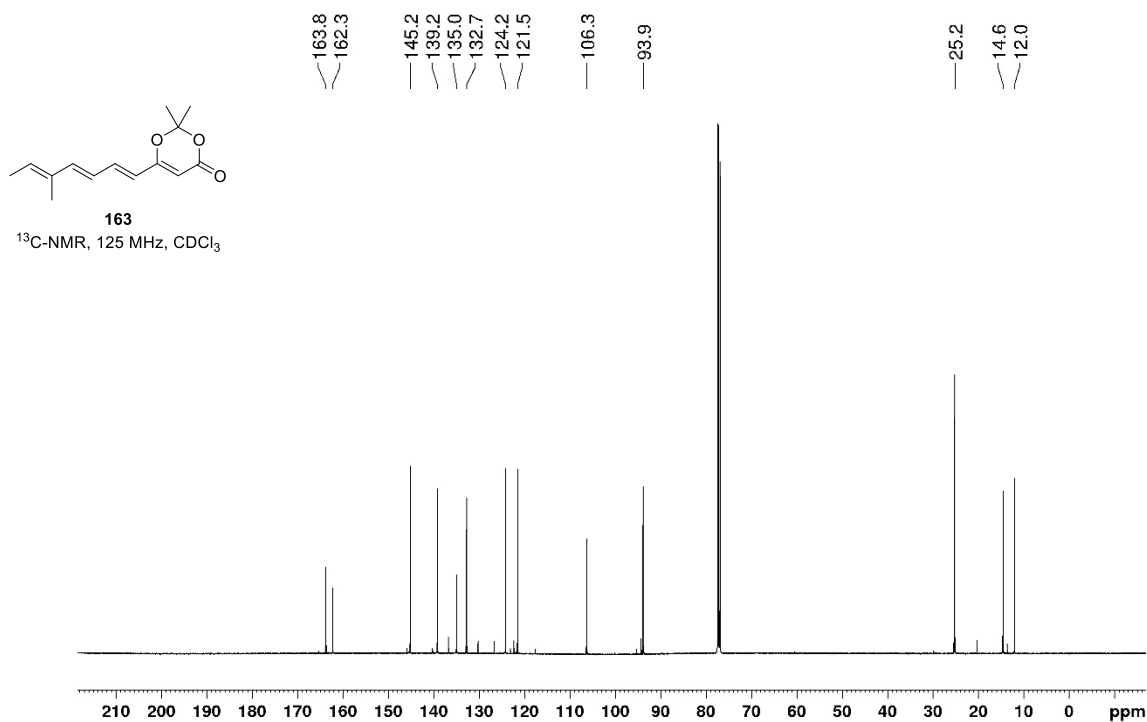
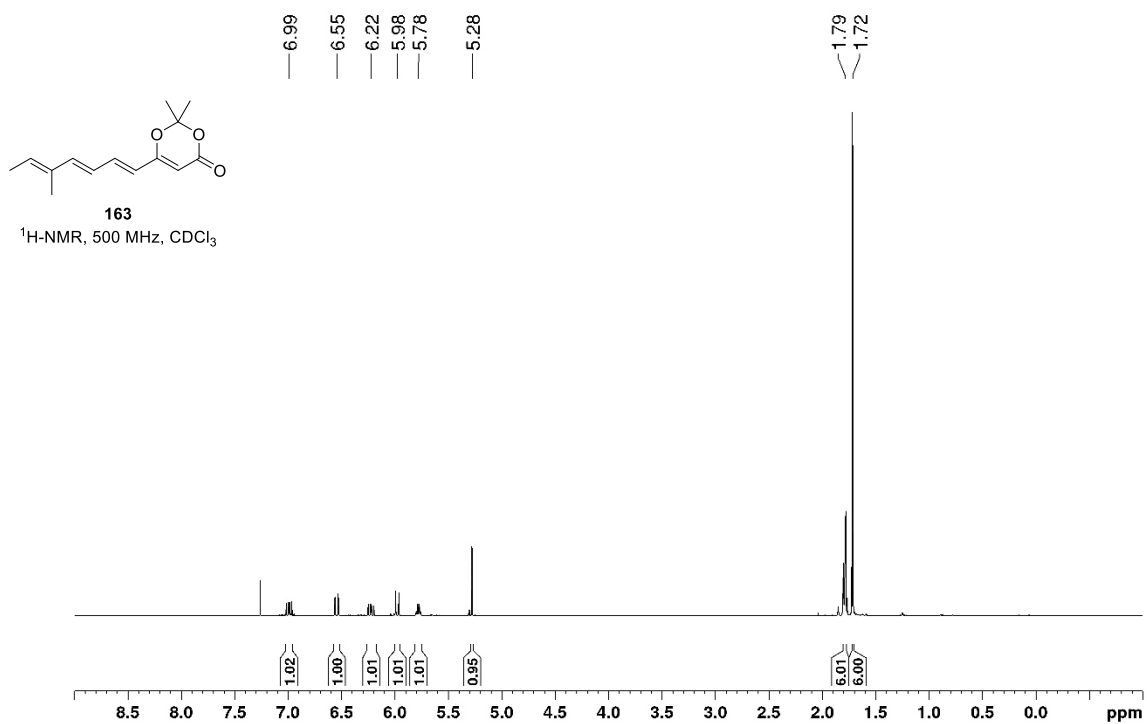


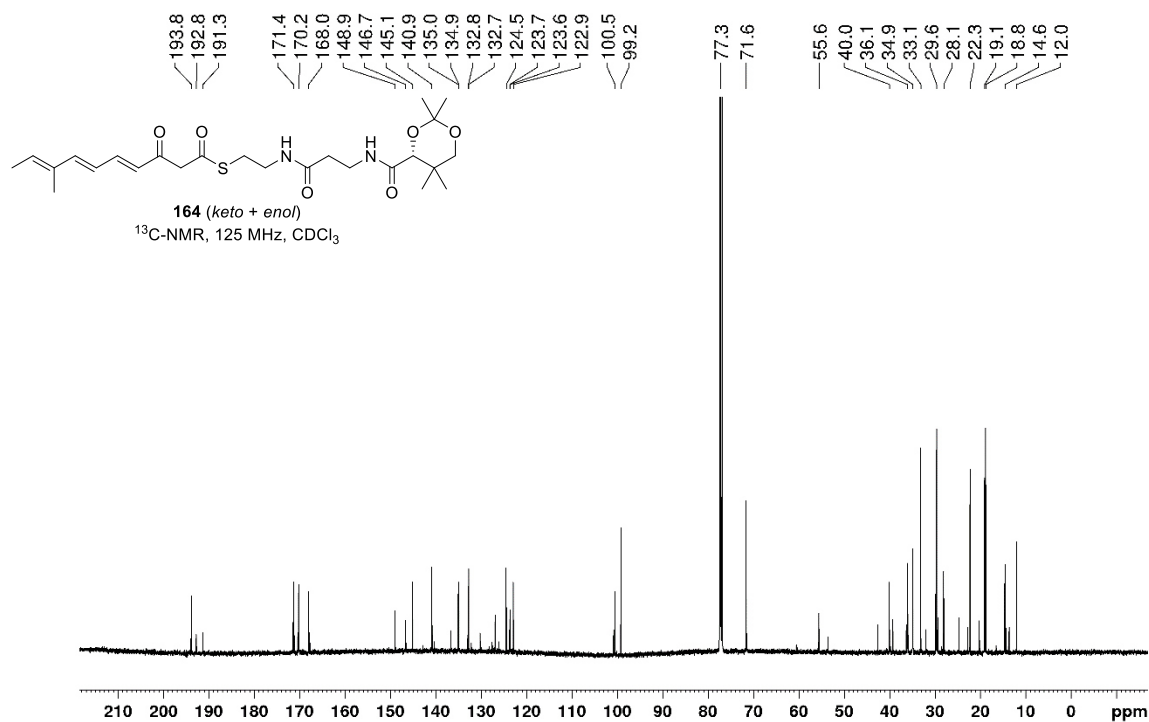
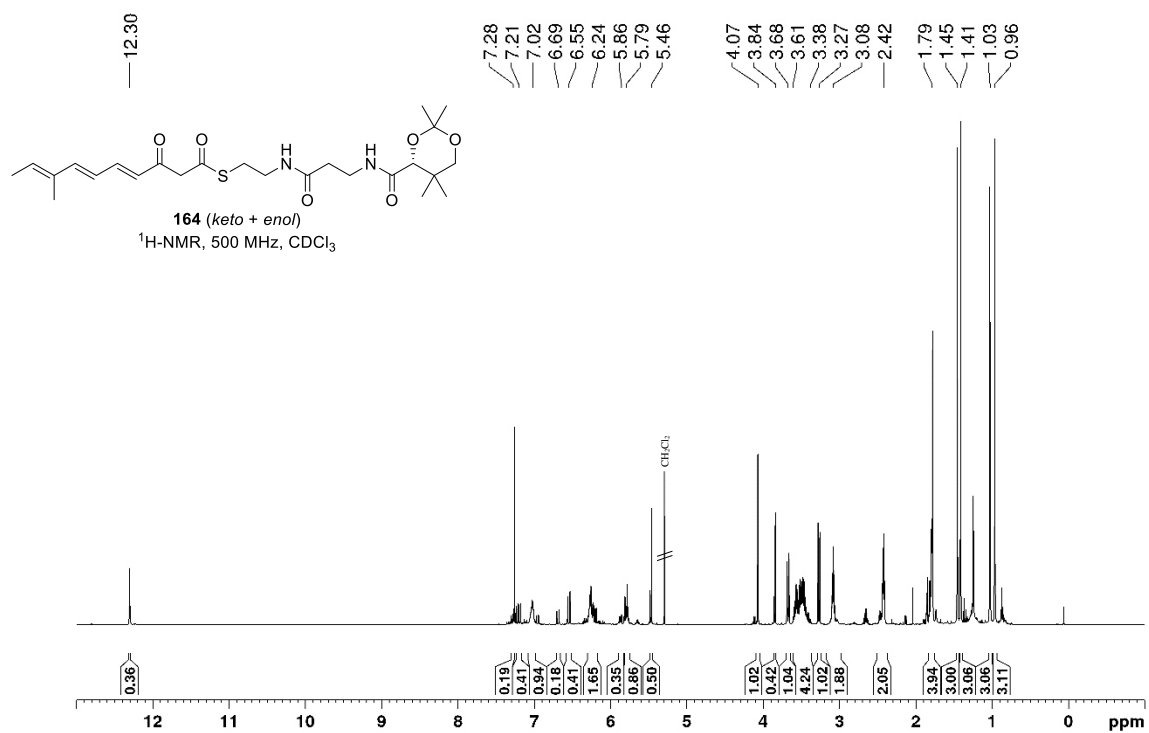


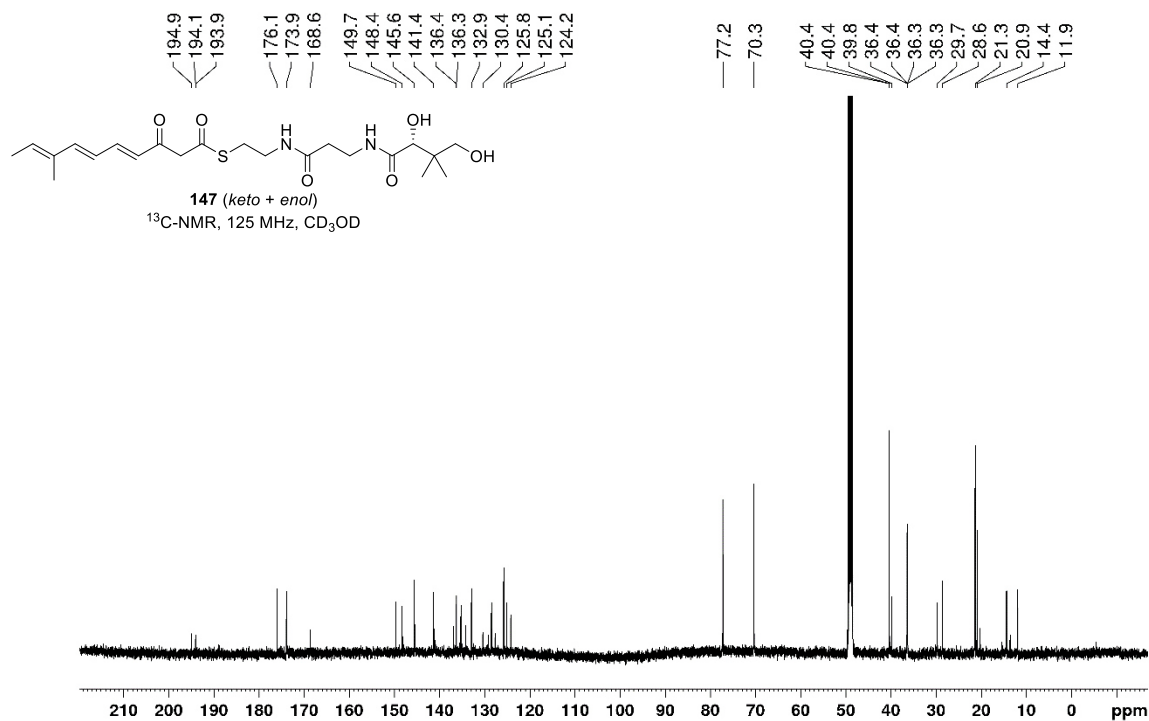
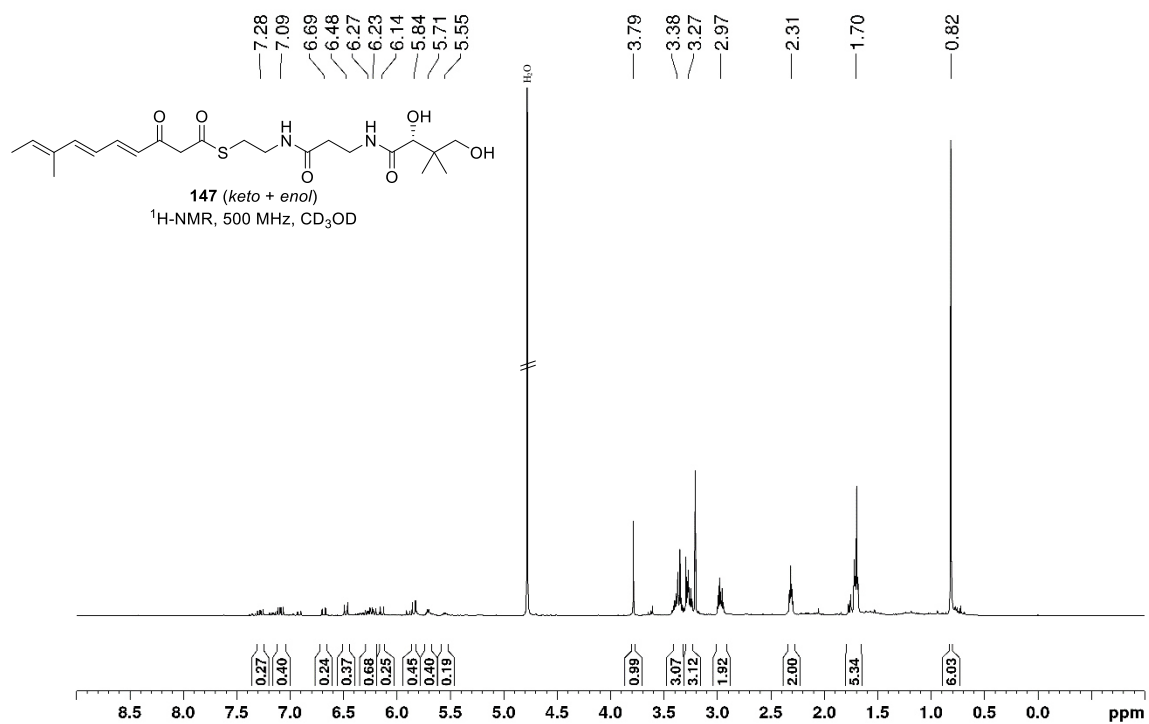


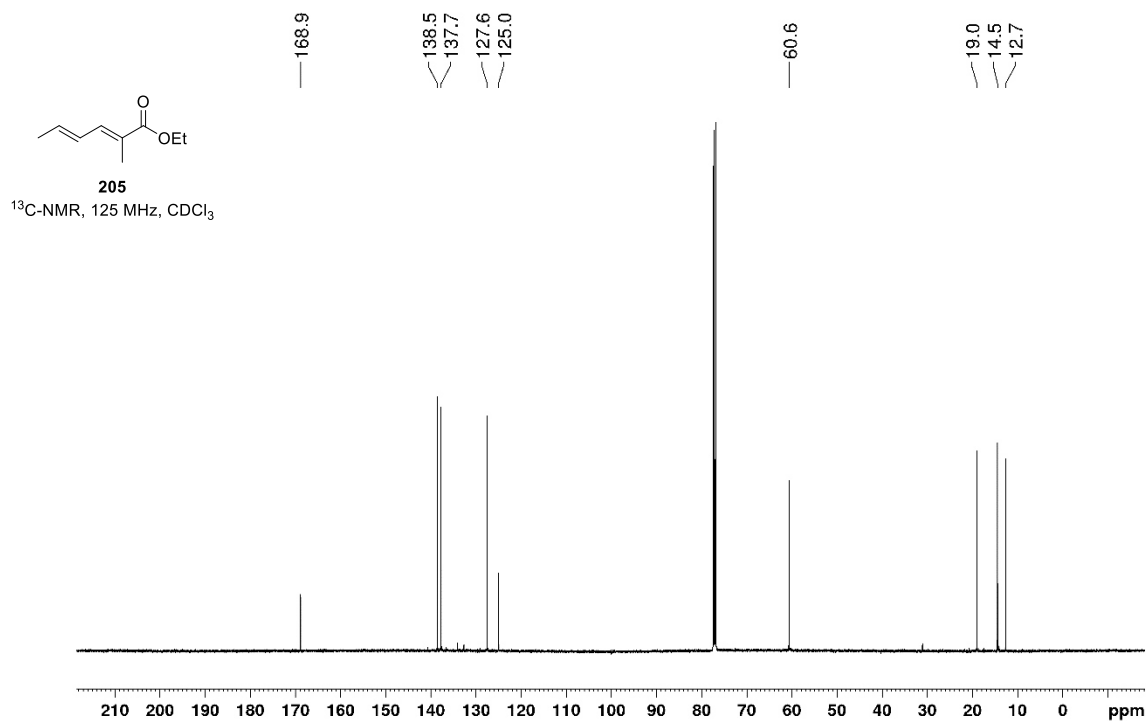
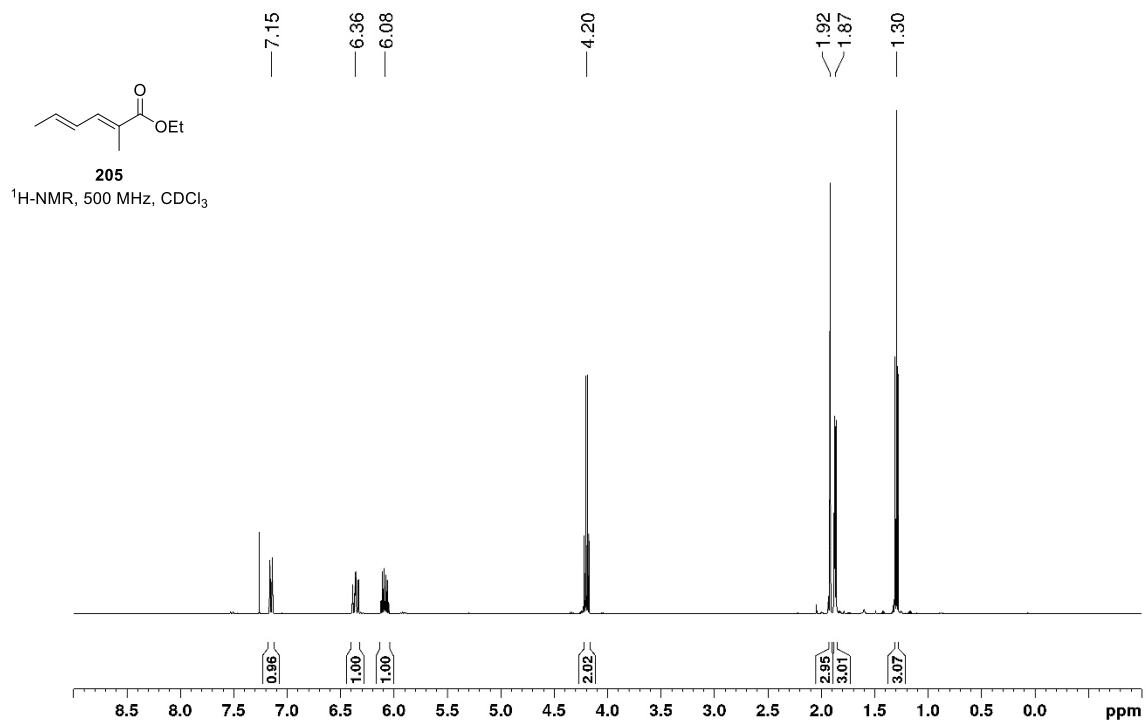


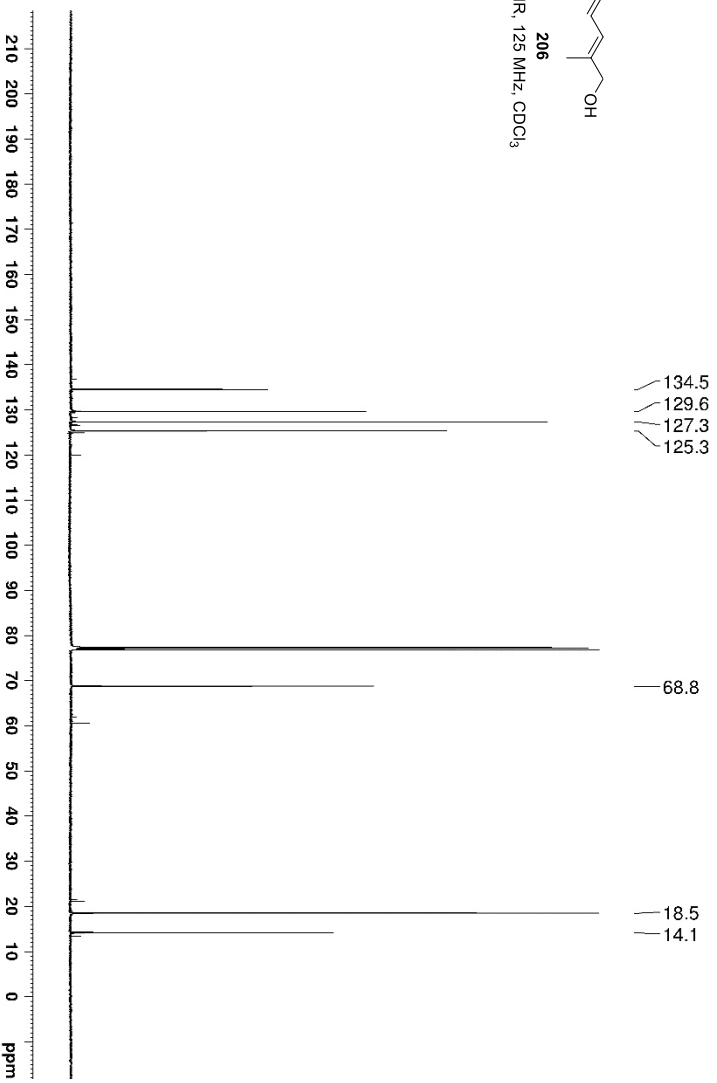
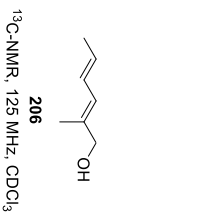
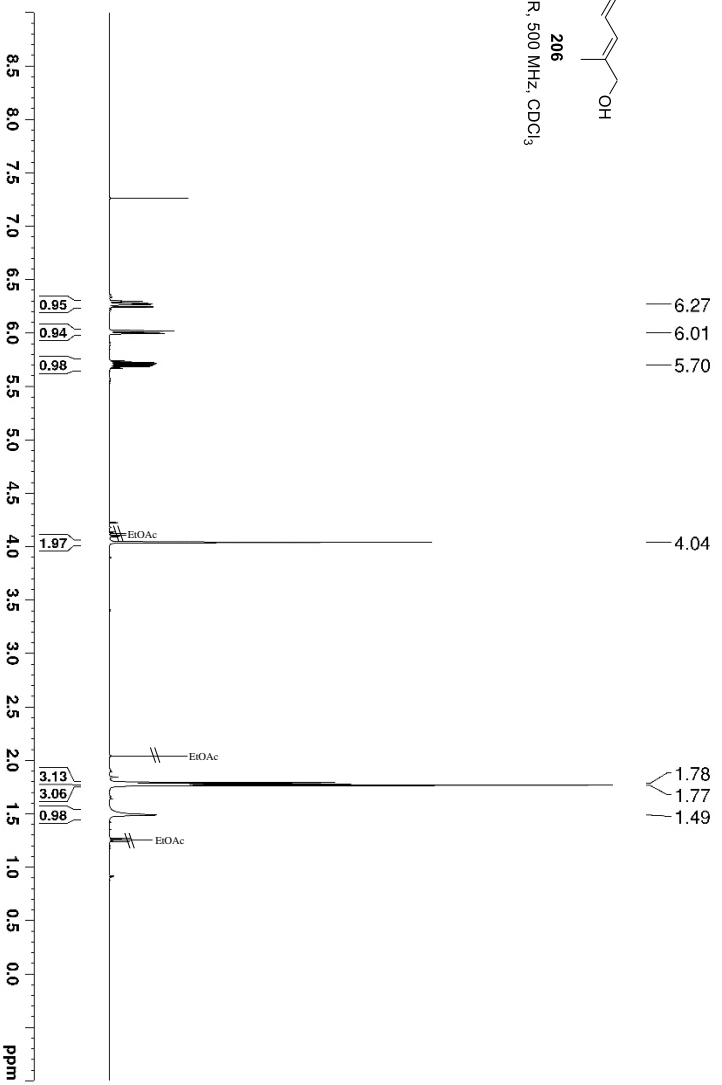
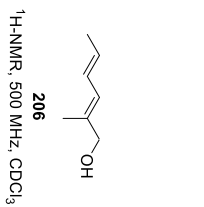


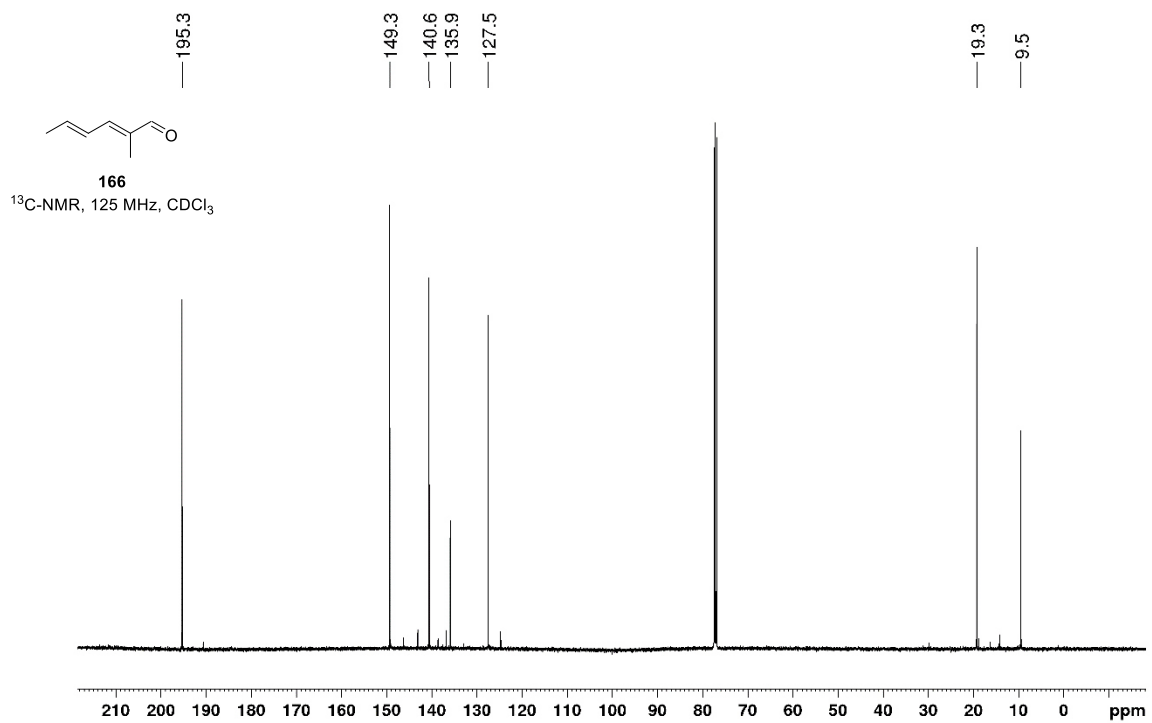
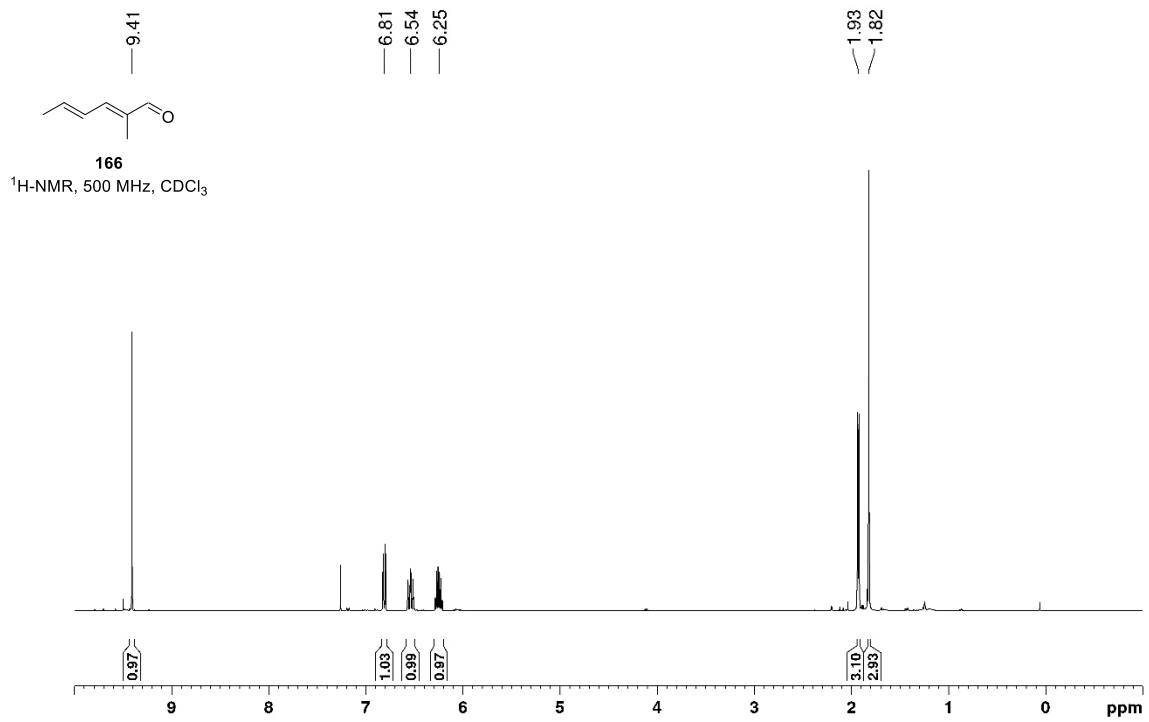


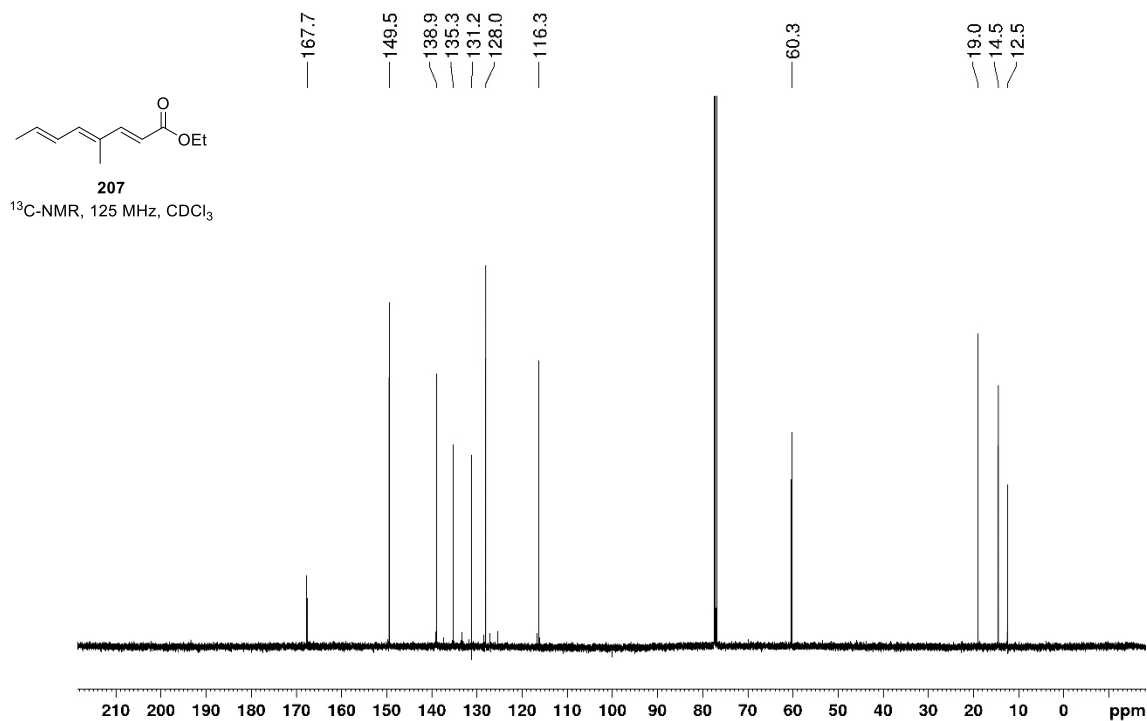
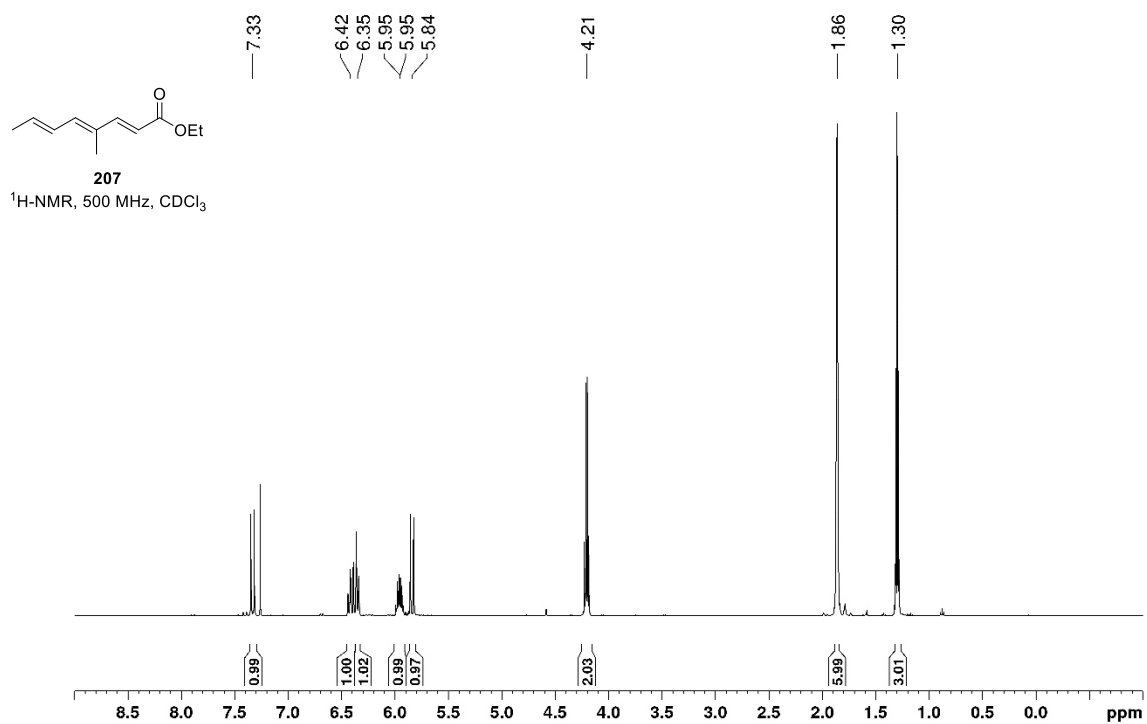


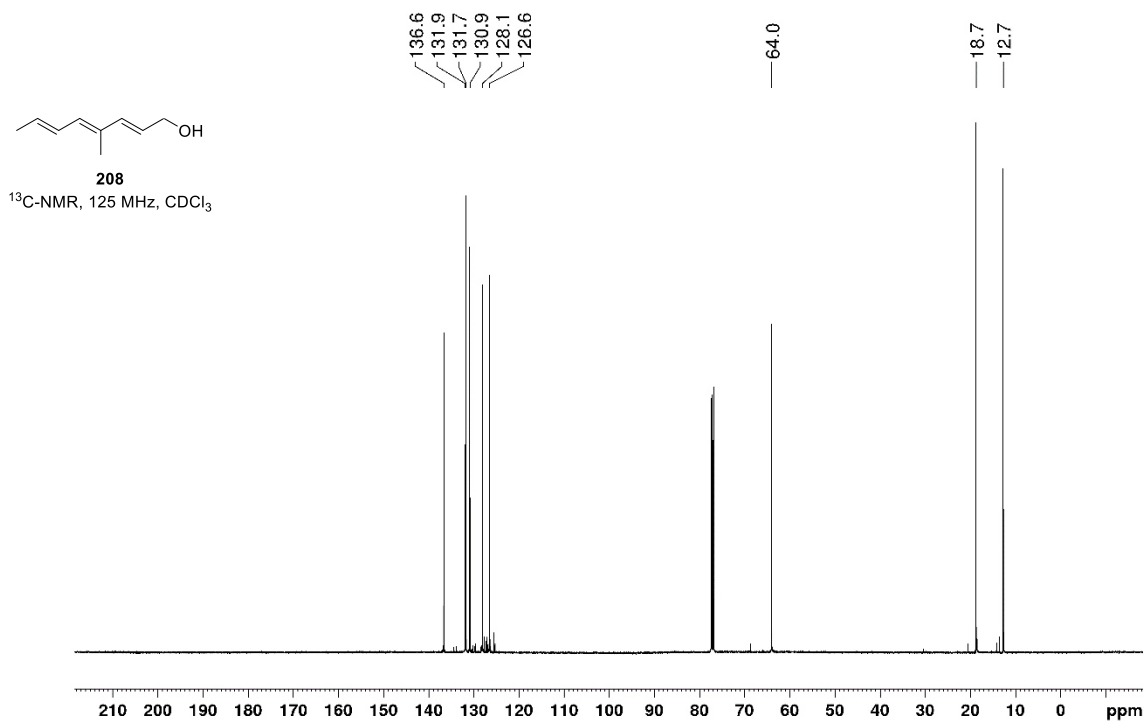
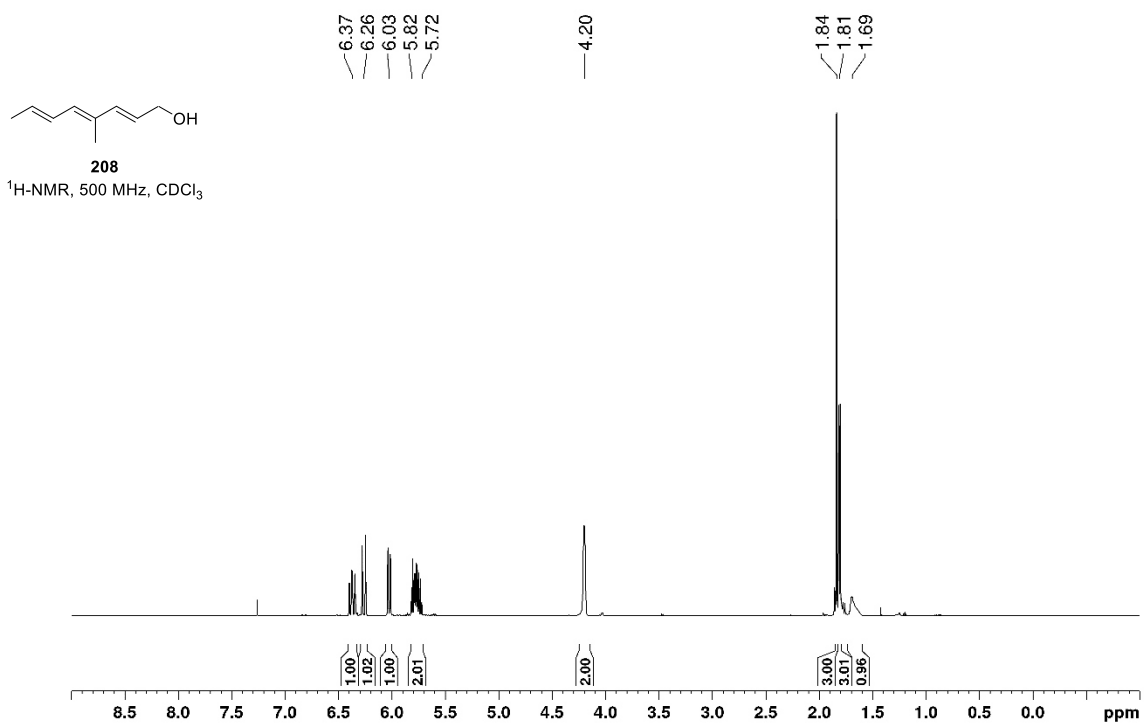


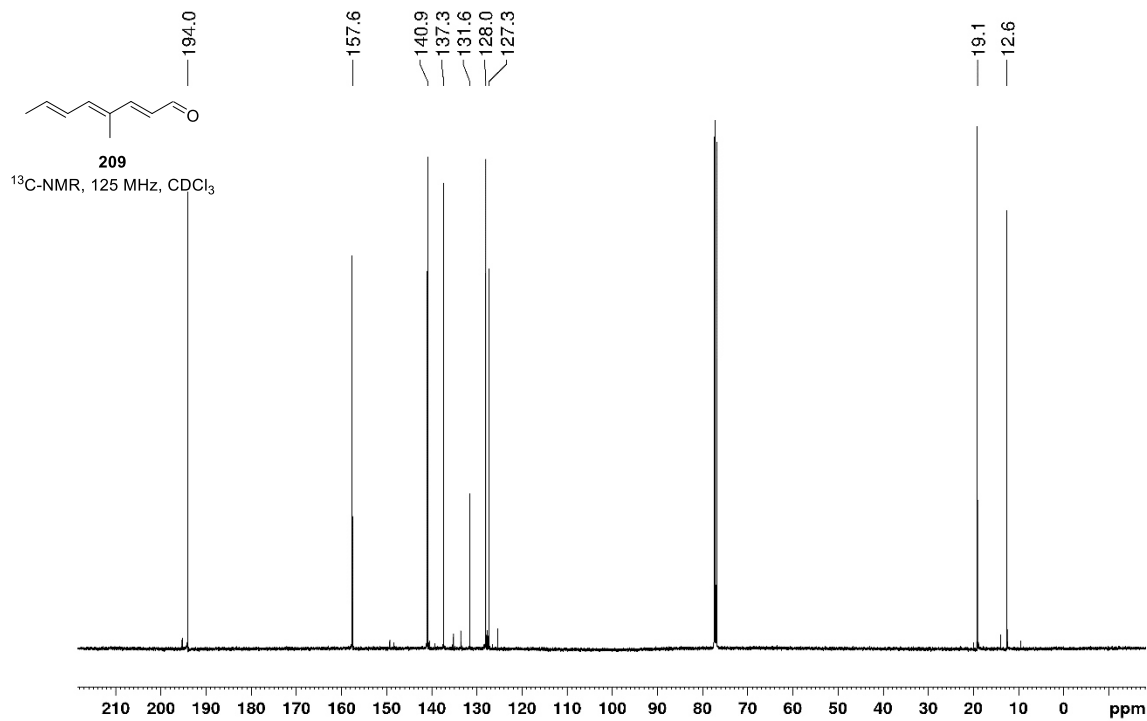
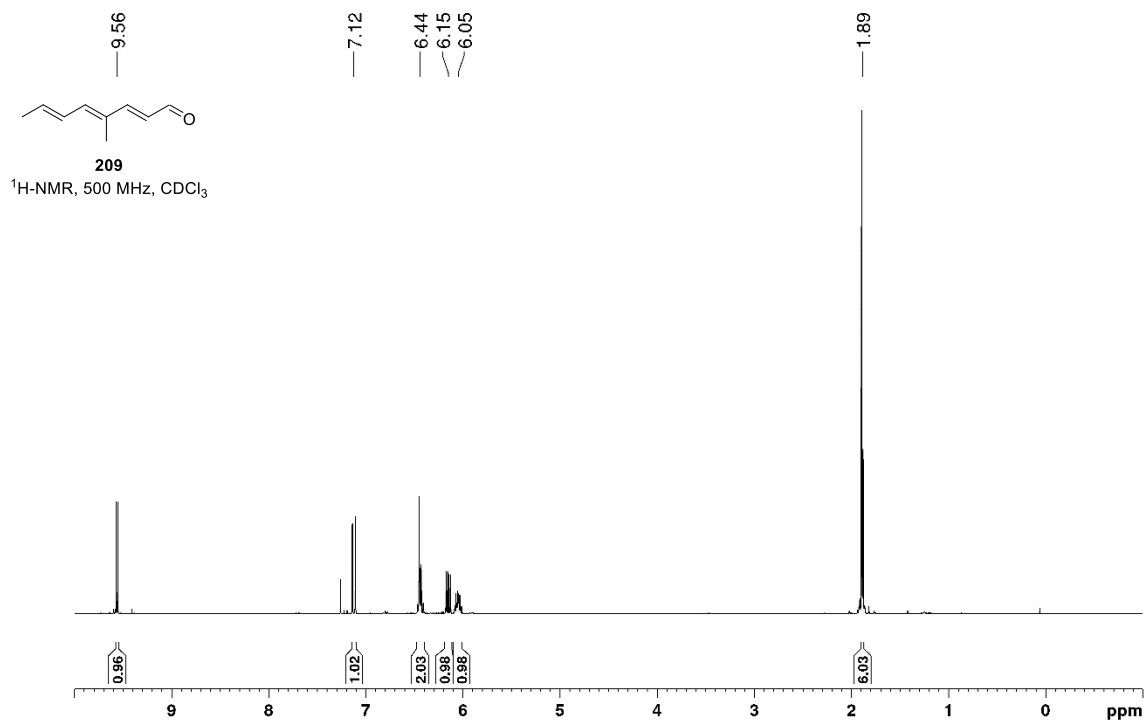


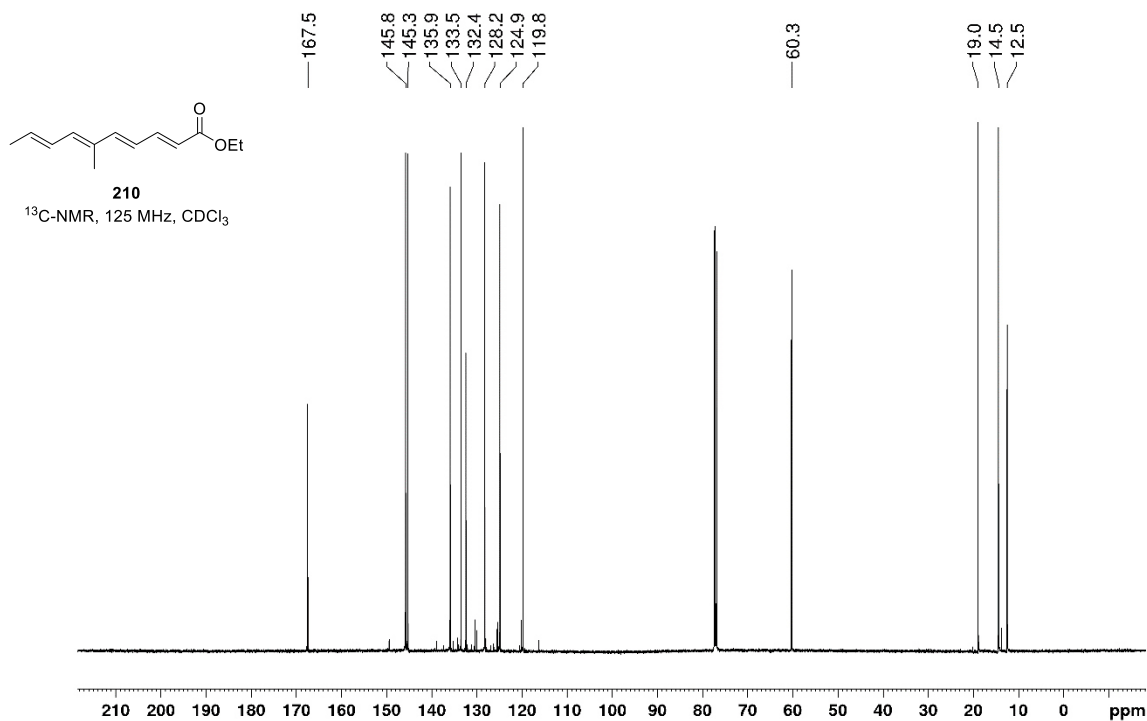
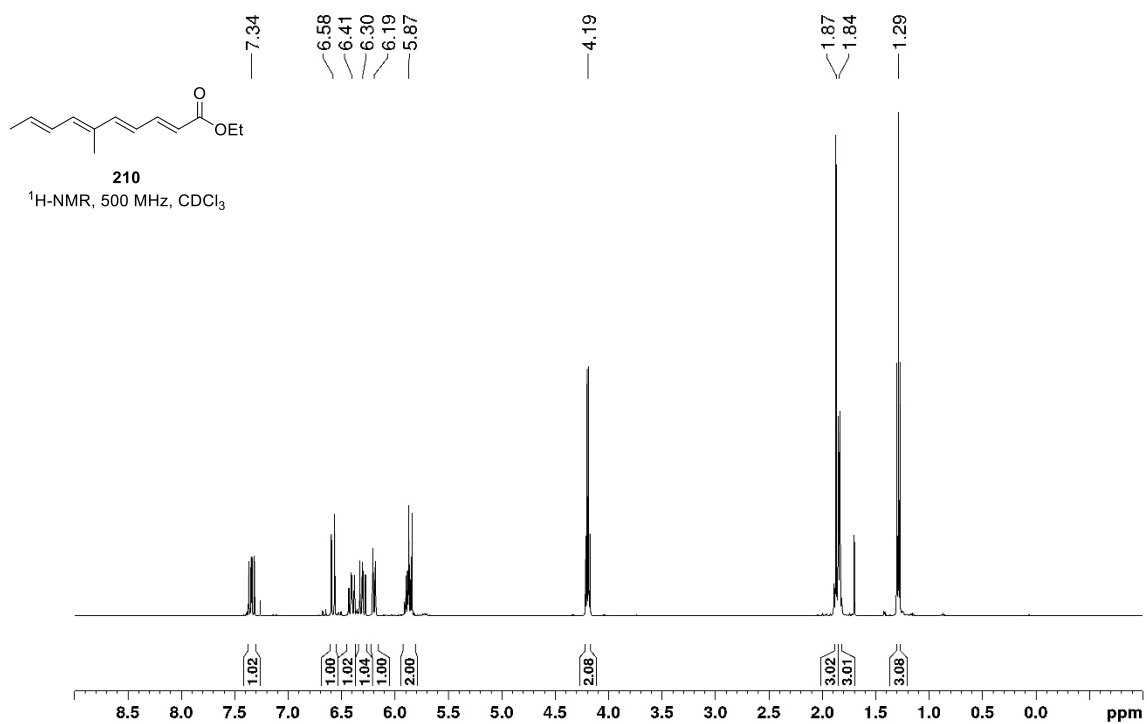


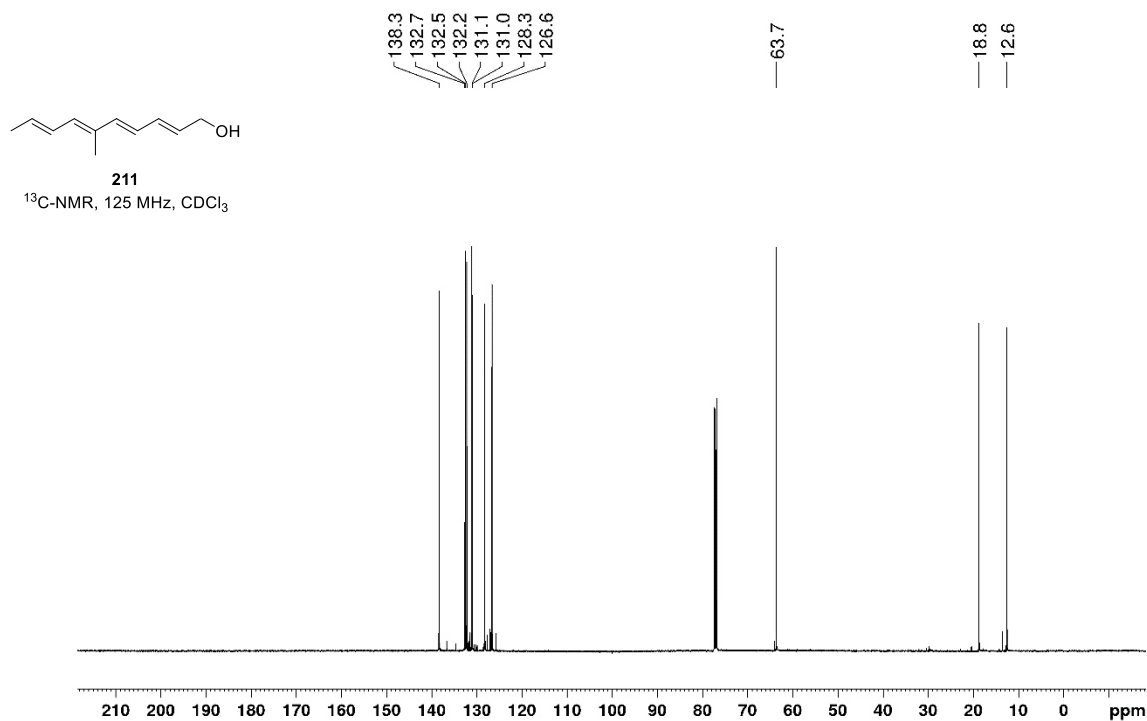
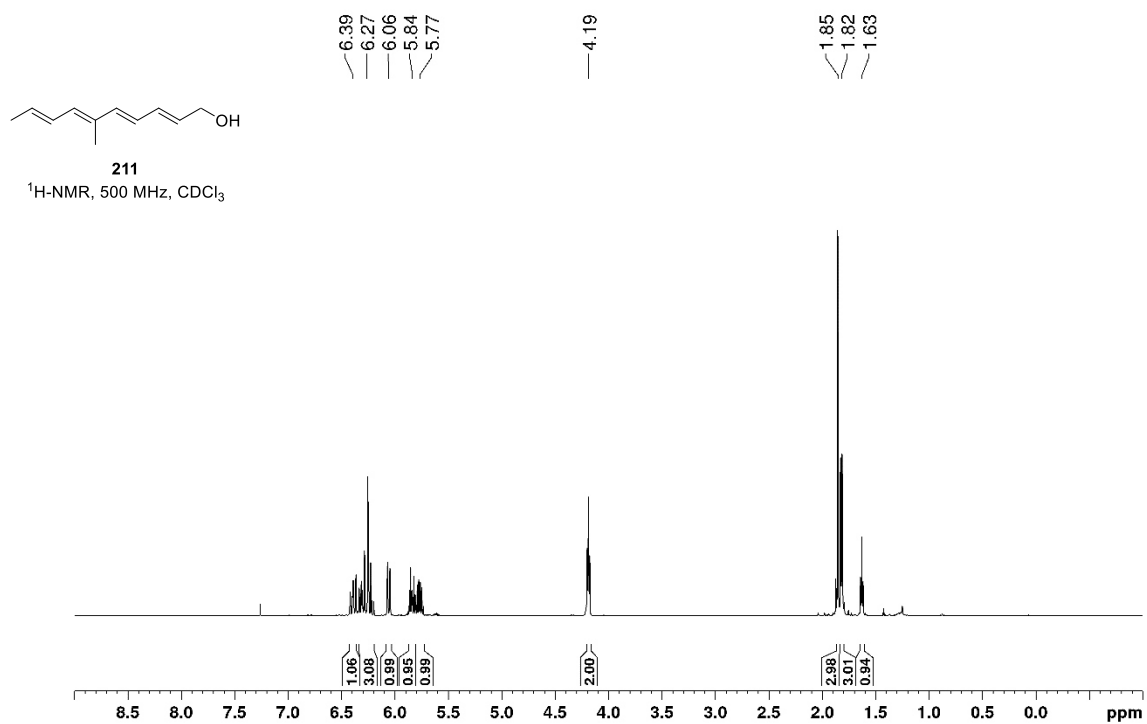


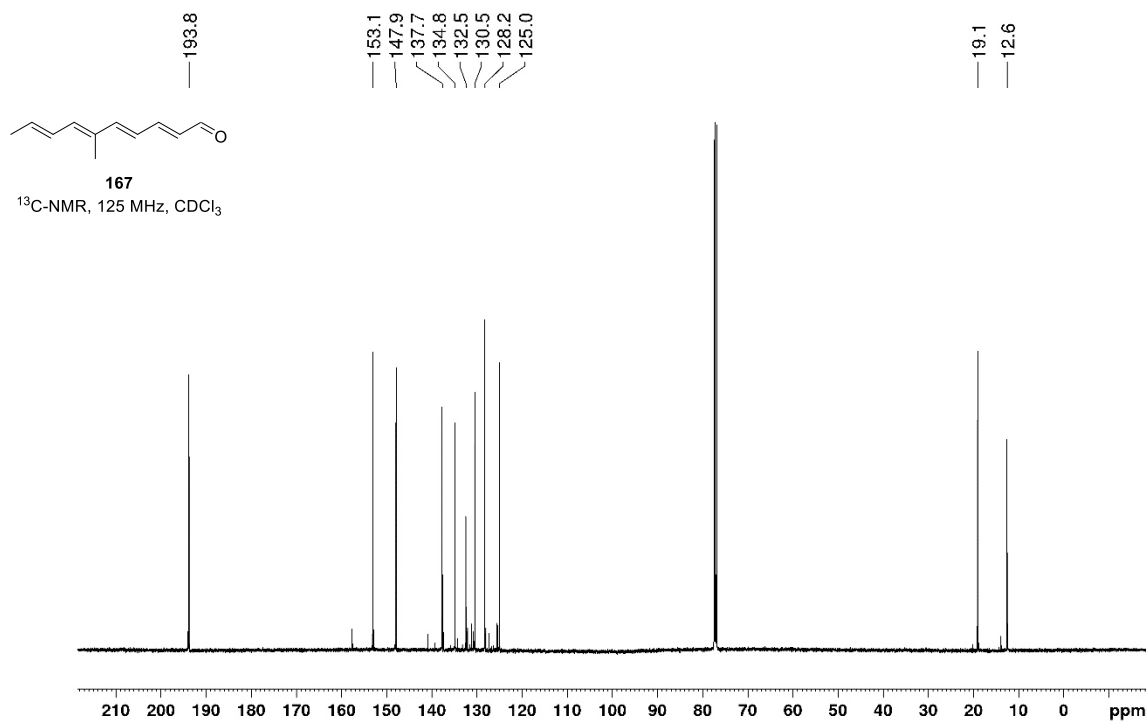
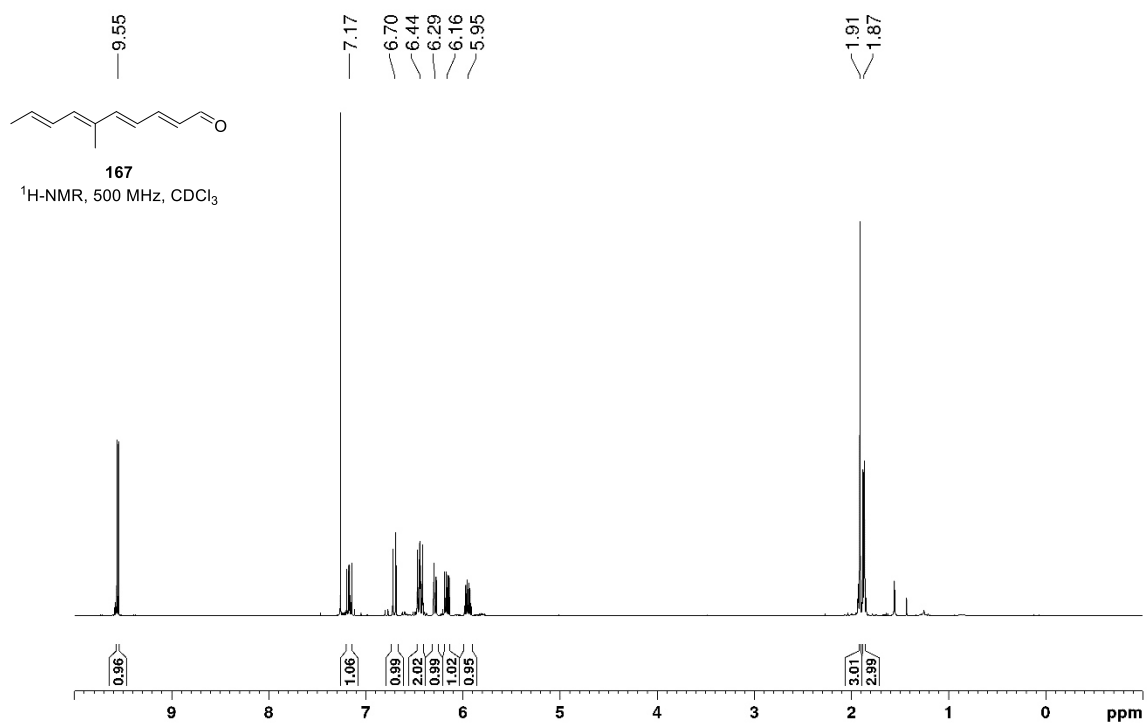


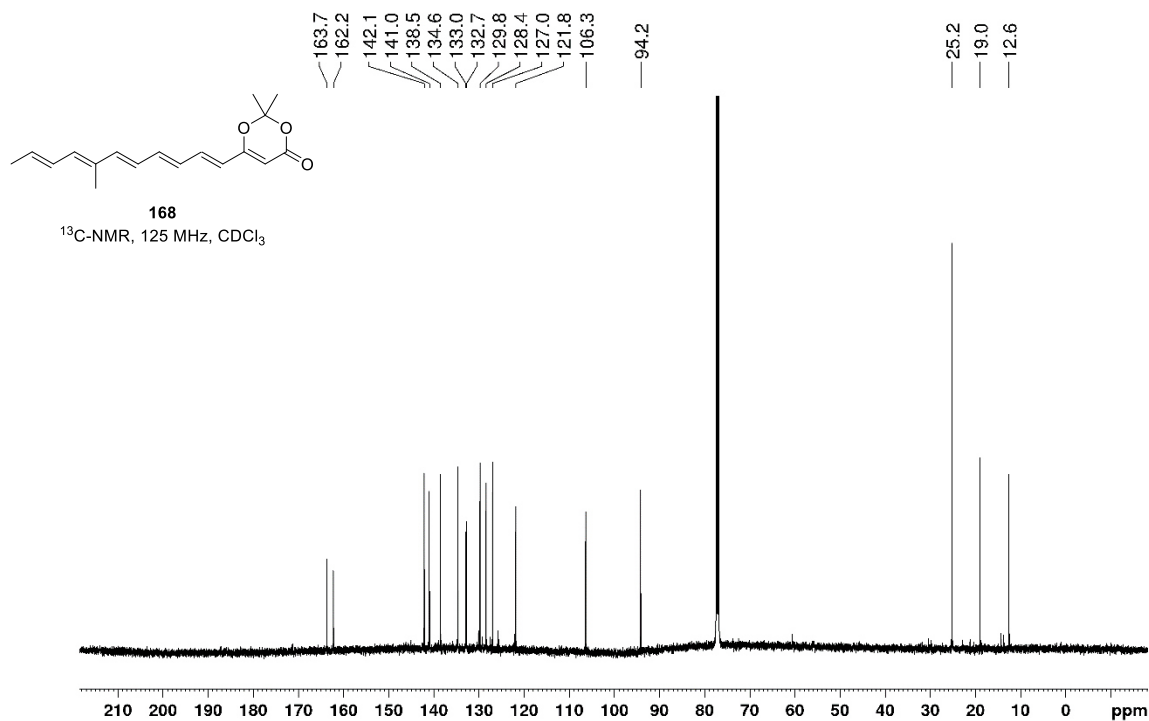
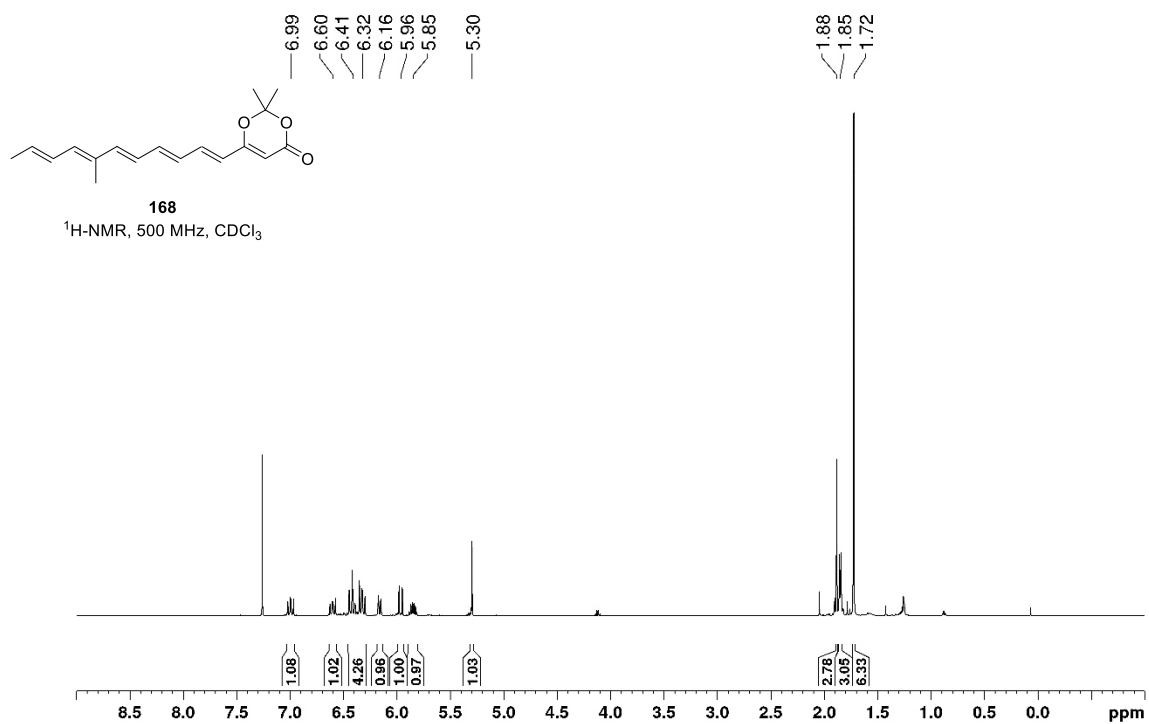


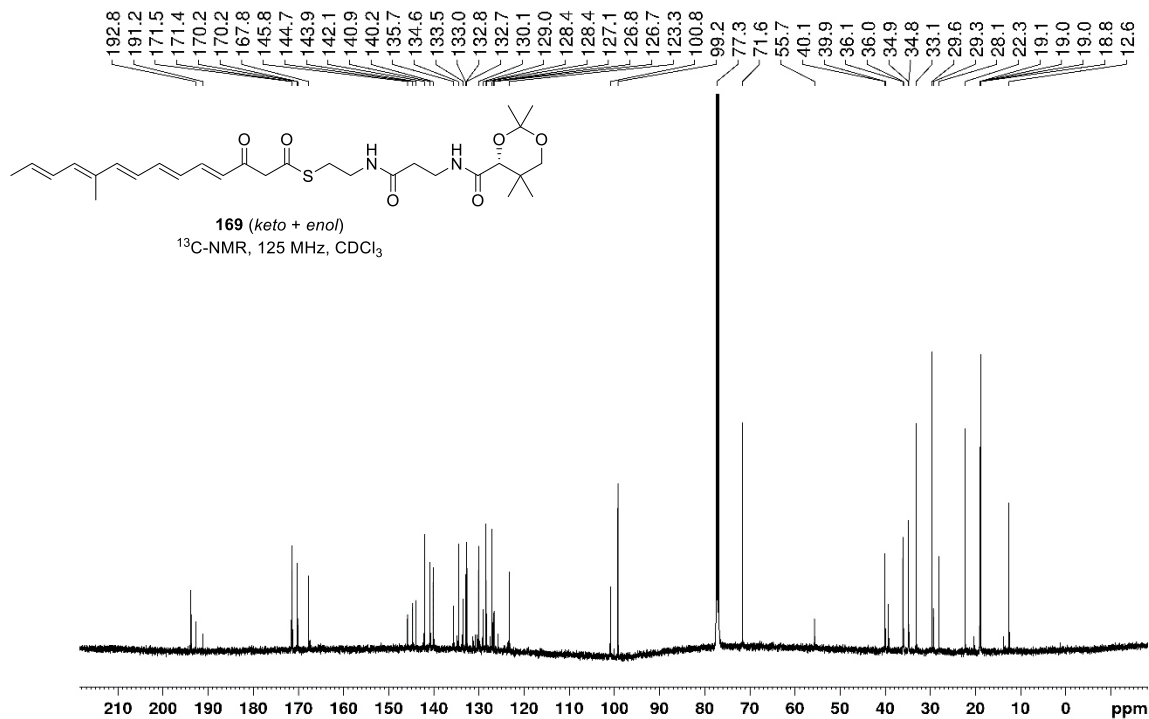
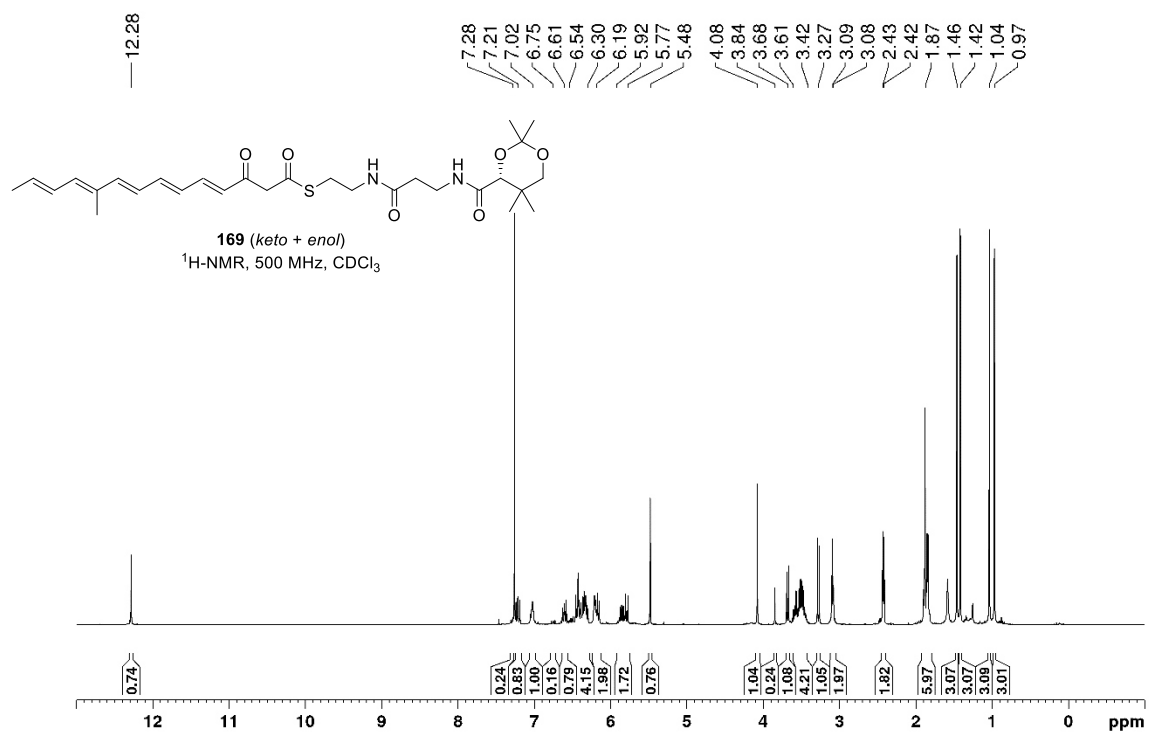


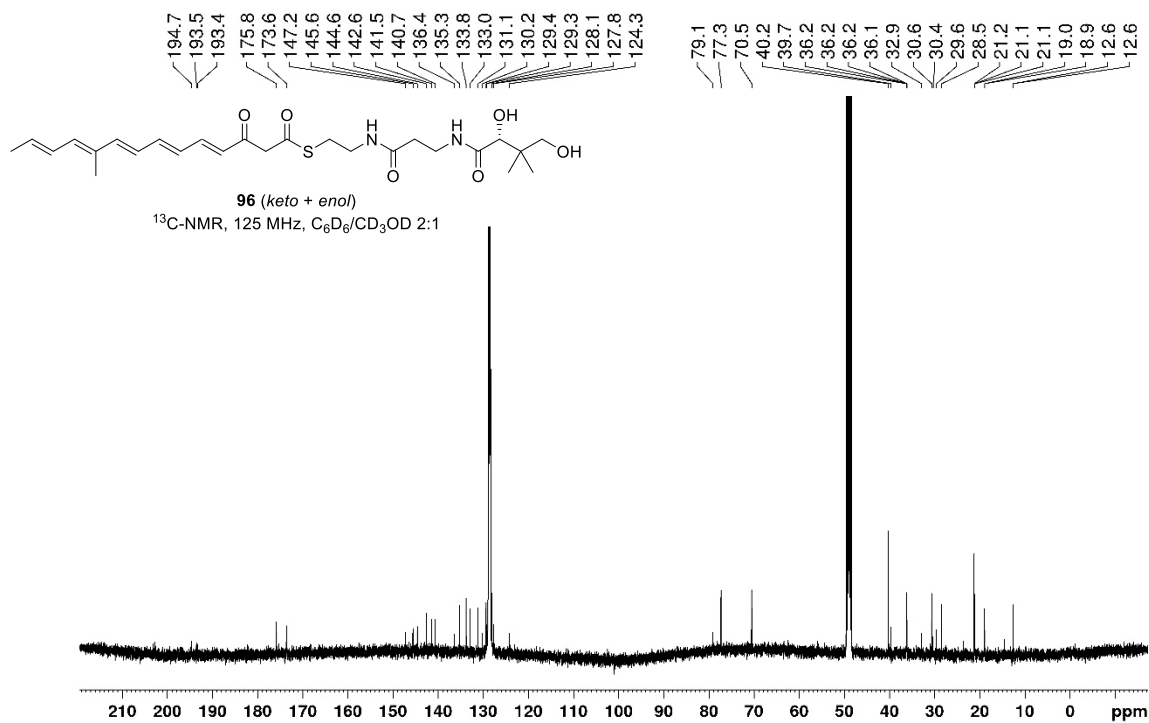
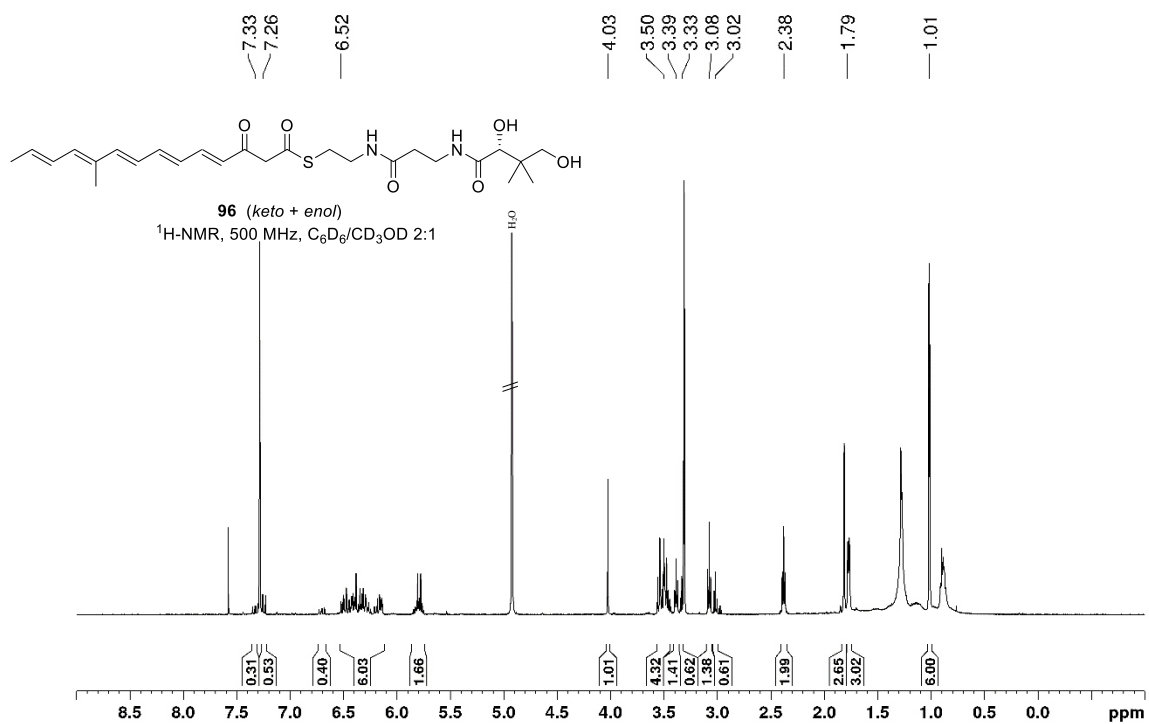


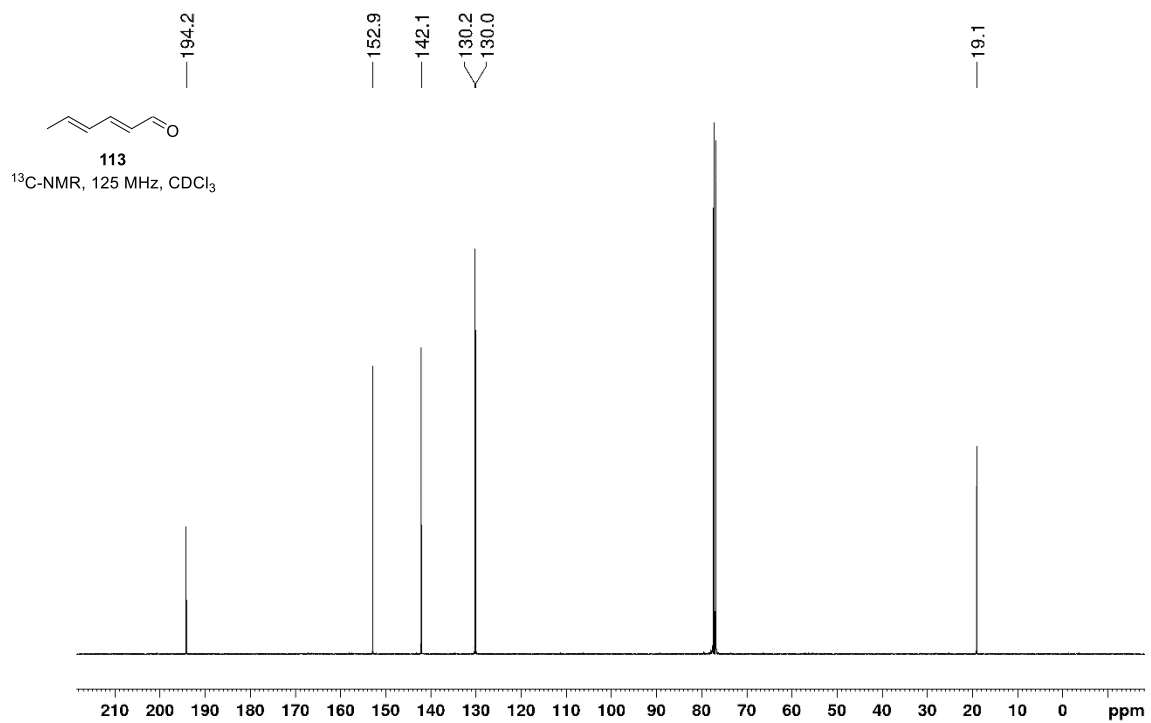
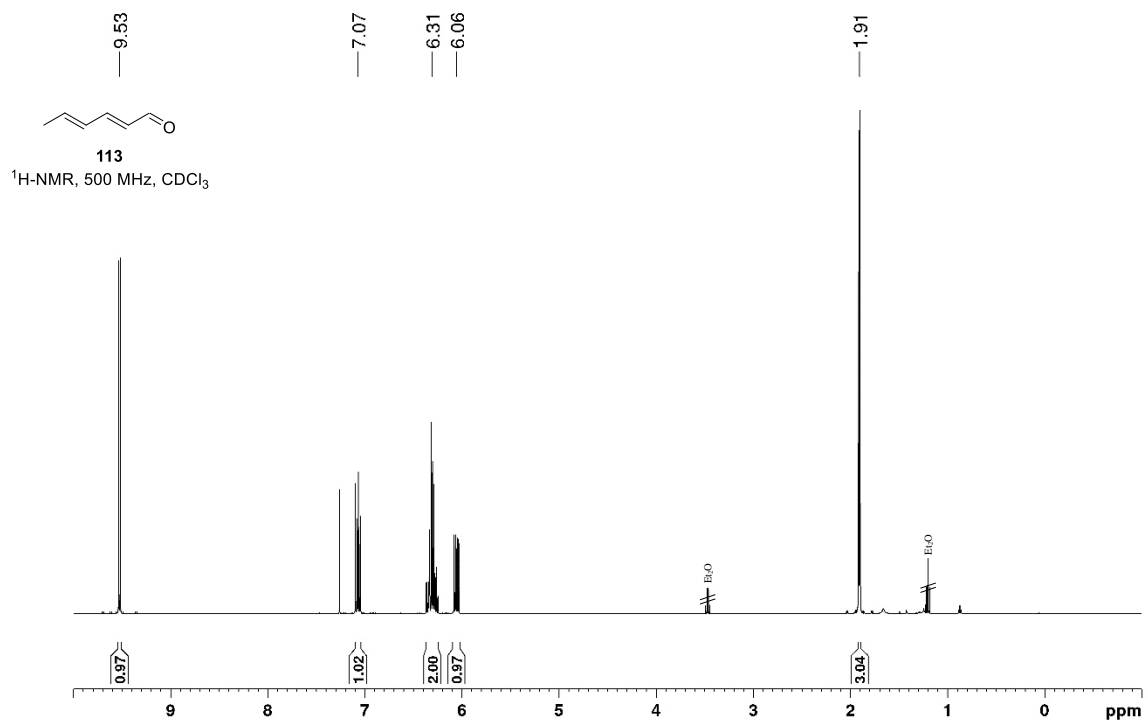


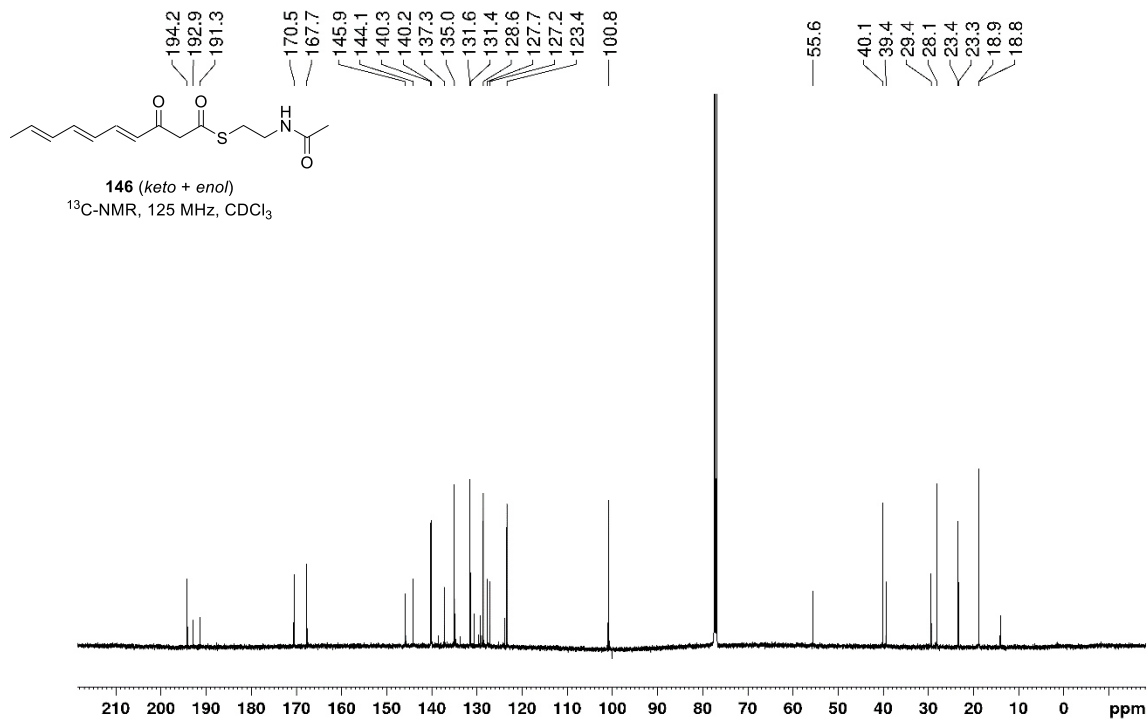
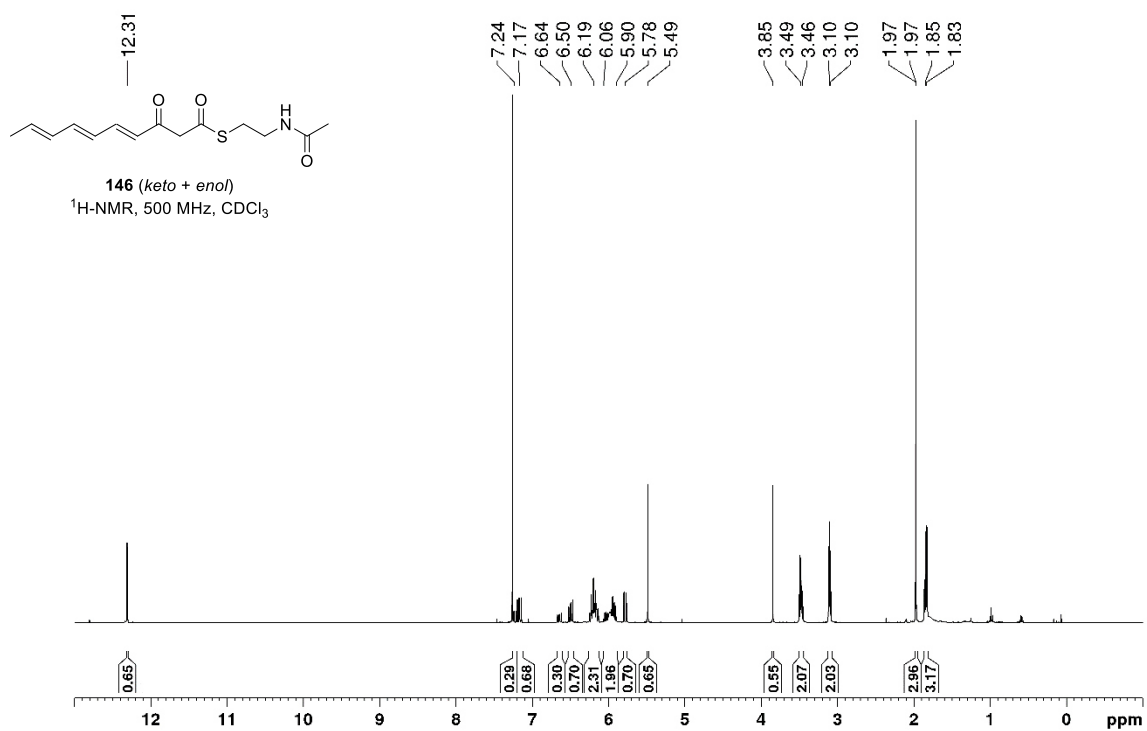


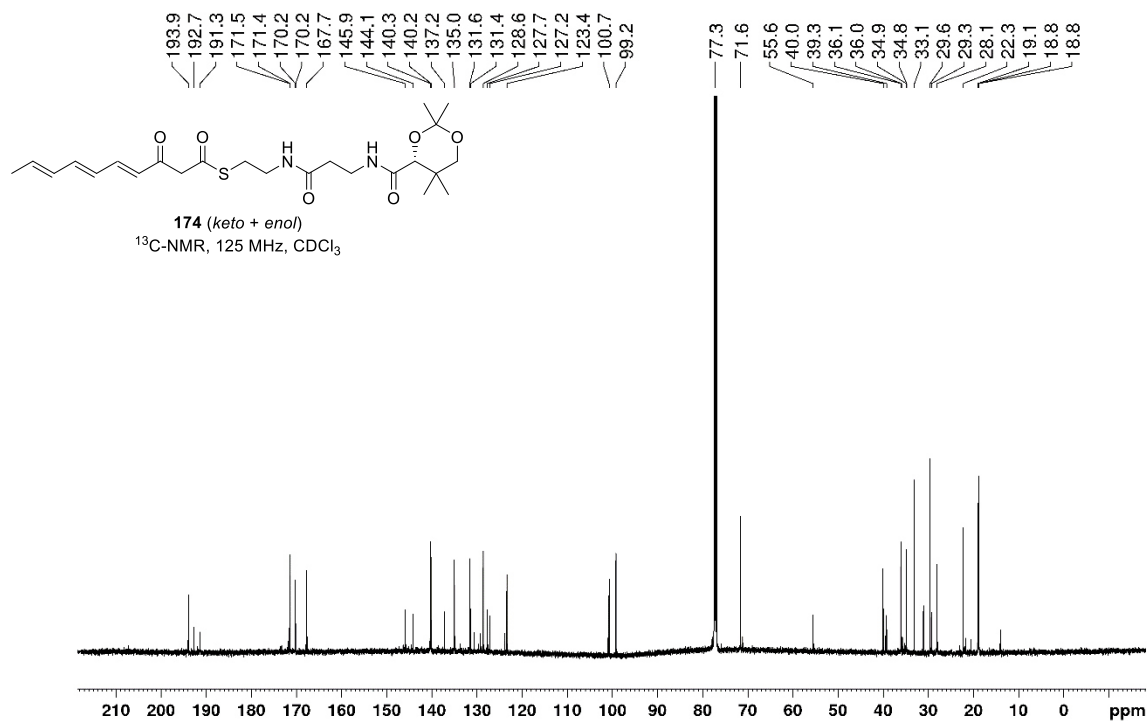
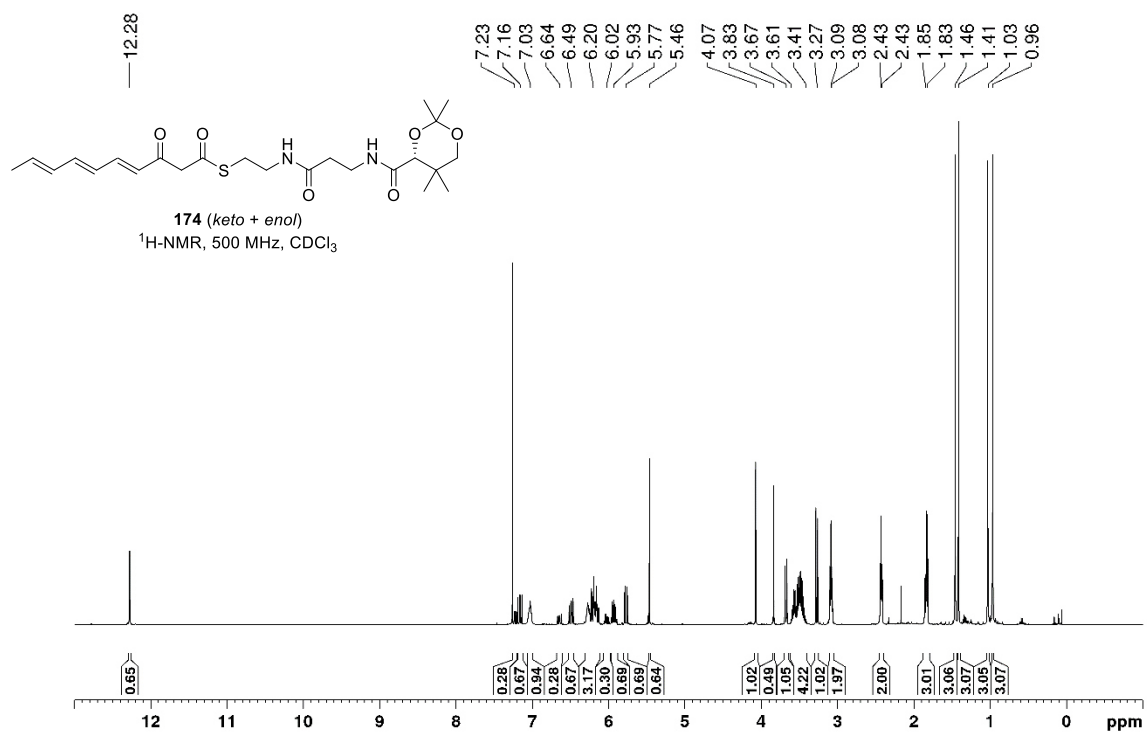


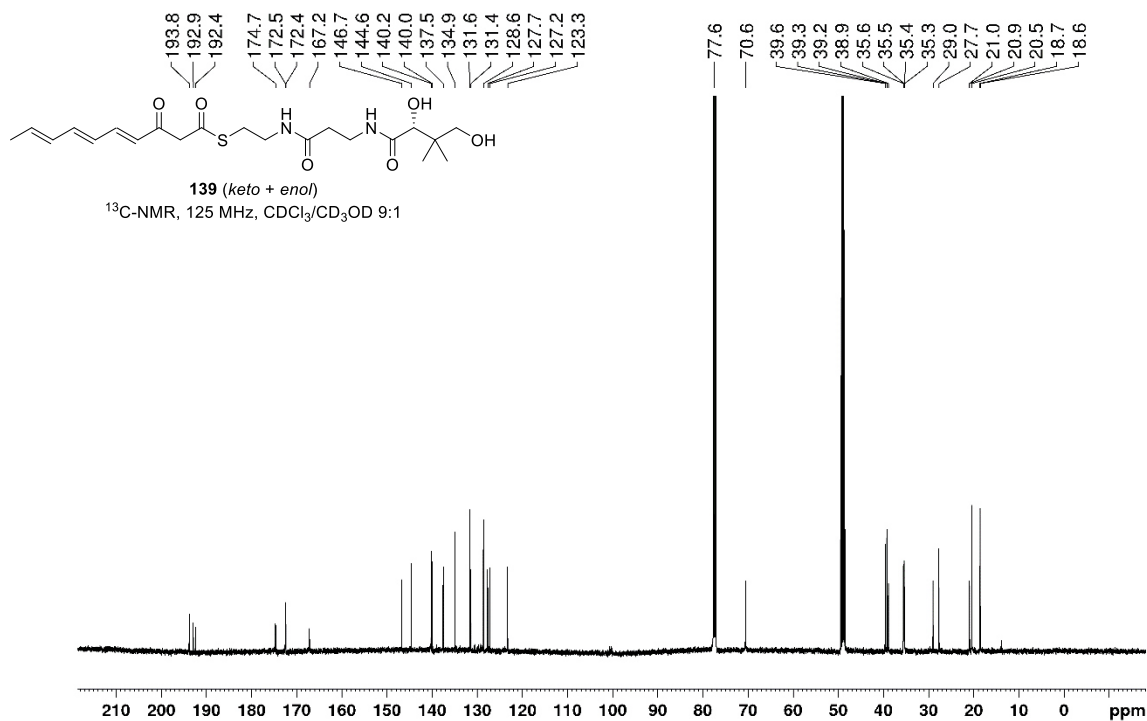
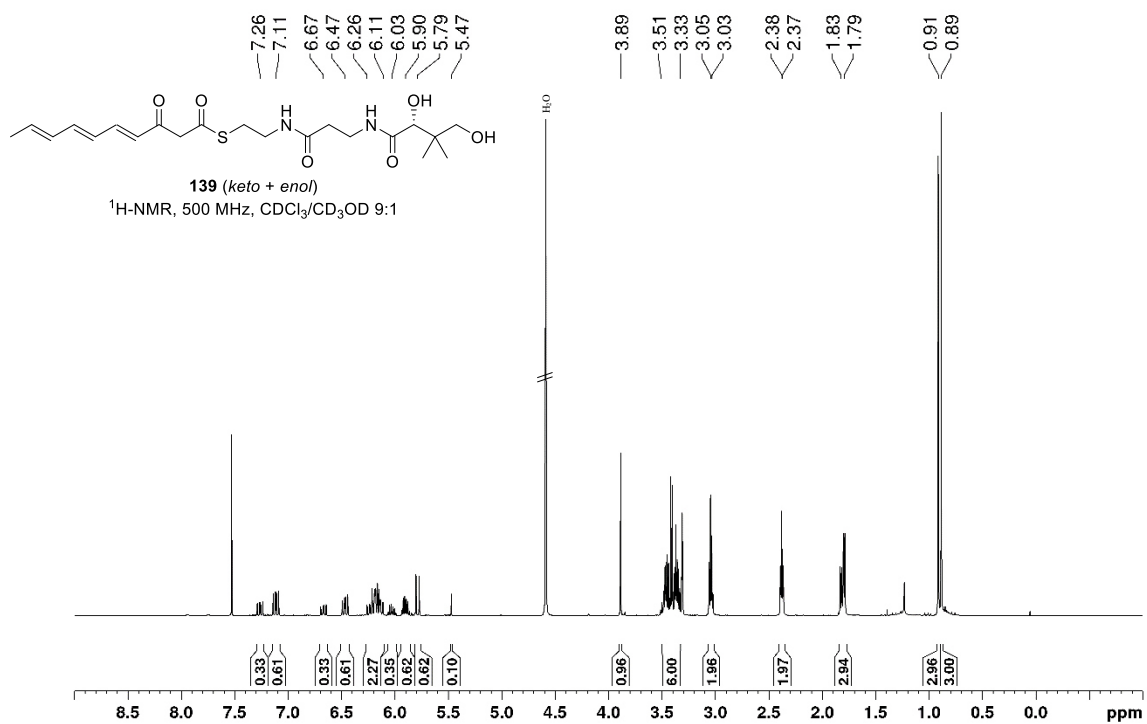


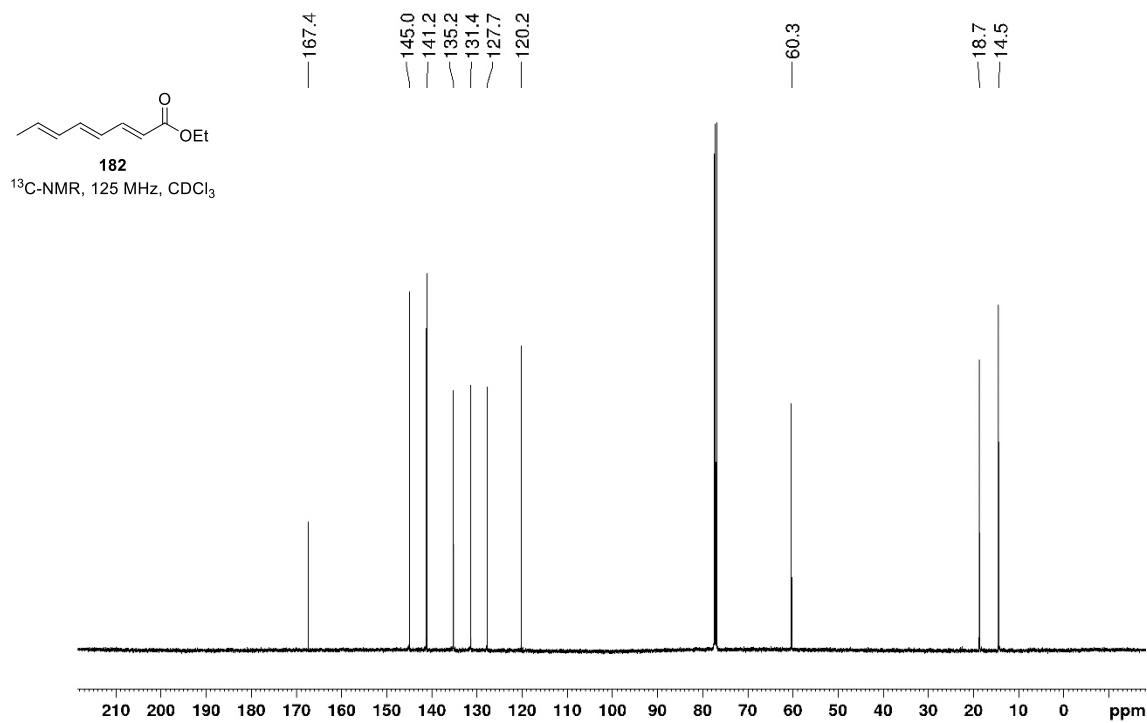
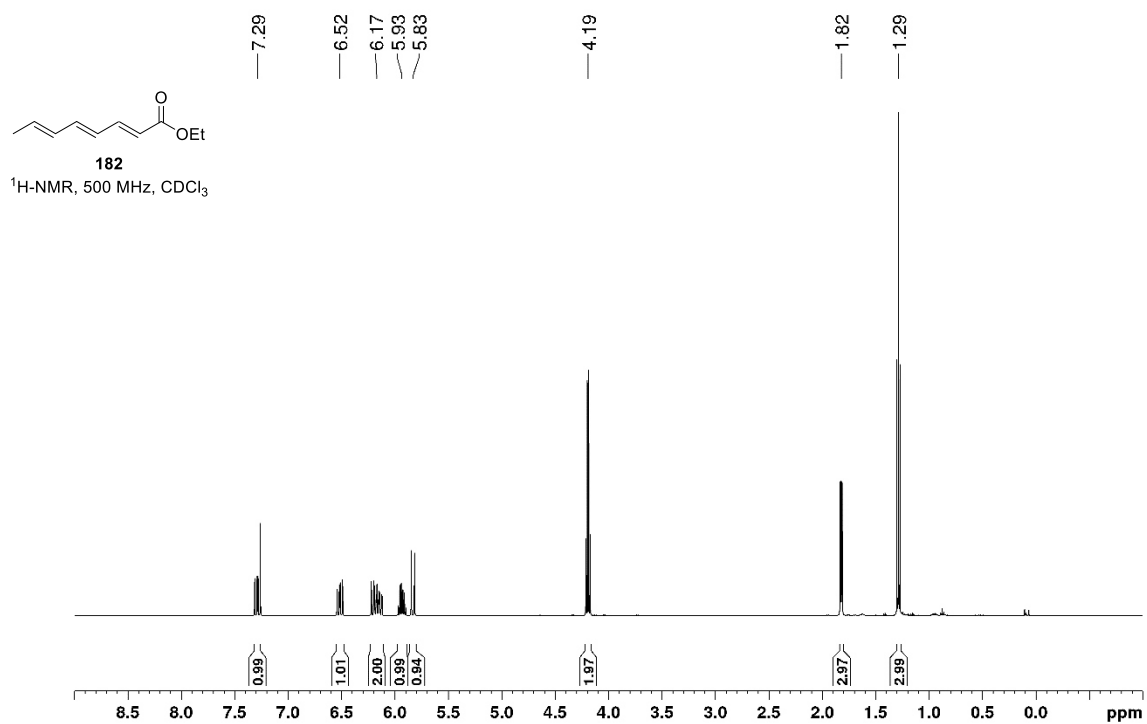


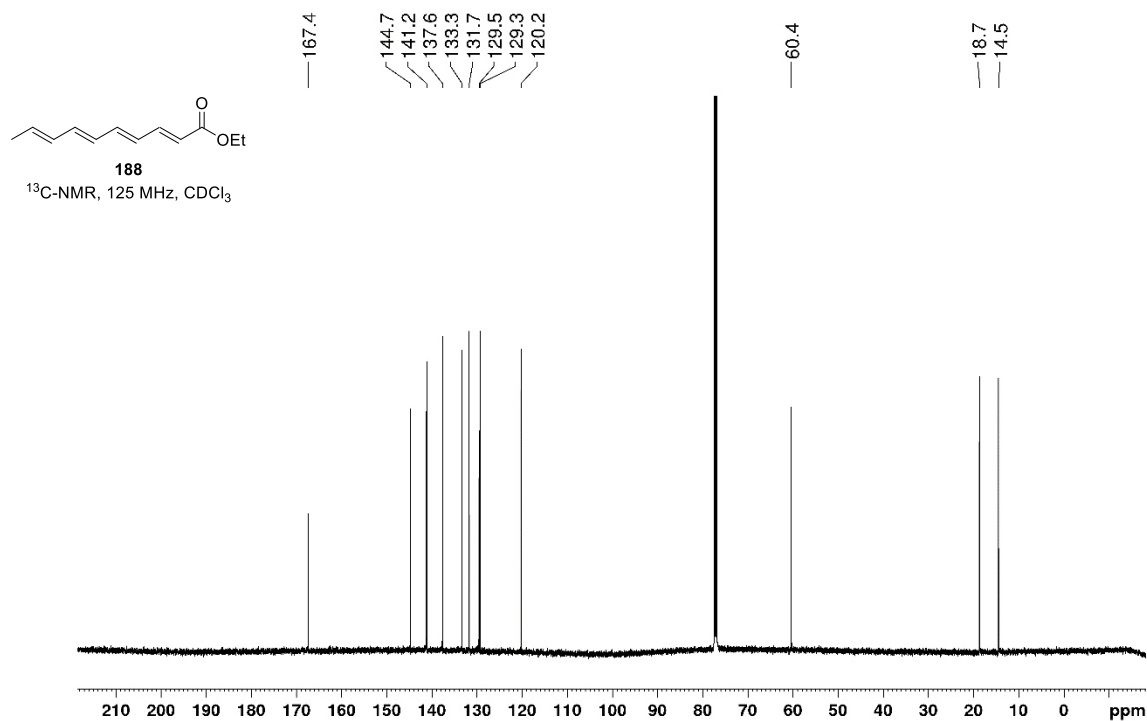
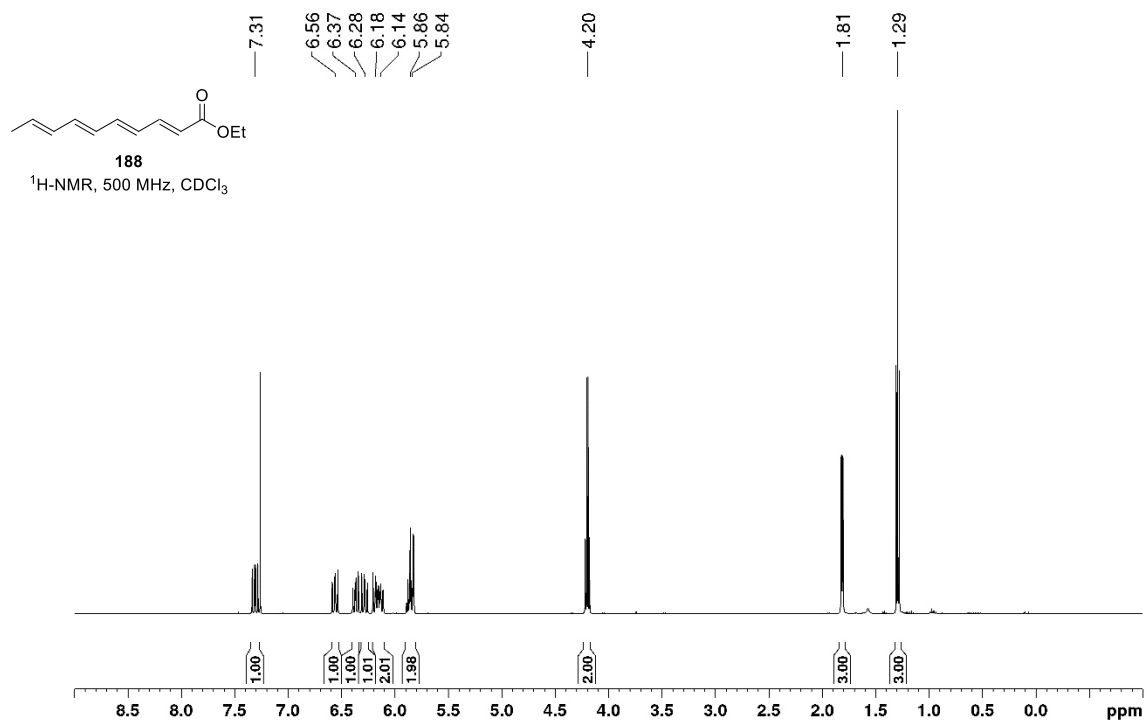


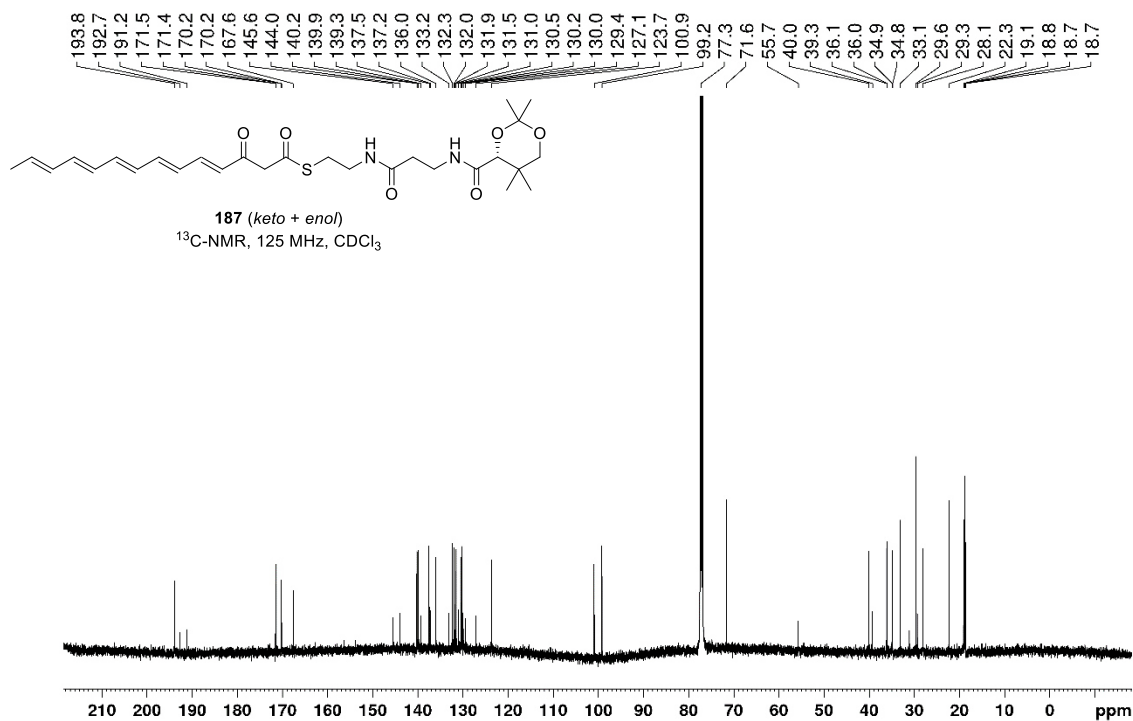
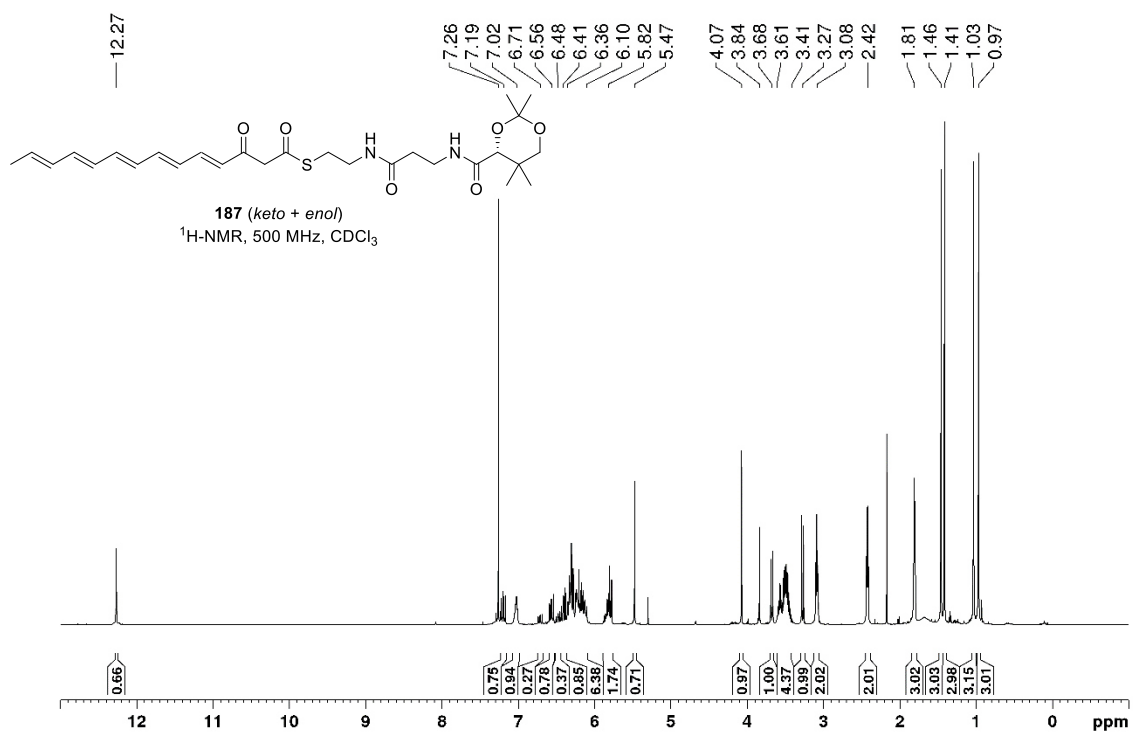


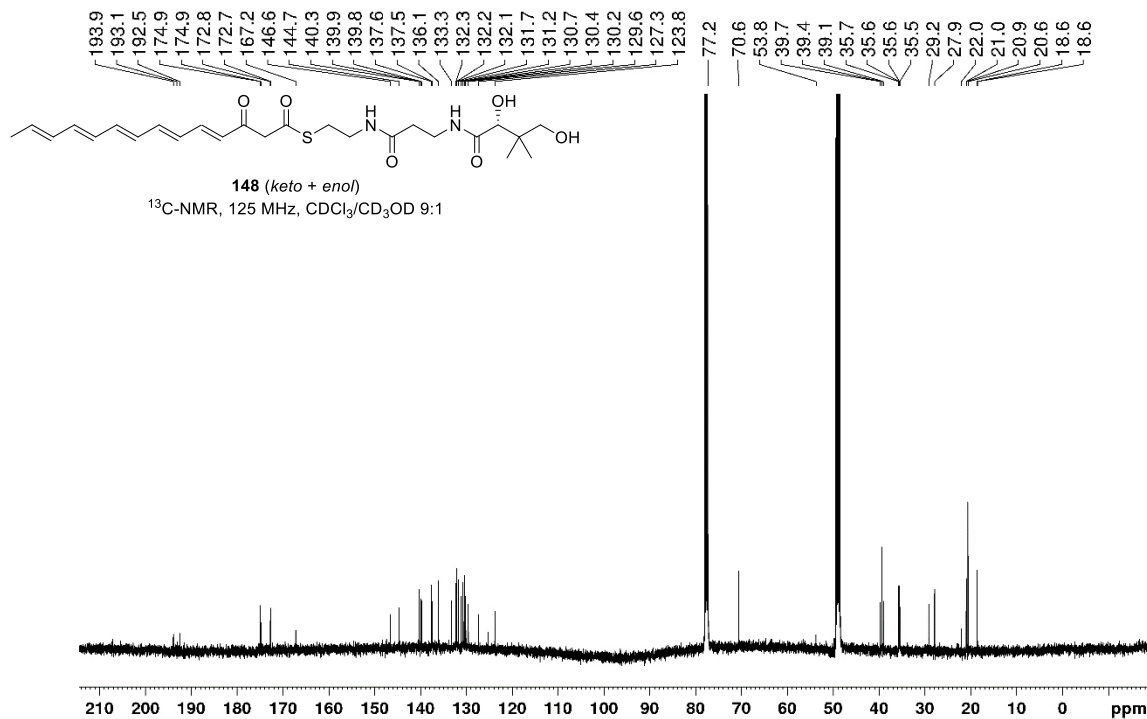
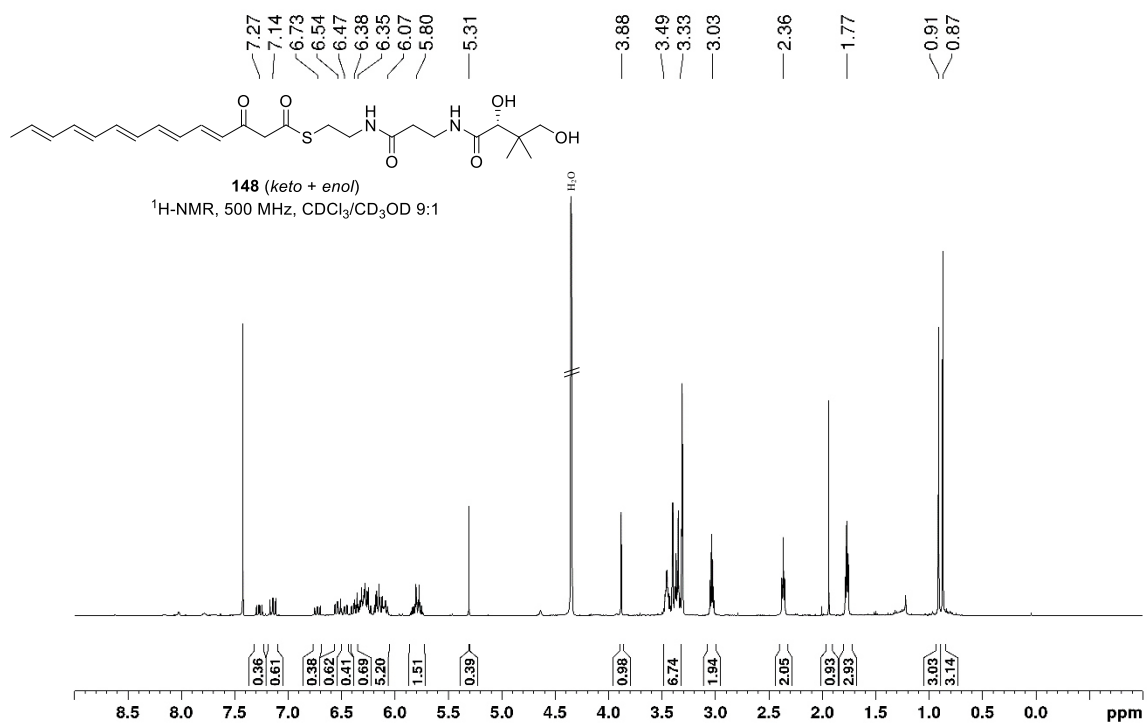


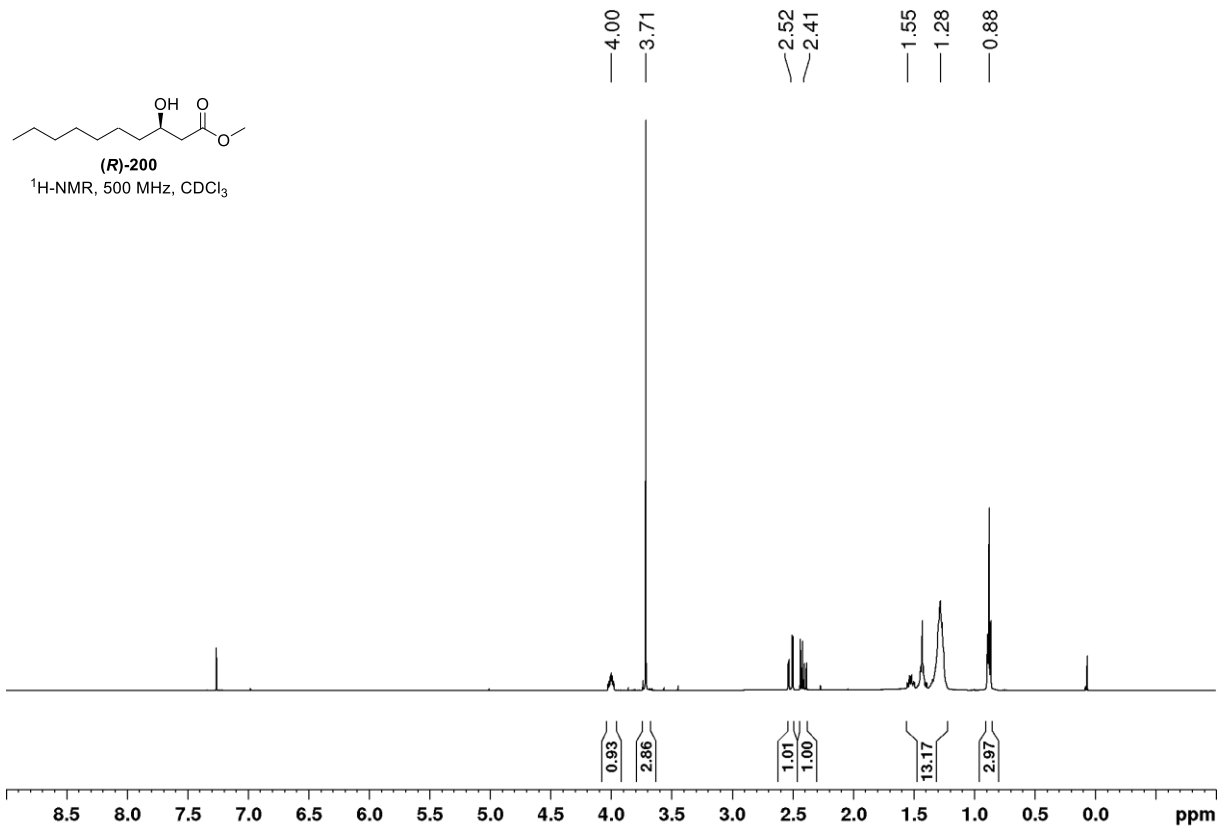


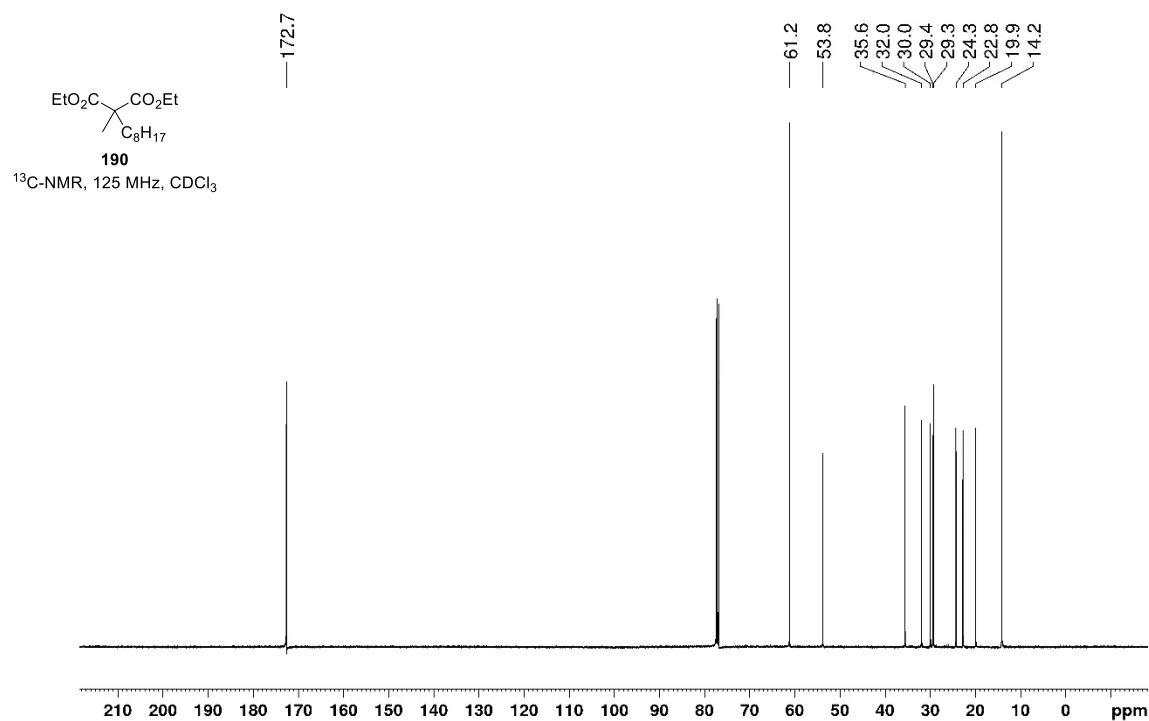
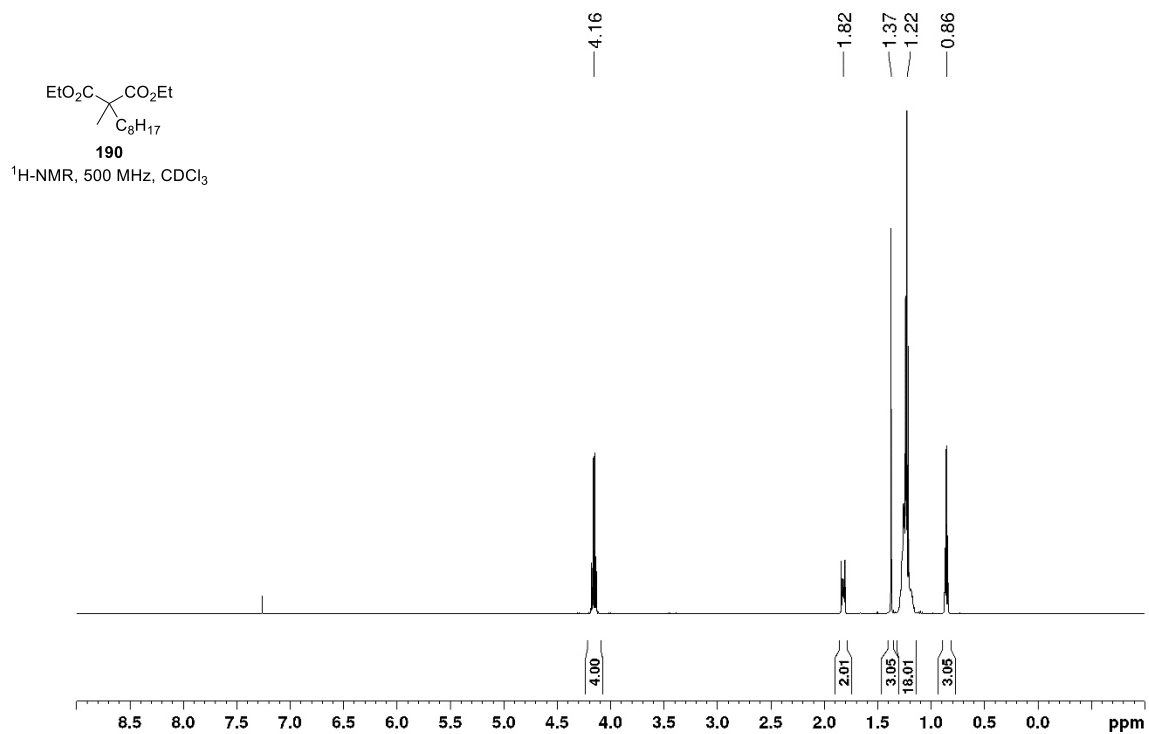


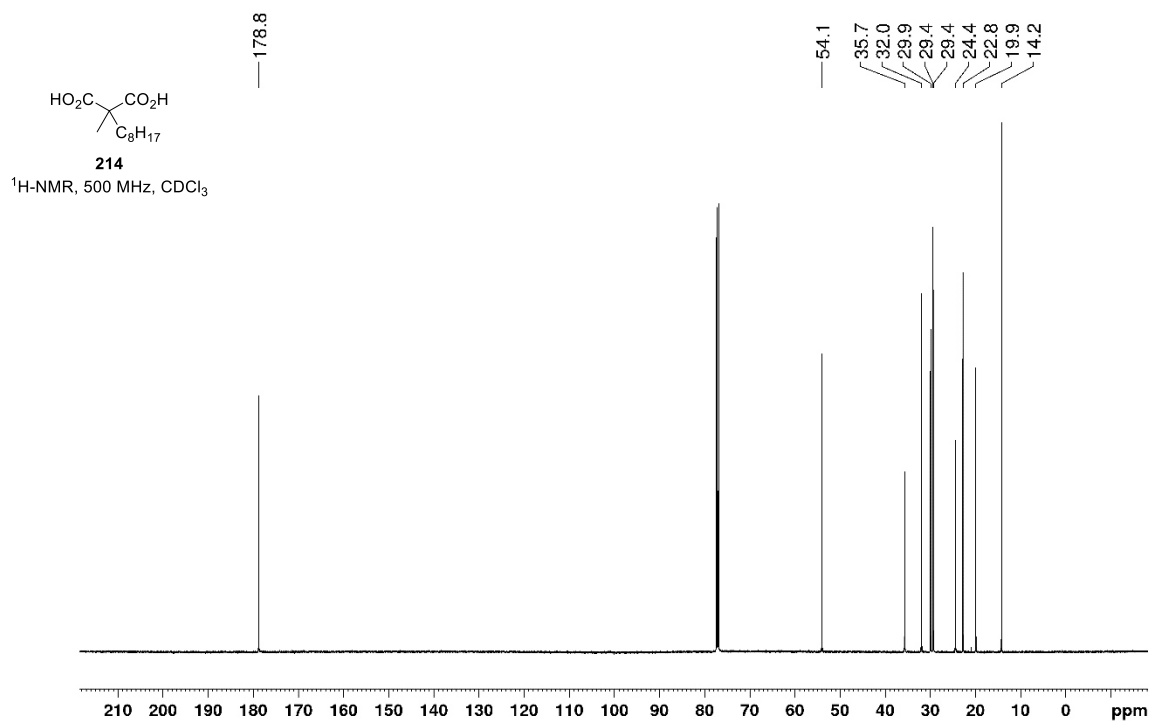
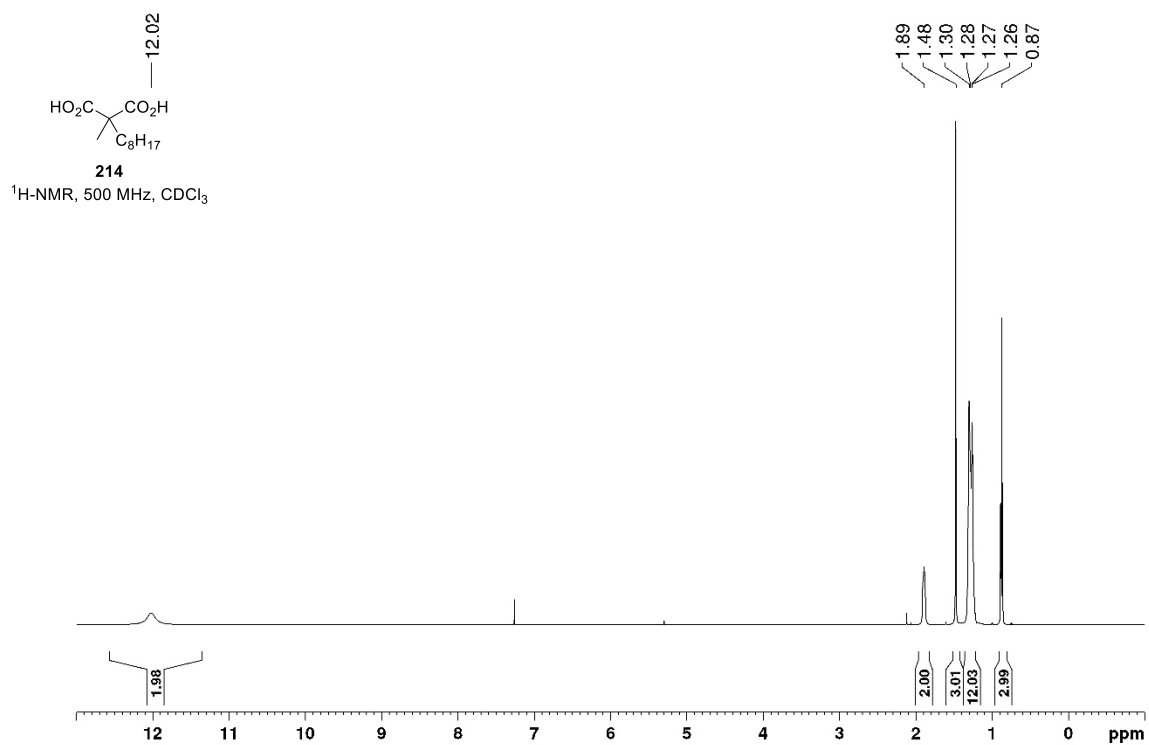


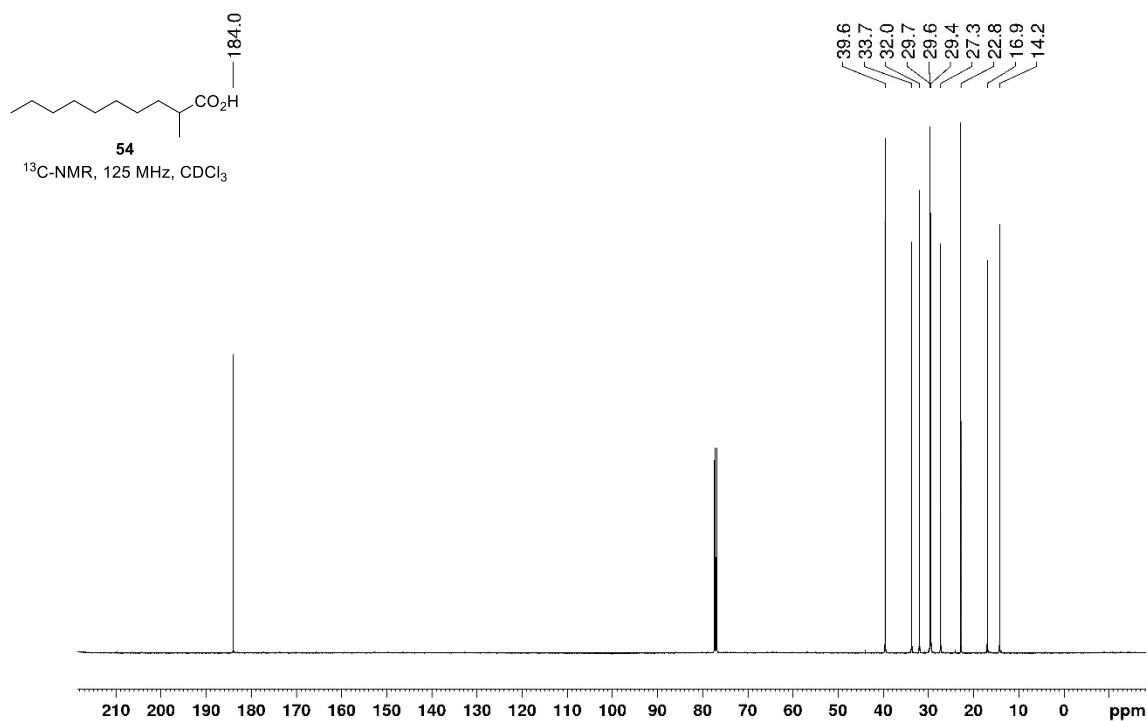
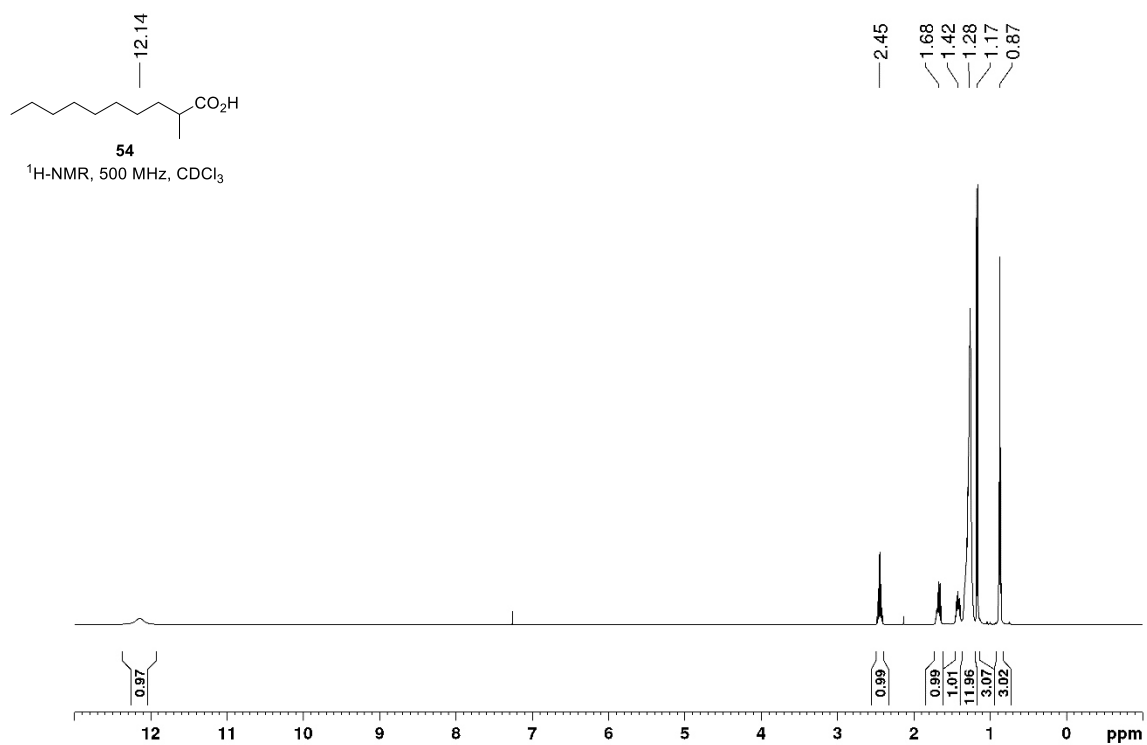


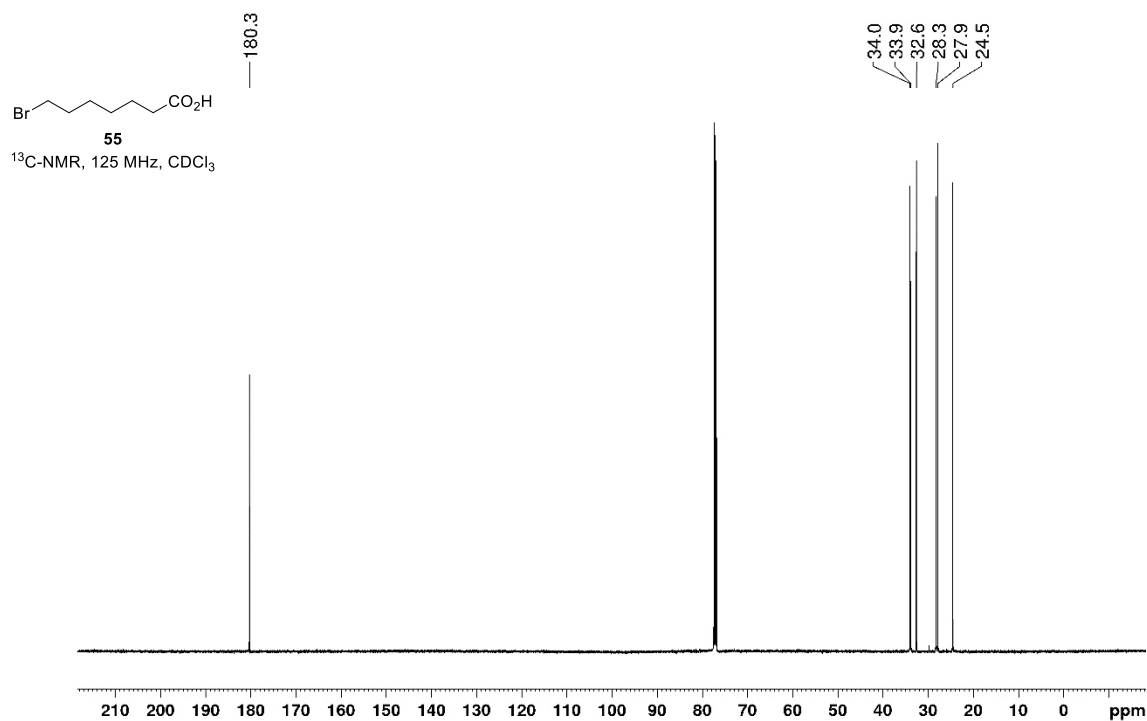
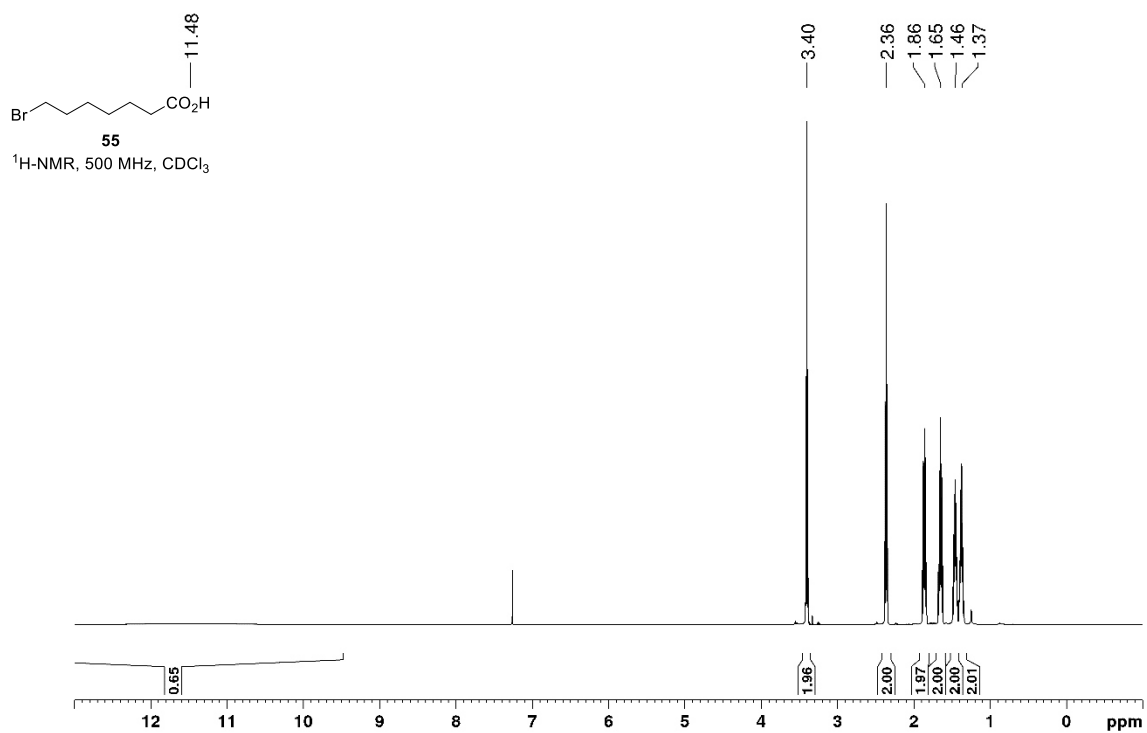


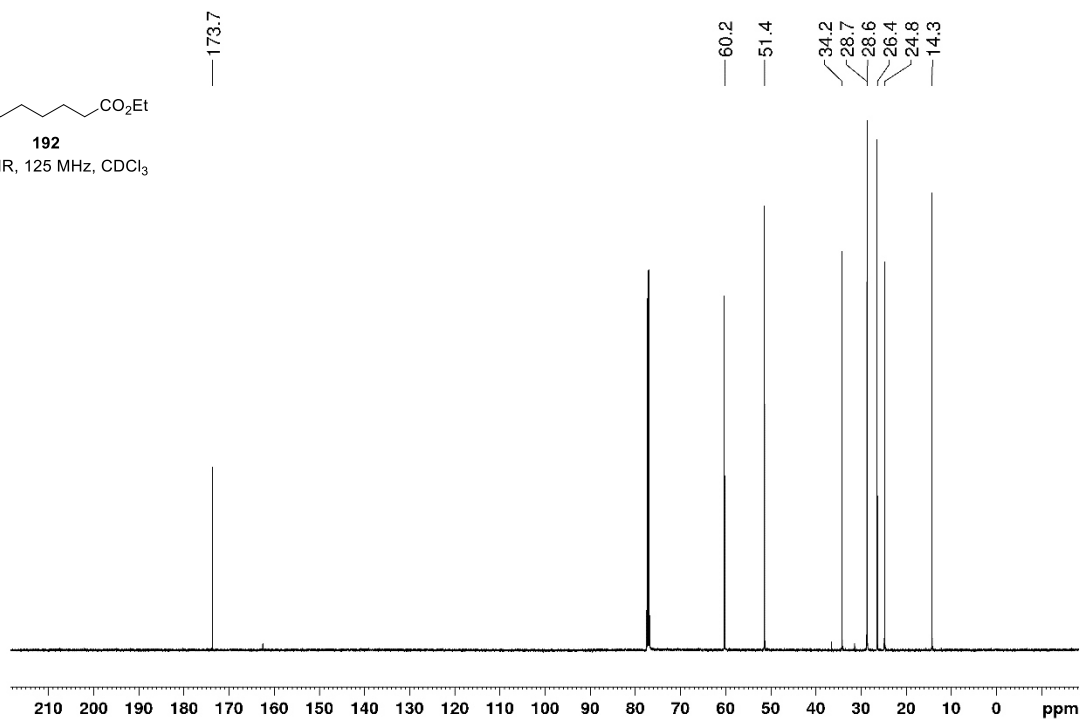
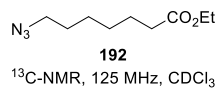
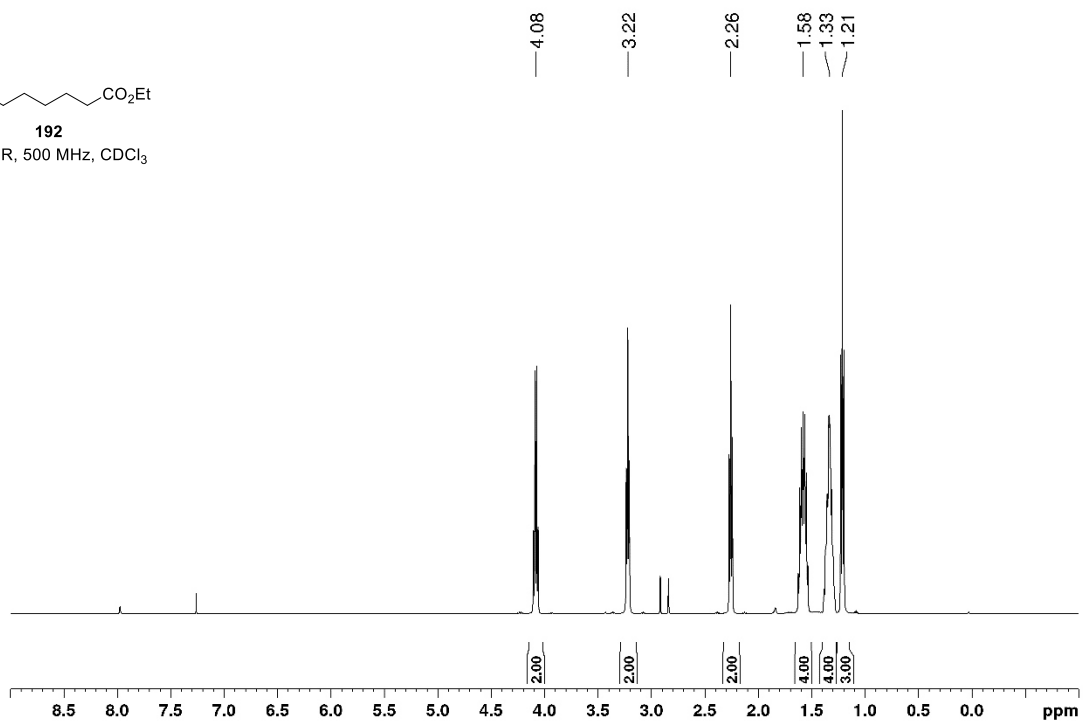
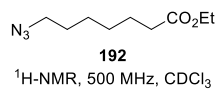


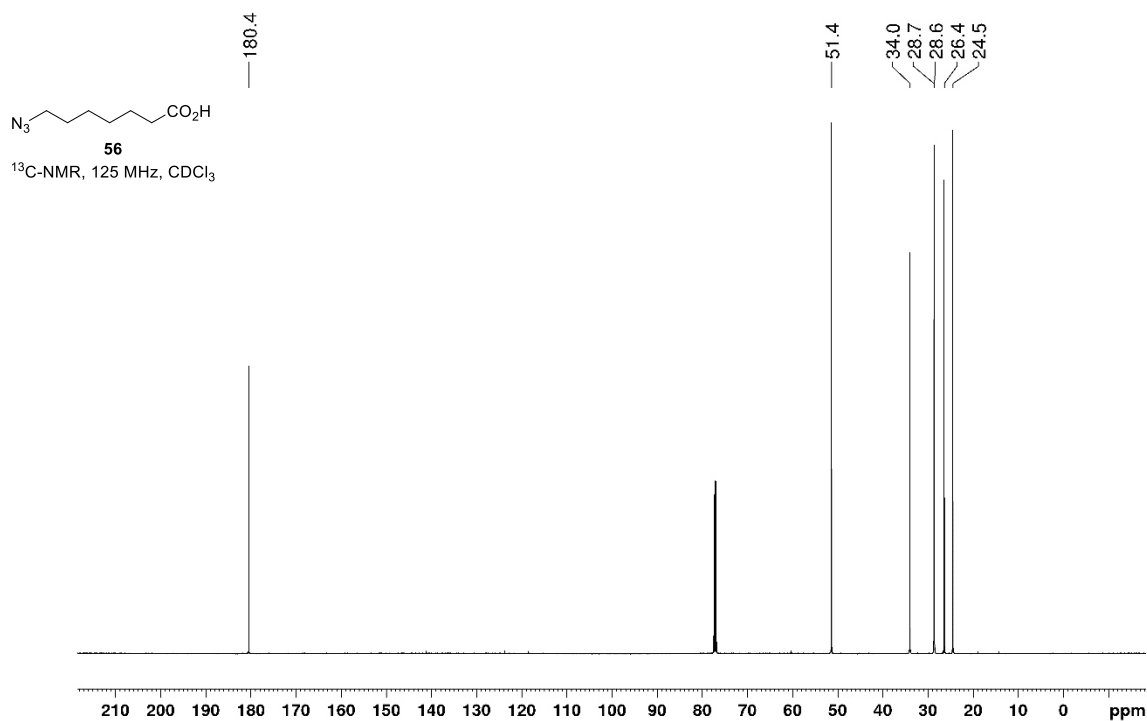
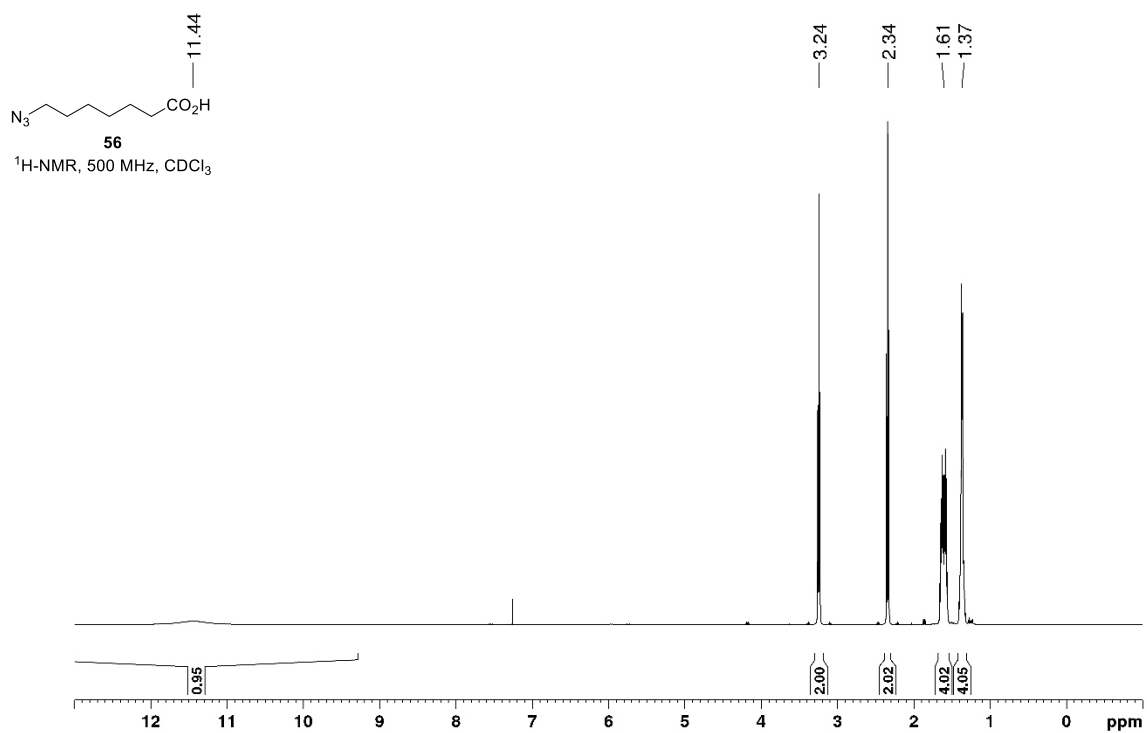


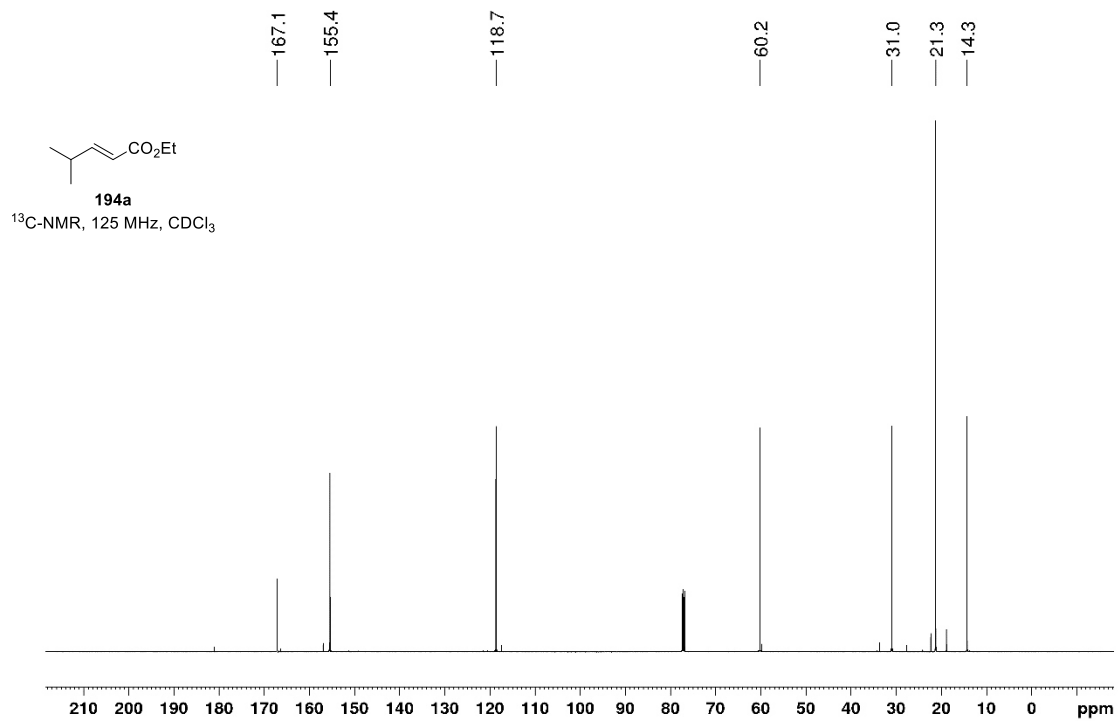
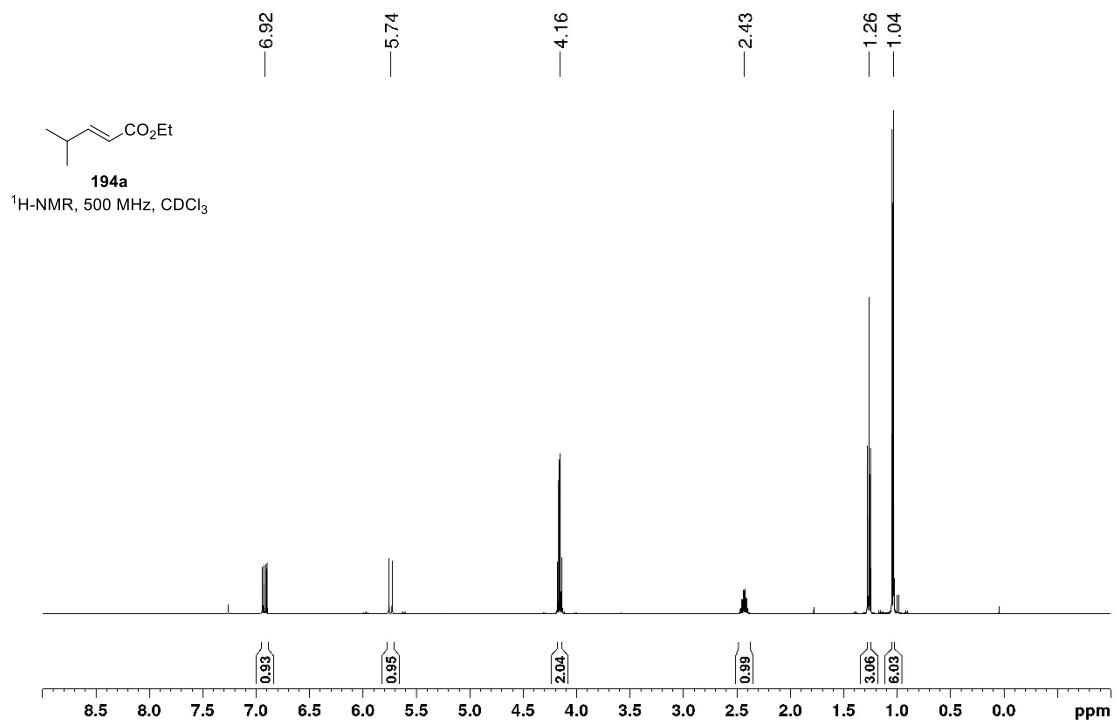


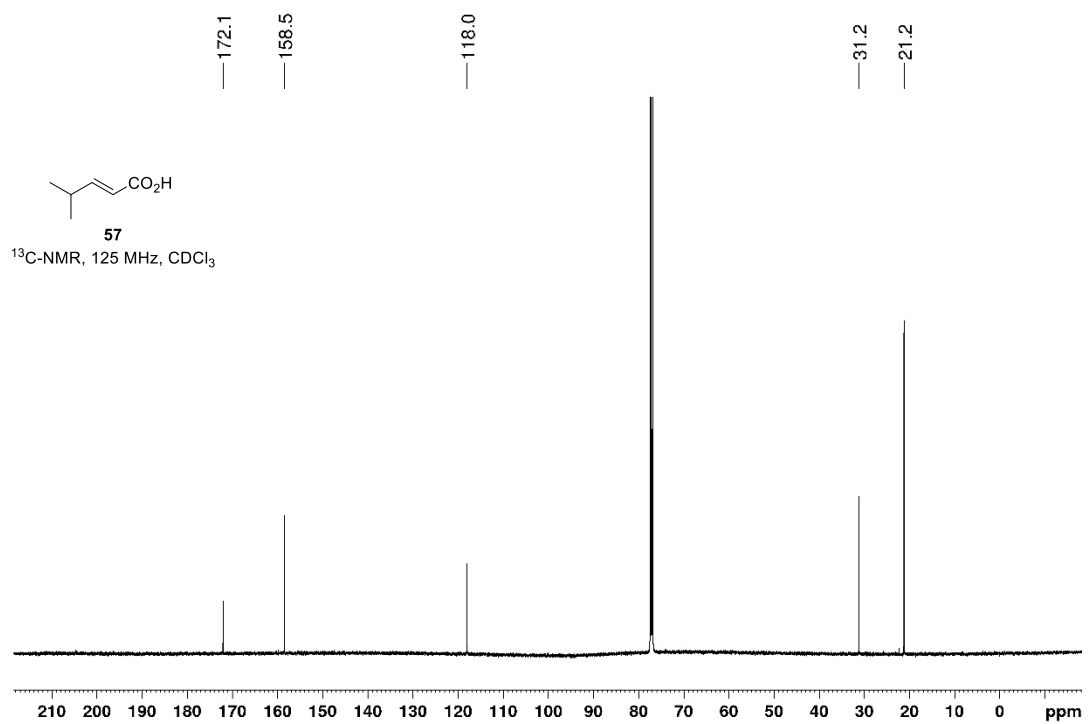
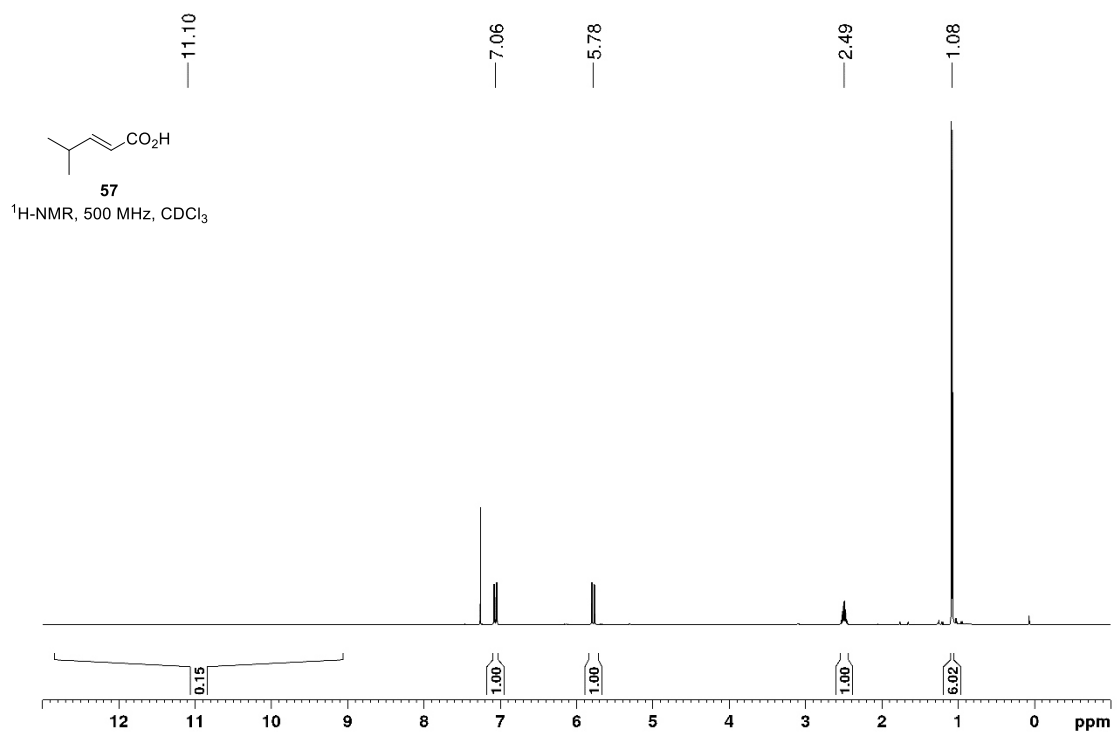


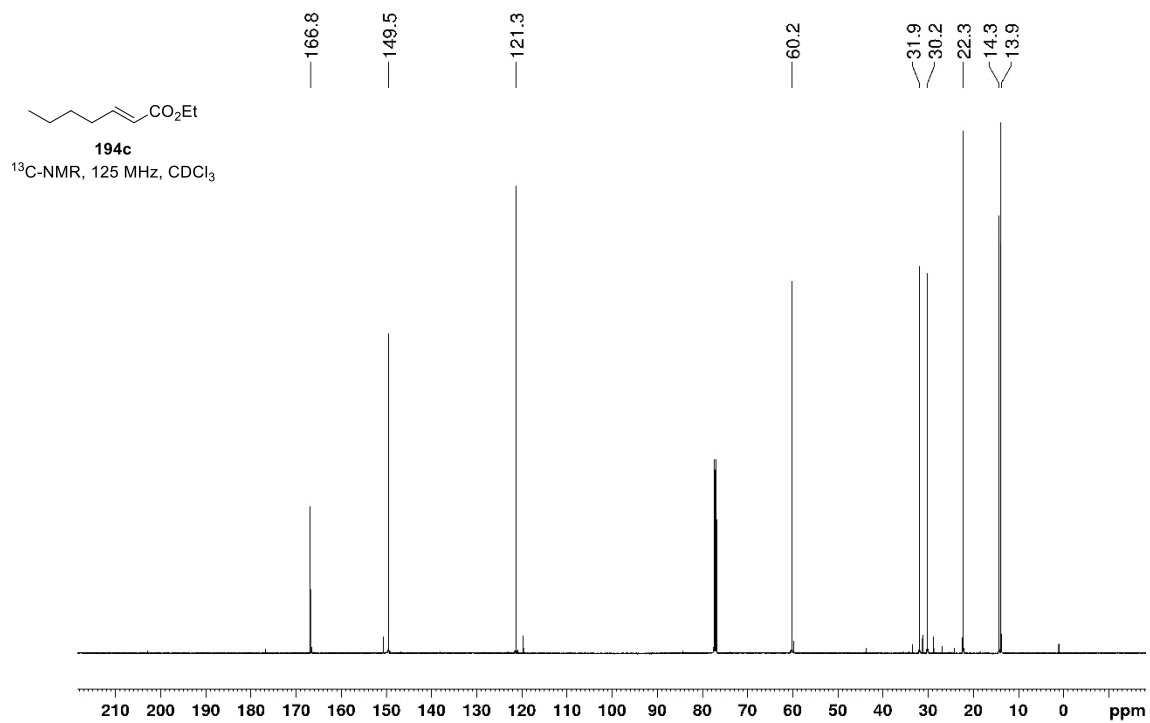
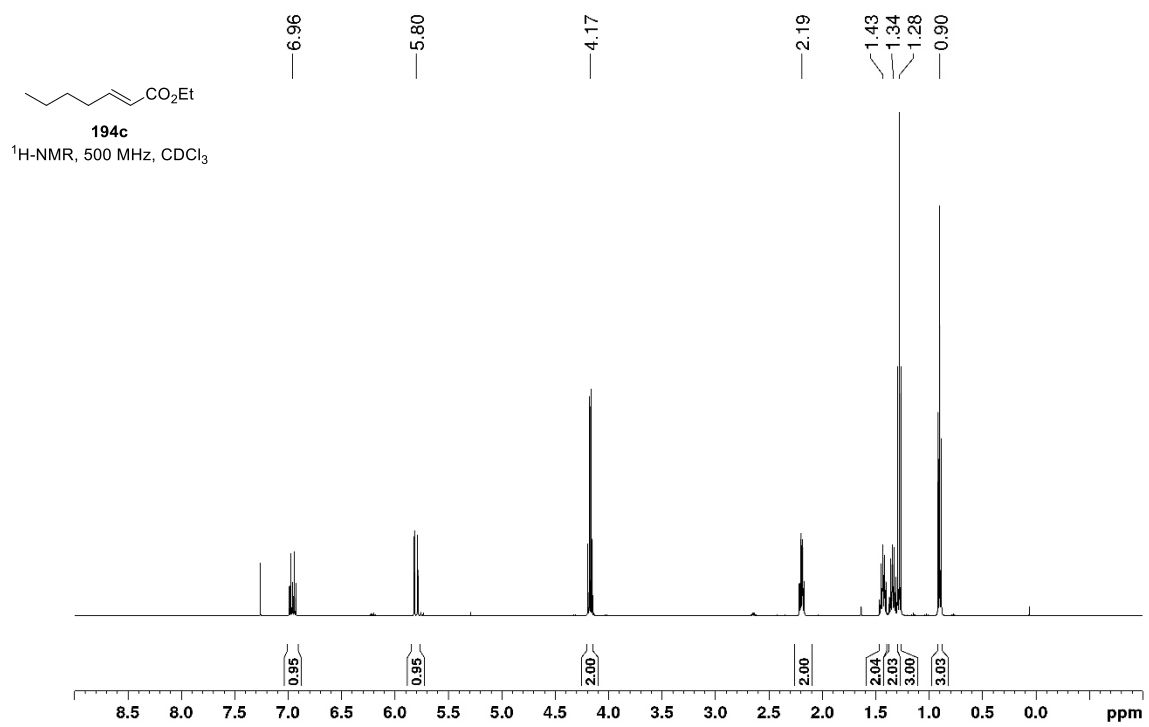


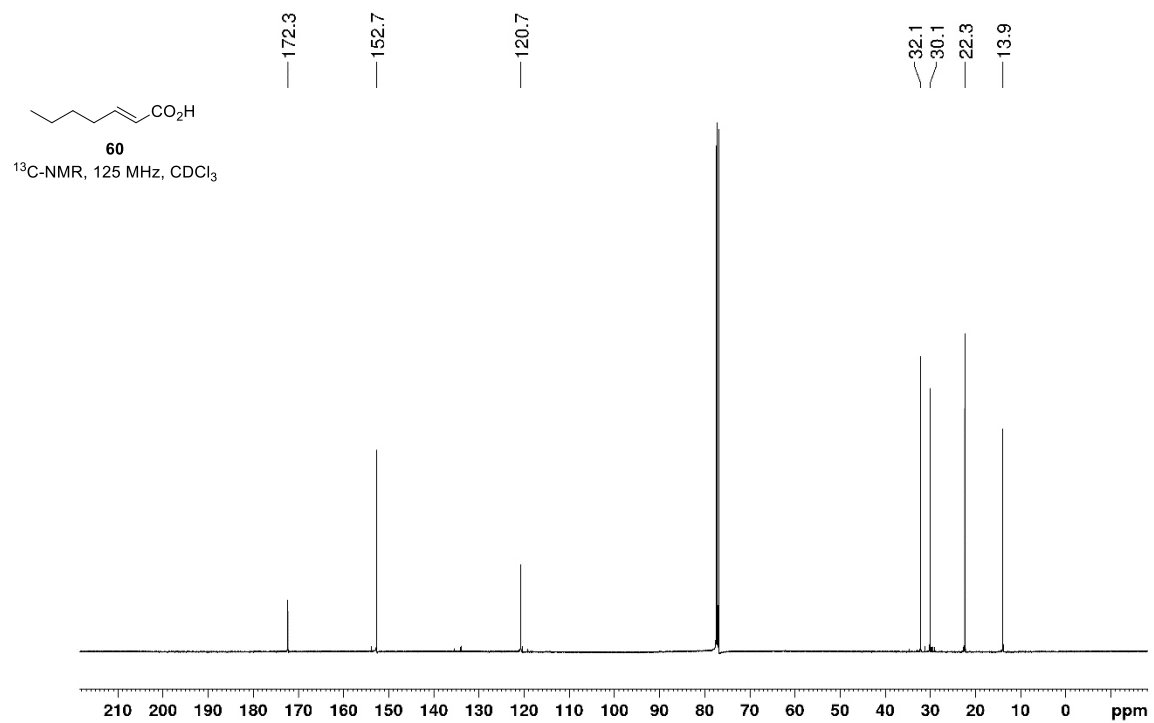
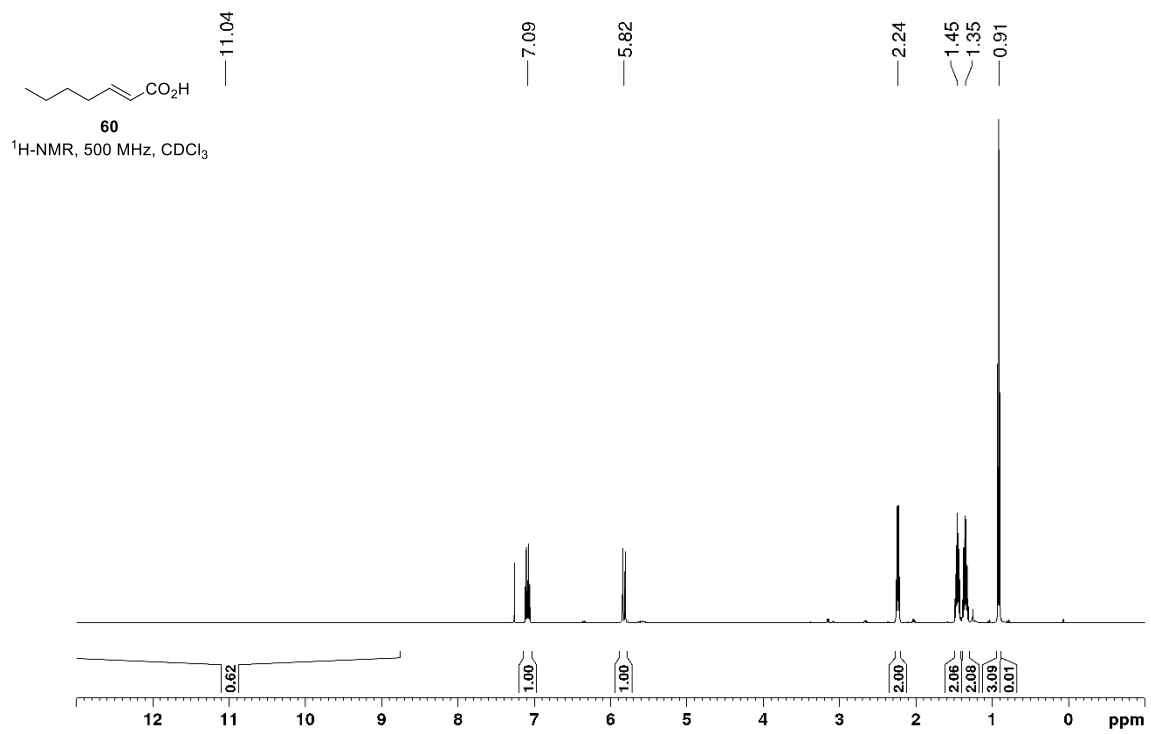


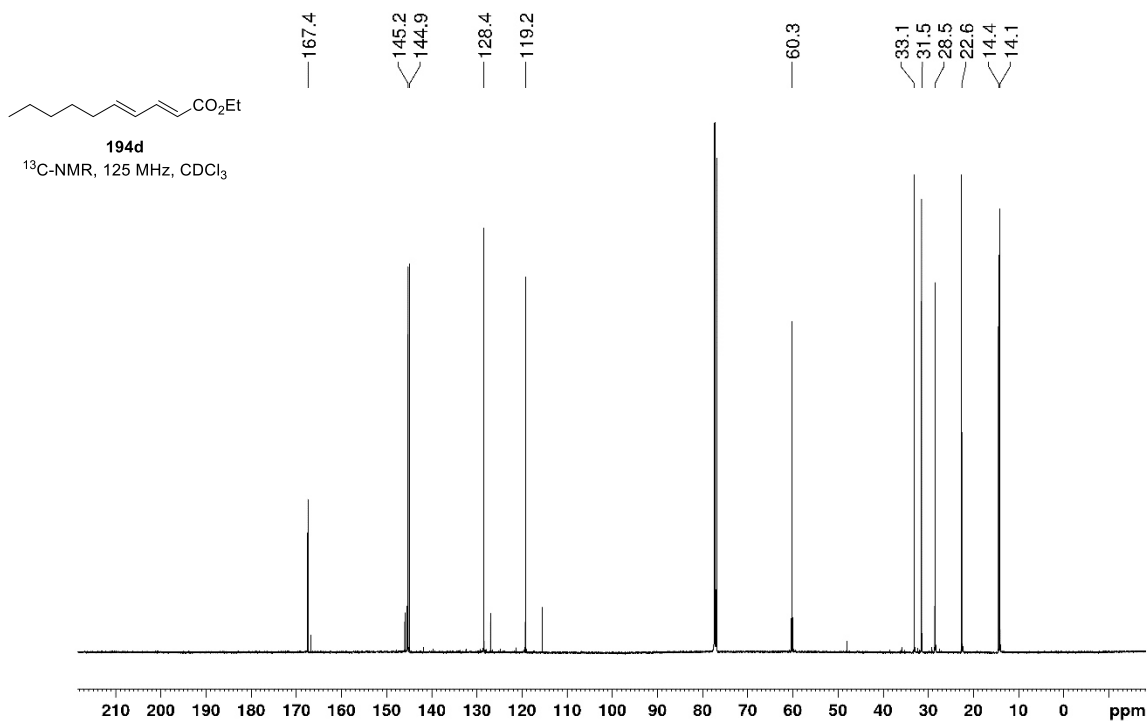
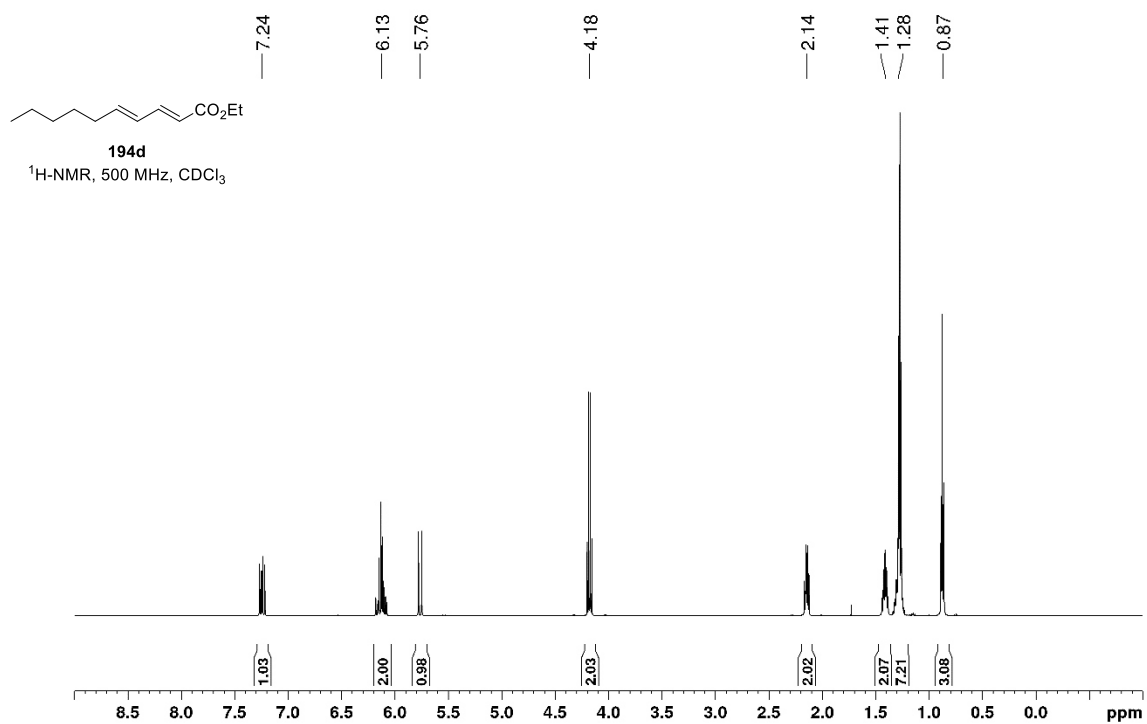


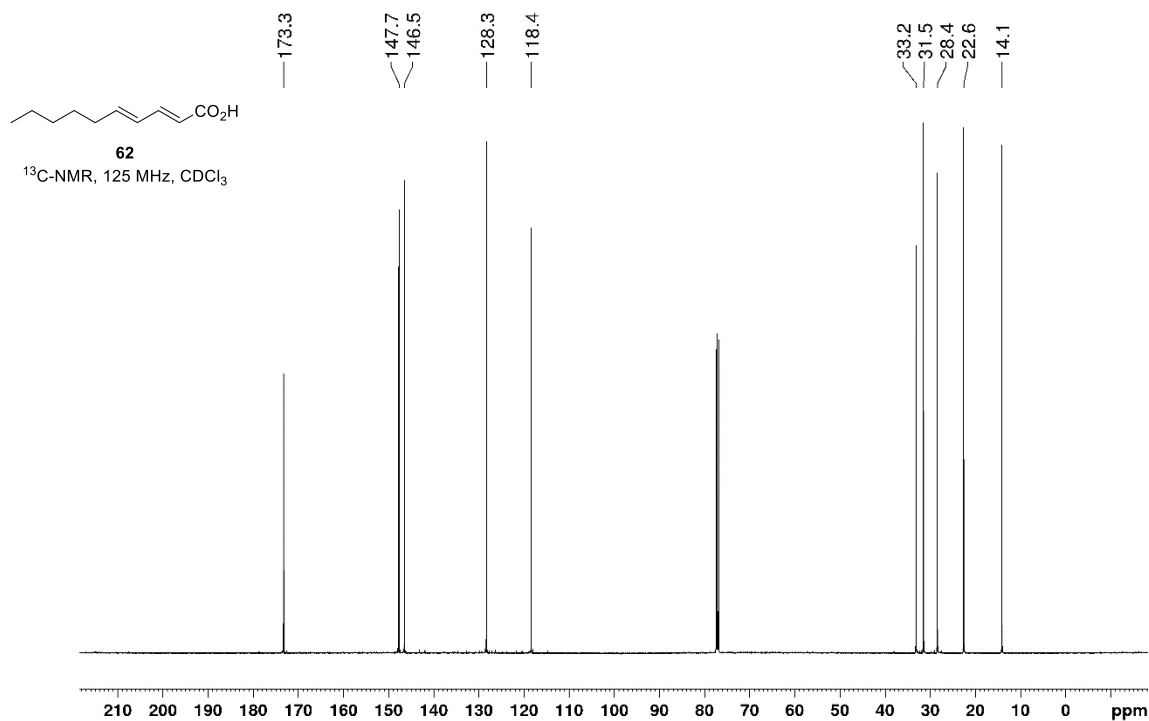
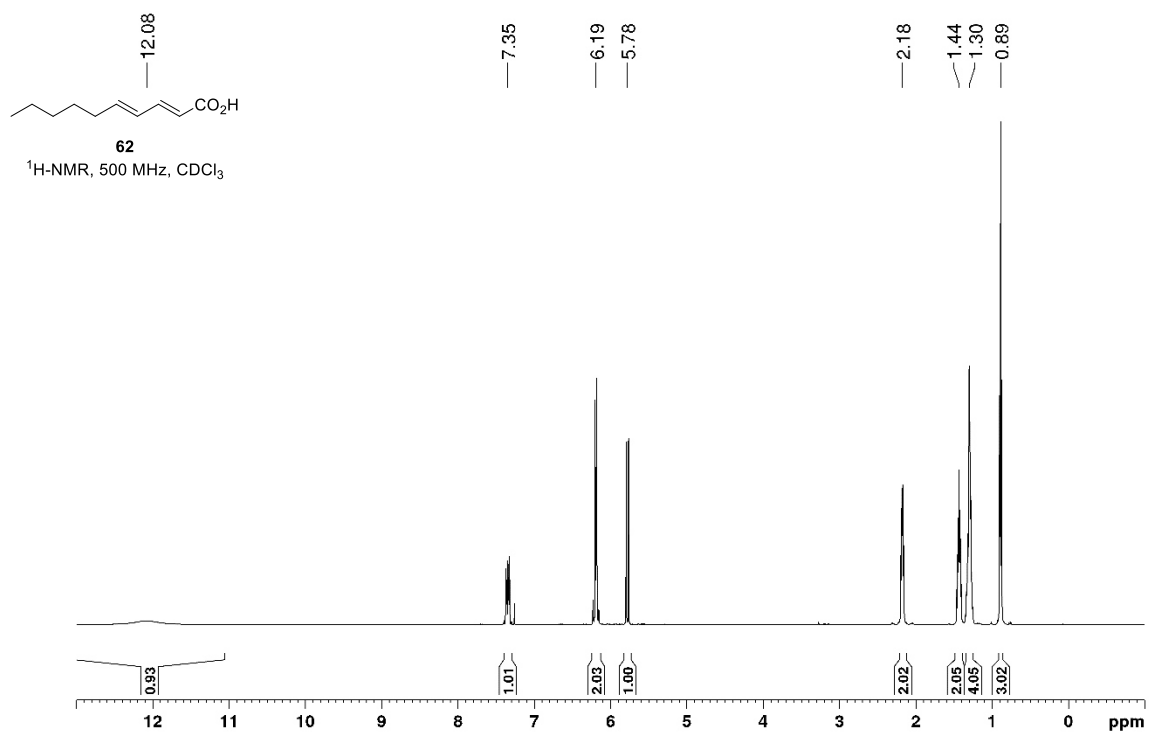


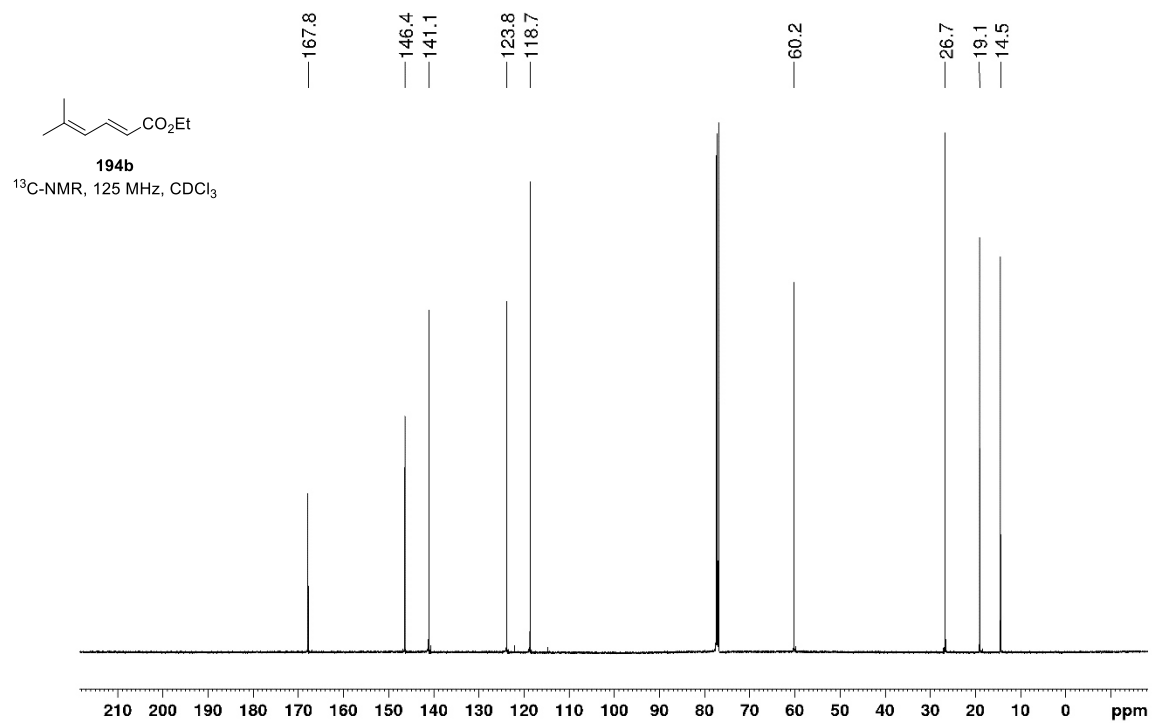
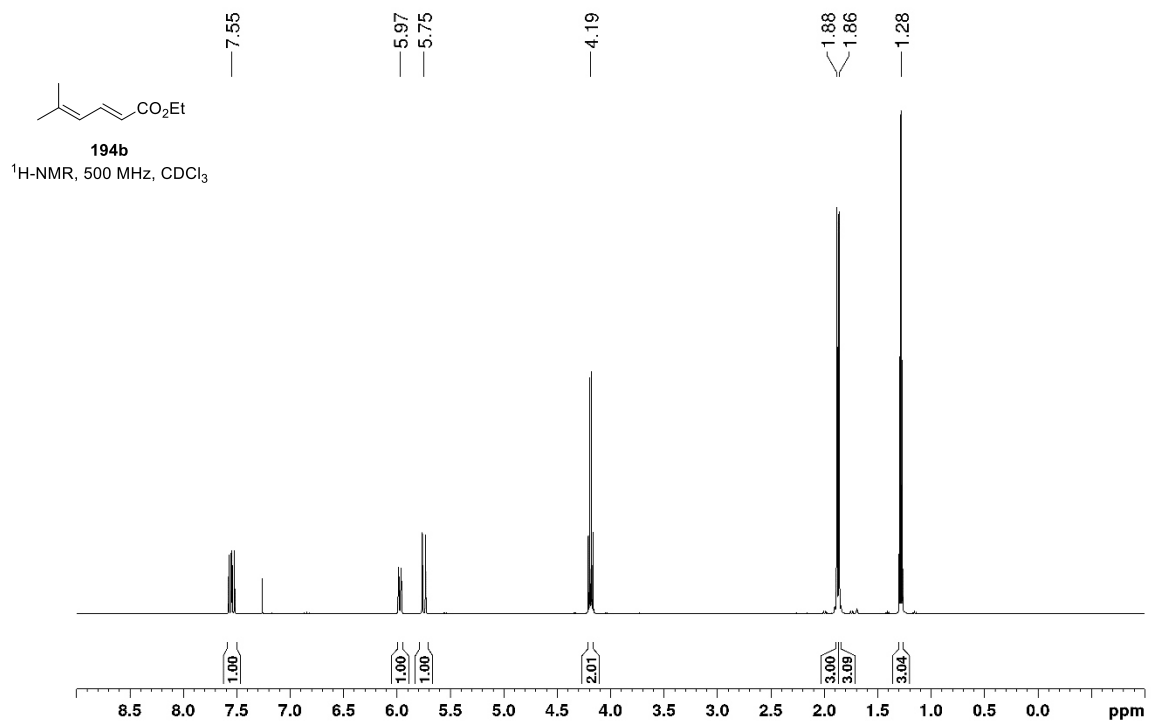


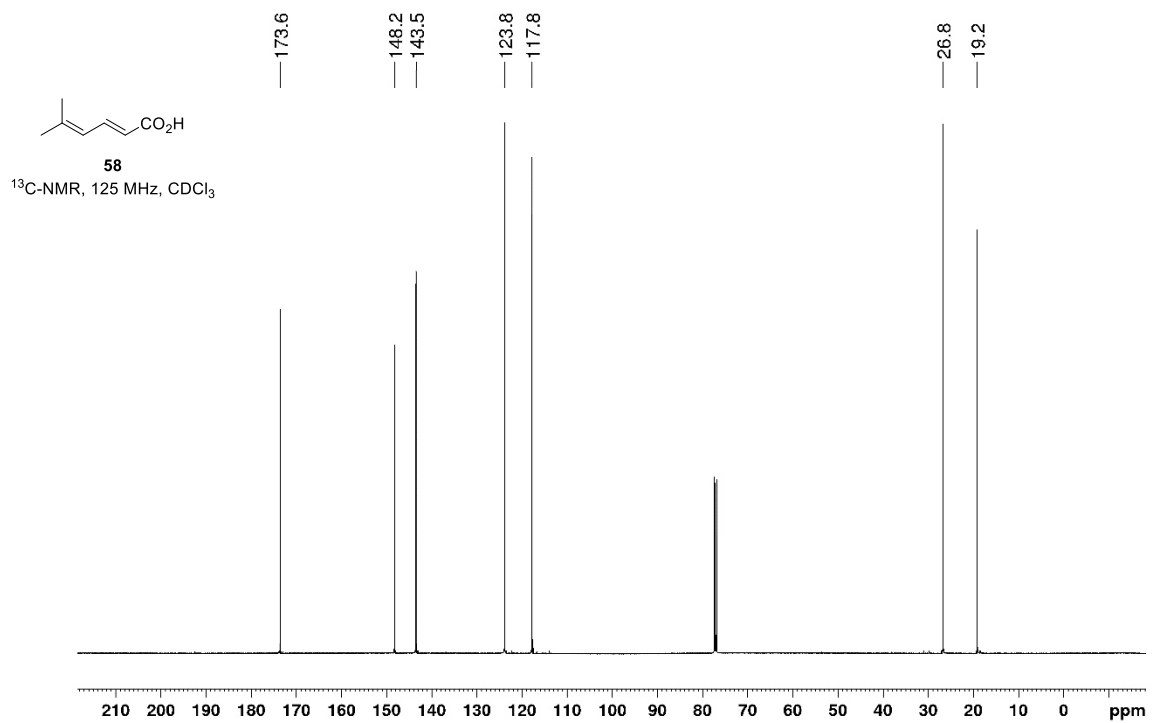
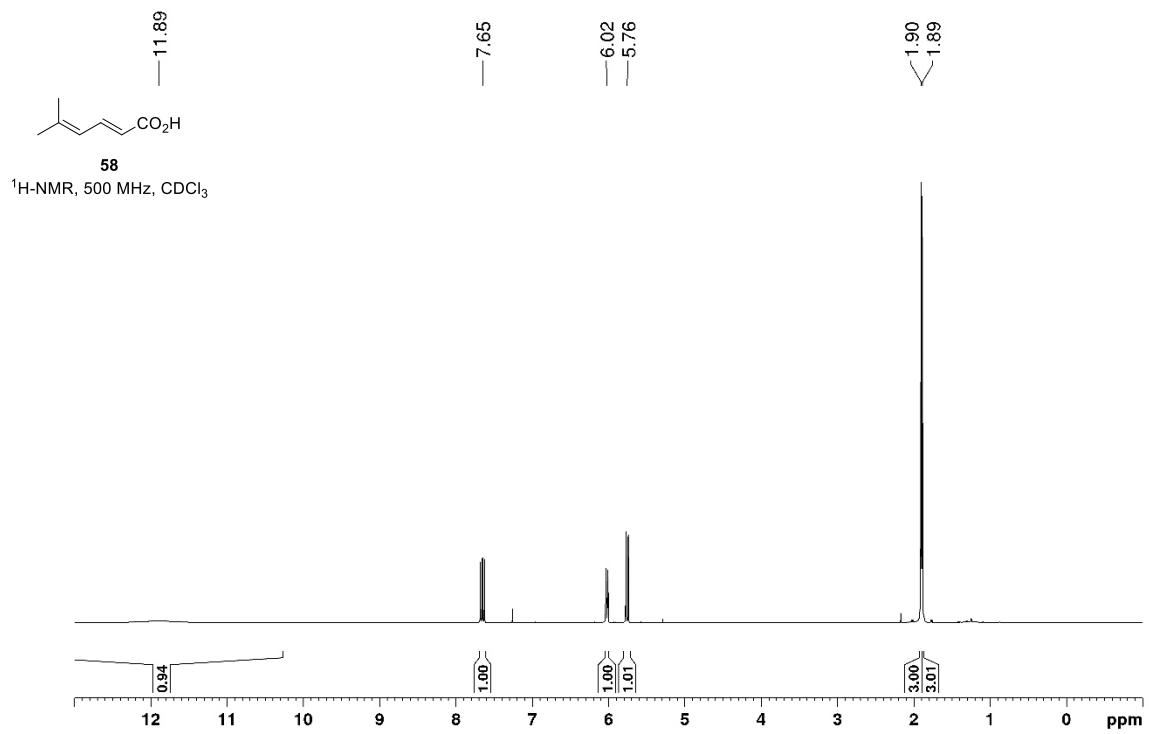


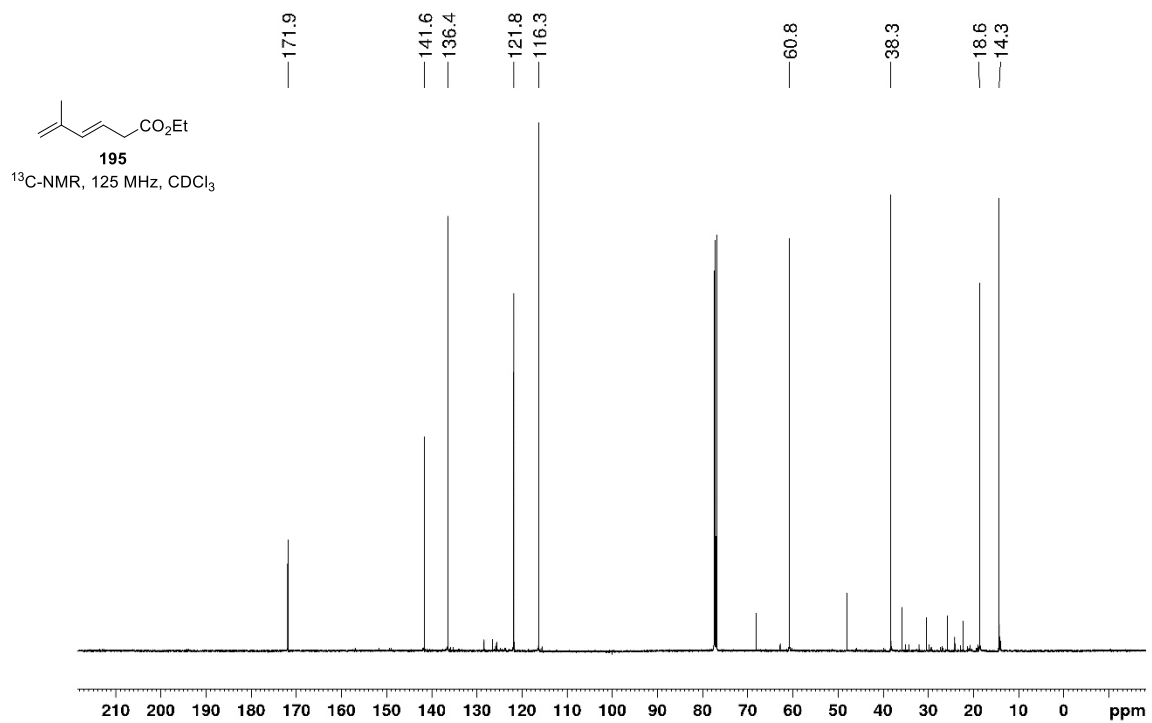
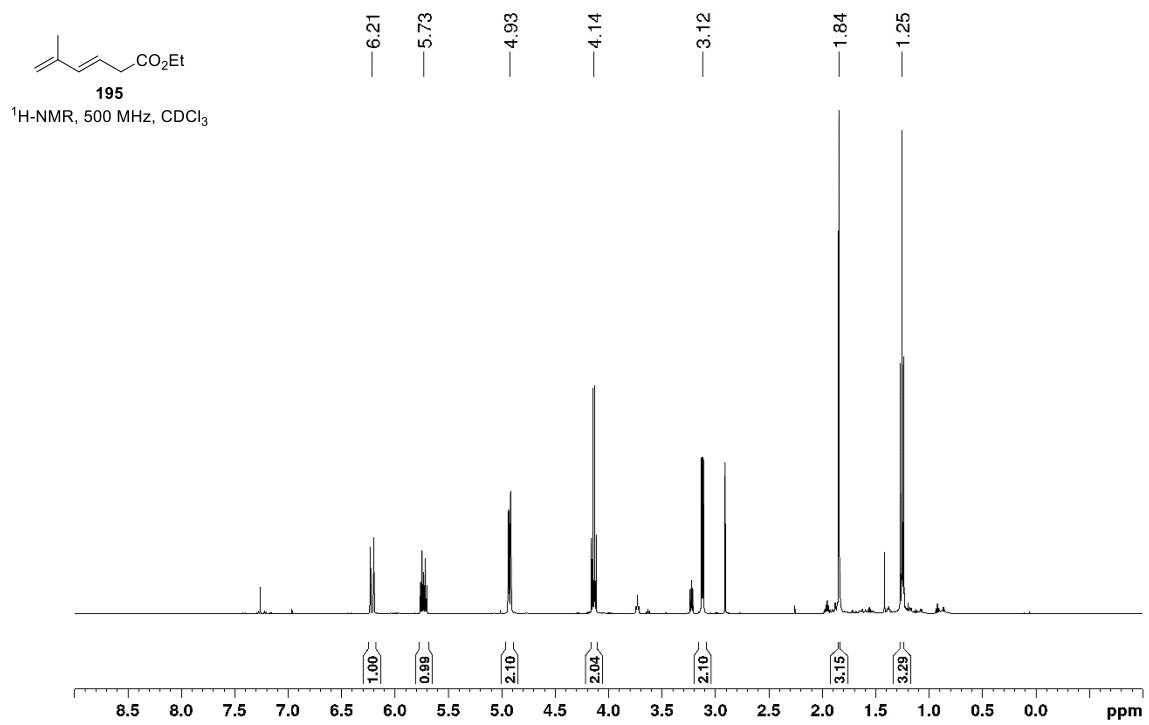


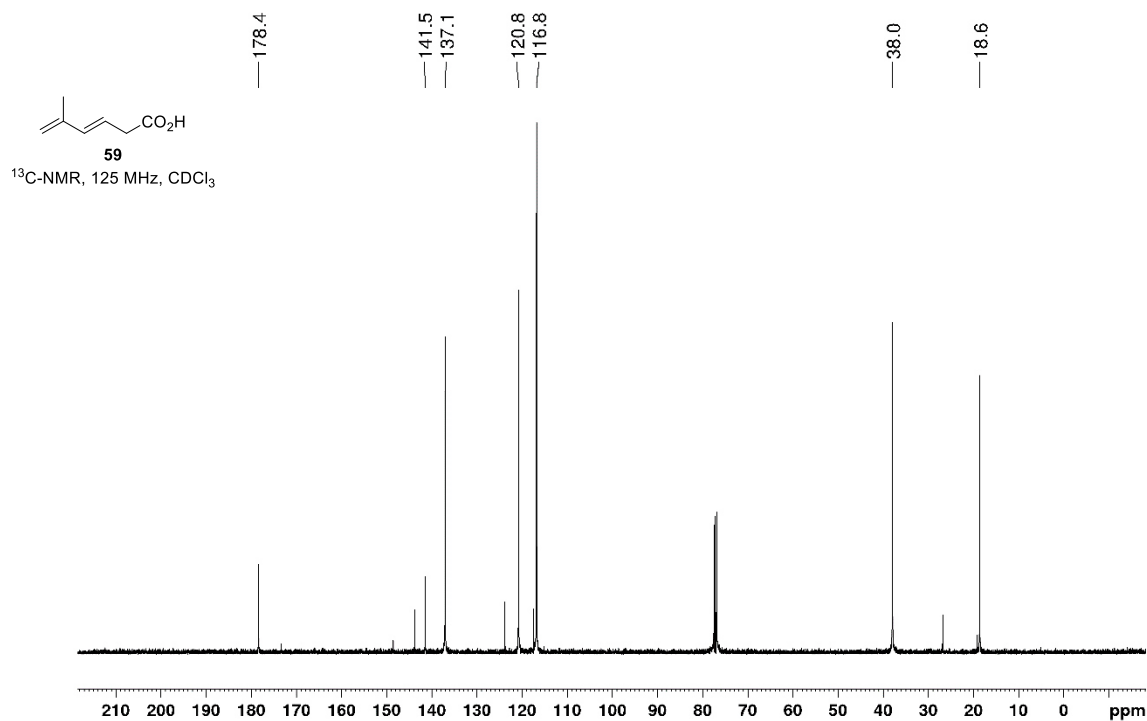
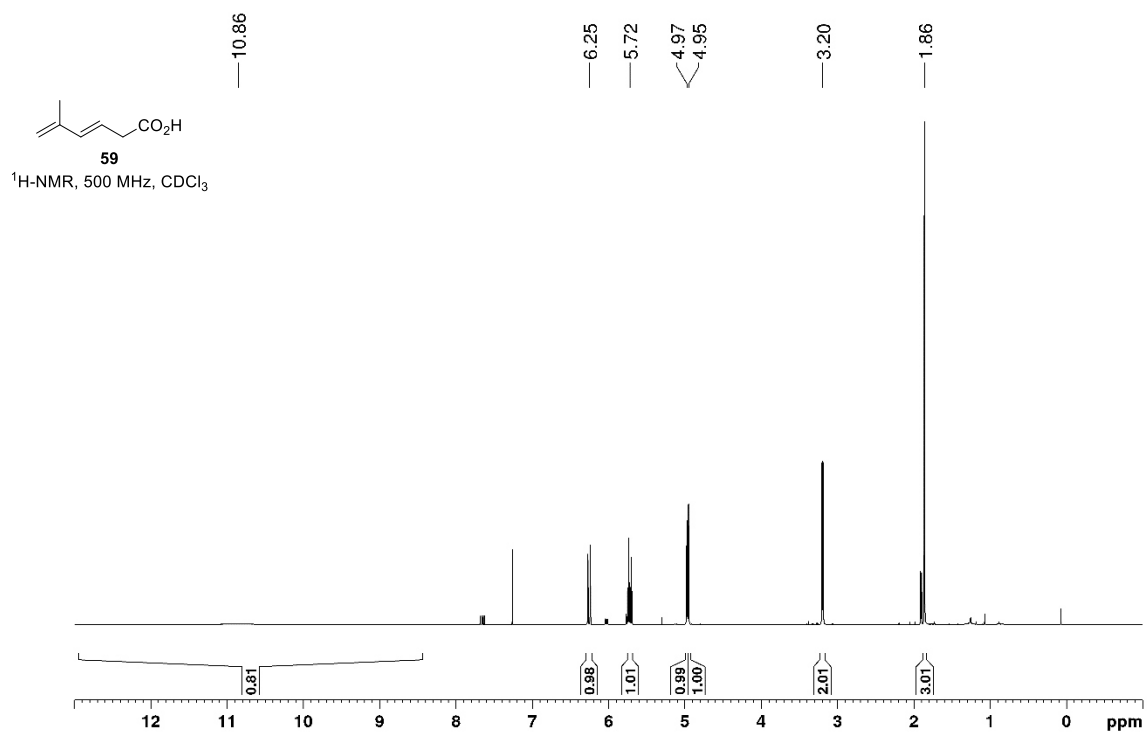


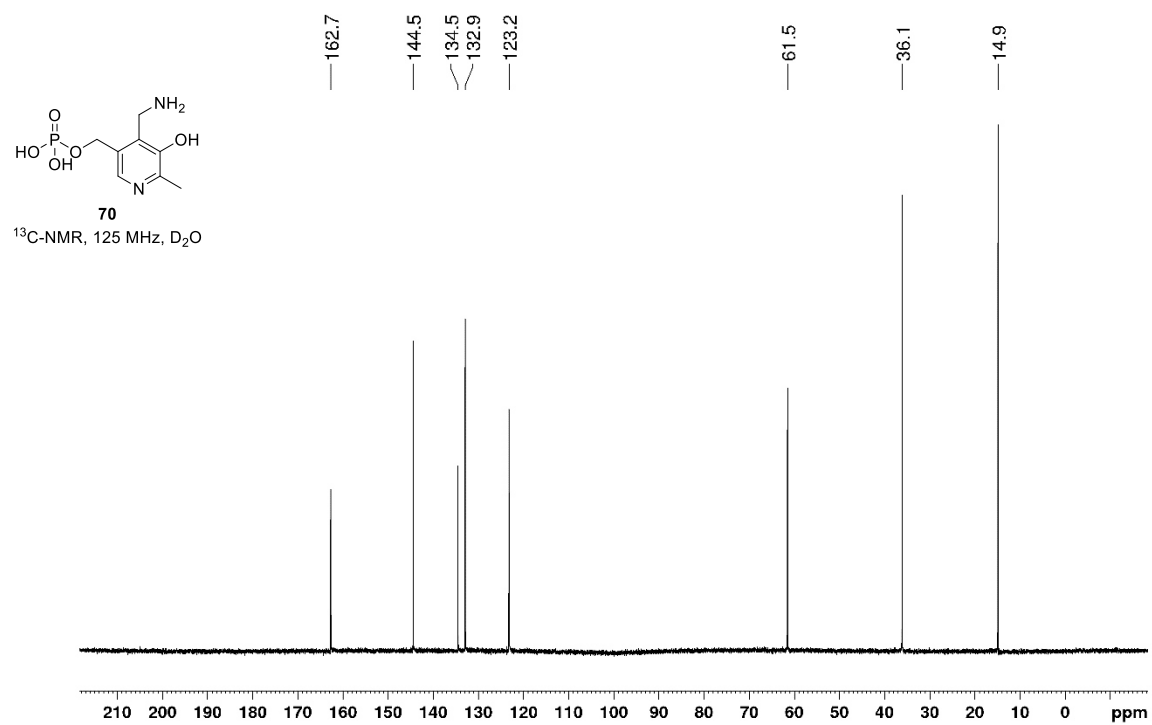
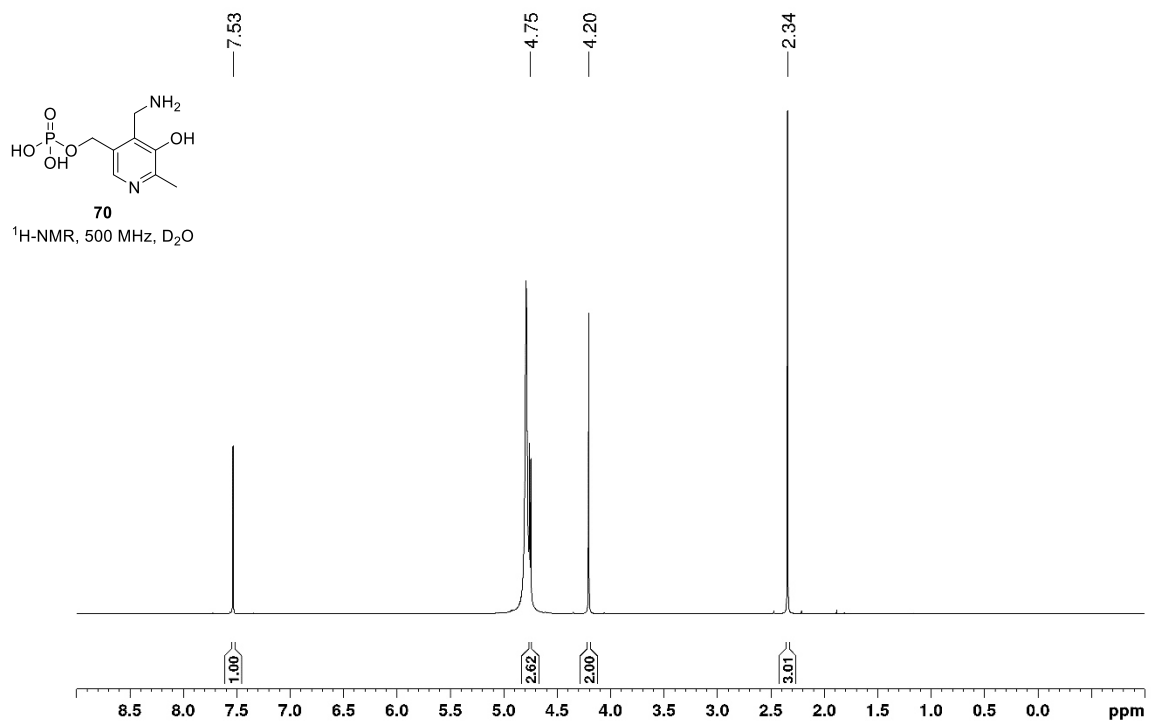


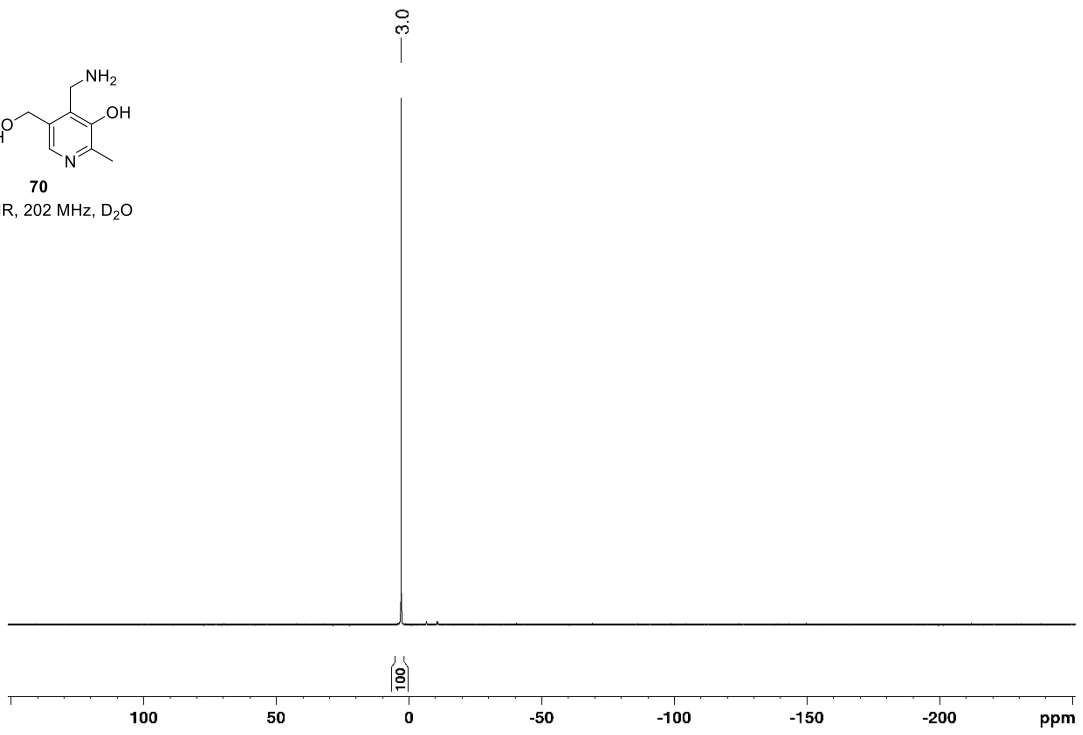
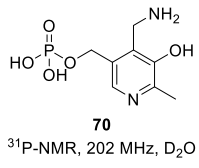












PUBLIKATIONSLISTE

- [1] S. Friedrich, F. Hemmerling, F. Lindner, A. Warnke, J. Wunderlich, G. Berkhan, F. Hahn, „Characterisation of Broadly-Specific *O*-Methyl-transferase JerF from the Late Stages of Jerangolid Biosynthesis“, *Molecules* **2016**, *21*, 1443.
- [2] F. Hemmerling, K. E. Lebe, J. Wunderlich, F. Hahn, „An Unusual Fatty Acyl:Adenylate Ligase (FAAL)-Acyl Carrier Protein (ACP) Didomain in Ambruticin Biosynthesis“, *ChemBioChem* **2018**, *19*, 1006–1011.
- [3] J. Wunderlich, T. Roß, M. Schröder, F. Hahn, „Step-Economic Synthesis of Biomimetic β -Ketopolyene Thioesters and Demonstration of Their Usefulness in Enzymatic Biosynthesis Studies“, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 4955–4959.

DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Frank Hahn für die Gelegenheit bedanken, dieses wirklich spannende, abwechslungsreiche und angenehm fordernde Forschungsthema bearbeiten und dabei eine völlig neue Perspektive der Naturstoffchemie kennenlernen zu dürfen. Ich habe während der Zeit persönlich sowie fachlich viel gelernt und konnte mich wissenschaftlich frei entfalten.

Ich bedanke mich auch bei all meinen Kollegen, sowohl den aktuellen als auch den ehemaligen, die die Zeit im Labor und oft auch außerhalb stets zu einer angenehmen gemacht haben. Es hat wirklich immer viel Spaß mit euch gemacht! Und auch wenn man Fragen hatte oder nicht weiterkam, konnte man immer darauf vertrauen, dass von euch eine gute Antwort oder Idee kam! Insbesondere danke ich Dr. Lisa Wagner und Dr. Marius Schröder, mit denen ich die meiste Zeit lang die Labore in B12 teilen durfte und die die Dunkelheit, kalten Temperaturen und Musik in meinem Labor oft geduldig ertragen haben. Theresa Ross danke ich für die gute Zusammenarbeit, vor allem auch beim MycKR_B-Projekt. Franziska Hemmerling danke ich für die gute Vorarbeit zu AmbF und die gute Zusammenarbeit im Rahmen der Untersuchung von AmbG

Bei den anderen Arbeitskreisen der Fakultät BCG bedanke ich mich für all die Hilfen, seien es materielle Hilfen, dass ich die Gerätschaften nutzen durfte, aber auch bei fachlichen Fragen sowie für unterhaltsame Stunden. Ein spezieller Dank geht an Prof. Dr. Matthias Breuning und seinem AK, bei dem ich während meiner Masterarbeitszeit unglaublich viel lernen konnte.

Frau Dr. Lacher und Frau Hannemann danke ich für ihre Unterstützung in analytischen Fragestellungen. Frau Herold und Frau Kastner danke ich, dass sie einem jederzeit auf so unglaublich hilfsbereite Art und Weise im Sekretariat unterstützt haben.

Und natürlich danke ich ganz besonders und aus tiefstem Herzen Dr. Jessica Goller dafür, dass sie stets an mich geglaubt hat und immer für mich da ist!

(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