Struktur und Biosynthese von Spirodionsäure und Kirromycin aus *Streptomyces* sp.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Adriana Textor

aus Göttingen

Göttingen 2008

D7

Referent: Prof. Dr. A. Zeeck

Korreferent: Prof. Dr. H. Laatsch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2008

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen in der Zeit von Dezember 2004 bis November 2007 unter Anleitung von Frau Dr. S. Grond und Herrn. Prof. Dr. A. Zeeck durchgeführt.

Frau Dr. S. Grond und Herrn Prof. Dr. A. Zeeck danke ich für die interessante Themenstellung, das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie für viele wertvolle Anregungen und das entgegengebrachte Vertrauen.

Dum spiro, spero.

(Cicero ad Atticum 9, 11)

A Theoretischer Teil 3
1 EINLEITUNG ... 3
1.1 Biosyntheseuntersuchungen − bedeutendes Werkzeug der Naturstoffforschung ... 3
1.2 Diels-Alder Reaktionen in der Natur ... 8
2 AUFGABENSTELLUNG ... 18
3 DER PRODUZENT *STREPTOMYCES* TÜ 6077 ... 19
3.1 Vorarbeiten ... 19
3.2 Stammhaltung und Kultivierung ... 20
3.3 Sekundärmetaboliten aus Tü 6077 ... 28
4 BIOSYNTHESE VON SPIRODIONSÄURE (23) ... 35
4.1 Biosynthesehypothesen ... 36
4.2 Fütterungsexperimente mit ^{13}C-markierten Vorläufern ... 39
4.3 „Separated-cell“ Experiment mit [U-$^{13}C_3$]Glycerin ... 47
4.4 Vorläufer-dirigierte Biosynthese ... 56
4.5 Diskussion und Ausblick ... 70
5 DIE ABSOLUTE KONFIGURATION DER SPIRODIONSÄURE (23) ... 76
5.1 Derivatisierungen der Spirodionsäure (23) ... 76
5.2 Native und synthetische Spirodionsäure (23, 50) und ihre Derivate (51a, 51b) ... 77
6 DER KIRROMYCIN-PRODUZENT *STREPTOMYCES COLLINUS* TÜ 365 UND AUSGEWÄHLTE MUTANTEN ... 81
6.1 Die Elfamycine ... 81
6.2 Kirromycin (24) aus *S. collinus* Tü 365 ... 83
6.3 Bioaktivität von Kirromycin (24) ... 86
6.4 Biosynthese von Kirromycin (24) ... 89
6.5 Screening der genetisch veränderten Stämme ... 104
6.6 Ausblick und Diskussion ... 118
7 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE ... 120
7.1 *Streptomyces* sp. Tü 6077 − Spirodionsäure (23) ... 120
7.2 Biosynthesestudien an Kirromycin (24) ... 123
B EXPERIMENTELLER TEIL ... 125
8 ALLGEMEINES ... 125
8.1 Instrumentelle Analytik ... 125
8.2 Chromatographische Methoden ... 126
8.3 Mikrobiologische Methoden ... 129
9 PRODUZENT *STREPTOMYCES* SP. TÜ 6077 UND METABOLITEN ... 134
9.1 Stammhaltung und Kultivierung ... 134
9.2 Variationen der Aufarbeitung ... 139
9.3 Isolierung von Spirodionsäure (23) und Sekundärstoffen (29, 30) ... 141

9.4 Charakterisierung der Metaboliten (23, 29 und 30) ... 142
10 UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE VON SPIRODIONSÄURE (23) ... 145
10.1 Fermentationskurve ... 145
10.2 Fütterungsexperimente mit markierten Vorläufern ... 146
10.3 Vorläufer-dirigierte Biosynthese ... 147
11 DERIVATISIERUNGSARBEITEN AN SPIRODIONSÄURE (23) ... 148
11.1 Derivate von Spirodionsäure (23) ... 148
11.2 Chemischer Vergleich zwischen nativer und synthetischer Spirodionsäure (23, 50) und deren Derivate (51a, 51b) ... 150
12 DER KIRROMYCIN-PRODUZENT *S. COLLINUS* TÜ 365 ... 152
12.1 Kultivierung und Aufarbeitung ... 152
12.2 Isolierung und Charakterisierung von Kirromycin (24) ... 153
12.3 Biosyntheseuntersuchungen an Kirromycin (24) ... 157
12.4 Derivatisierung von Kirromycin ... 159
13 SCREENING AUSGEWÄHLTER MUTANTEN-STÄMME DES KIRROMYCIN-PRODUZENTEN ... 161
13.1 Kultivierung und Aufarbeitung ... 161
C LITERATURVERZEICHNIS ... 164

A Theoretischer Teil

1 Einleitung

1.1 Biosyntheseuntersuchungen − bedeutendes Werkzeug der Naturstoffforschung

Die Natur ist einzigartig und enthält verschiedenartige Organismen, die eine Fülle von organischen Verbindungen synthetisieren. Das Gebiet der Naturstofforschung beschäftigt sich mit der Untersuchung dieser von Lebewesen produzierten Metaboliten. Neben der Suche nach neuen Wirkstoffen befasst sich dieser Forschungszweig auch mit Biosyntheseuntersuchungen. Hierbei liegt der Schwerpunkt auf der Identifizierung der Vorläufer und ihrer Reaktionssequenzen zum fertigen Naturstoff. Zwischenprodukte der Biosynthesewege werden in den Naturstoff umgewandelt, und Regulationsmechanismen sowie die an der Biosynthese beteiligten Gene und Enzyme bestimmen die Produktpalette. Die Aufklärung der Biosynthese von Sekundärstoffen kann außerdem wertvolle Beiträge leisten, Strategien für die Totalsynthese des entsprechenden Naturstoffs zu entwickeln. Ein Beispiel dafür ist die von NICOLAU et al. entwickelte Totalsynthese von Hybocarpon (**1a**), die auf einer Biosynthesehypothese beruht.

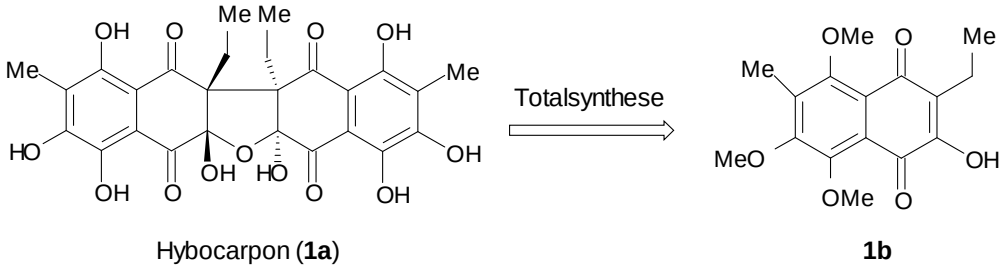


Abbildung 1: Struktur von Hybocarpon (1a) und seinem postulierten Vorläufer Naphthazarin (1b).

Hierbei wurde davon ausgegangen, dass die Biosynthese von **1a** über dieDimerisierung eines

Naphtharazin-Vorläufers (**1b**) verläuft, welche durch einen Ein-Elektronen-Übergang (SET = single electron transfer) initialisiert und von einer Hydratisierung gefolgt wird.[1, 2]

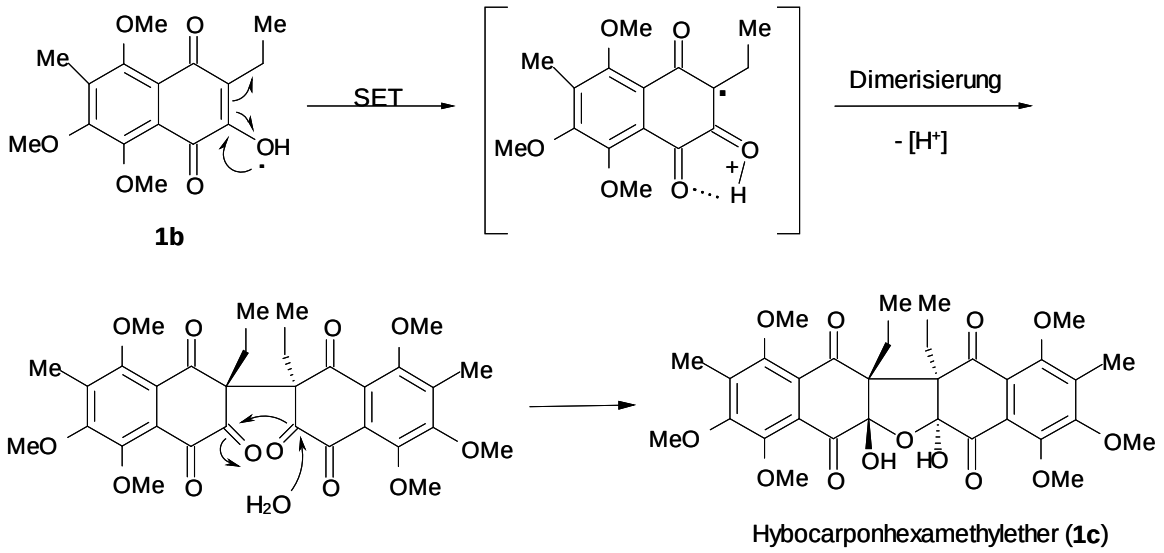


Abbildung 2: Dimerisierungs-Hydratisierungs-Kaskade von Naphthazarin <u>1b</u> zu Hybocarponhexamethylester (<u>1c</u>), initiiert durch einen Ein-Elektronen-Übergang. [1, 2]

Gezielte Eingriffe (z. B. in Form von Vorläufer-dirigierter Biosynthese) in die biologische Herstellung bekannter Naturstoffe ermöglichen die Produktion von Analoga des jeweiligen Naturstoffs,. Durch die Sequenzierung von Biosynthesegenclustern ist heute die Untersuchung des Aufbaus von Sekundärmetaboliten auf molekularer Ebene möglich. Die daraus resultierenden Ergebnisse können dann, z. B. in der kombinatorischen Biosynthese zur Erzeugung neuer Sekundärstoffe genutzt werden, indem man gezielt in die Art und Abfolge der Gene, die für die Produktion verantwortlich sind, eingreift.[3] In Abbildung 3 wird das Prinzip der kombinatorischen Biosynthese schematisch am Beispiel von Glykosyltransferasen (GT) dargestellt.

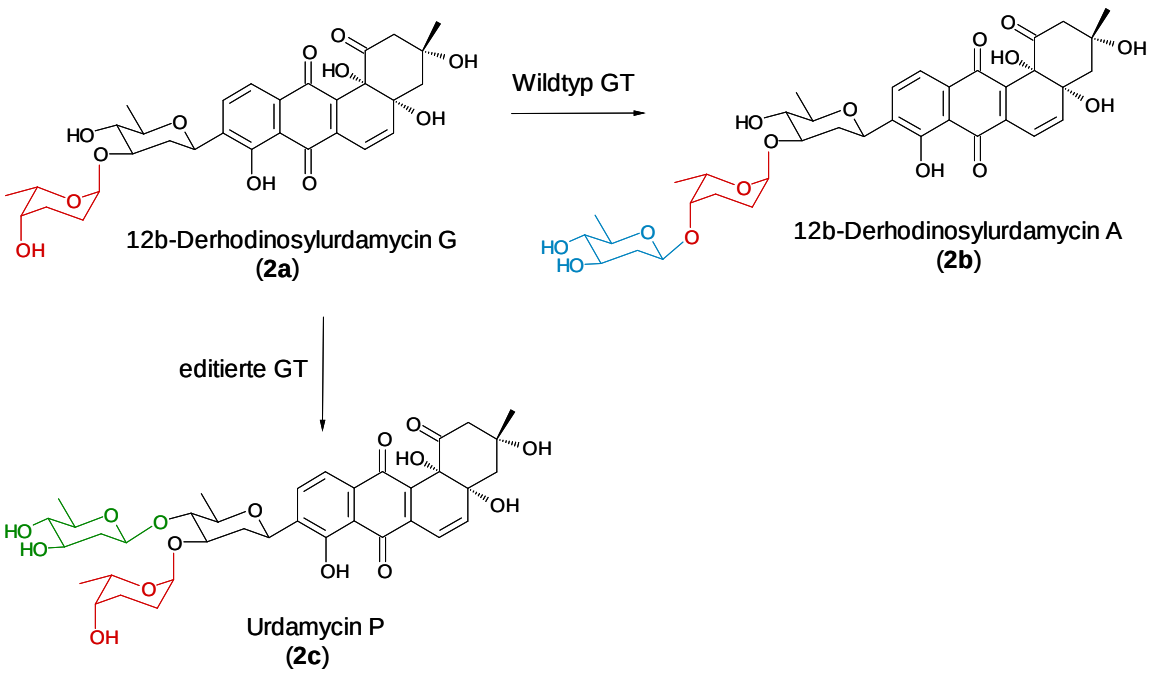


Abbildung 3: Herstellung eines Urdamycin-Derivates (2c) mit neuartig verzweigter Saccharidstruktur nach Expression eines gentechnisch veränderten Glykosyltransferase-Gens. [aus D. HOFFMEISTER et al. [3]]

Am Urdamycin gelang erstmals die *in-vitro*-Evolution von Glykosyltransferasen. Neue, auf genetischer Veränderung basierende Enzyme zeigten eine hohe Flexibilität hinsichtlich ihrer Substrate auf. Die neuen Enzyme ermöglichen die Ausbildung einer verzweigten (Urdamycin P (**2c**)) anstelle einer linearen Saccharidstruktur (12b-Derhodinosylurdamycin (**2b**)).[3] Zur Durchführung von klassischen Biosynthesestudien werden verschiedene Techniken verwendet, die oft aufeinander aufbauen oder sich ergänzen. Zu Beginn biosynthetischer Untersuchungen steht die Aufklärung der Biogenese des Naturstoffes. Da Sekundärstoffe aus Bausteinen des Primärstoffwechsels stammen, muss die Identifizierung der entsprechenden Quellen, z. B. Carbonsäure-, Aminosäure- oder Kohlenhydratpool, welche am Aufbau des strukturellen Grundgerüstes eines Sekundärstoffes beteiligt sind, erfolgen. Anschließend wird auf Grund der strukturellen Merkmale des Metaboliten ein Biosyntheseweg postuliert. Für Fütterungsexperimente werden putative Vorläufer mit stabilen Isotopen wie ^{2}H, ^{13}C, ^{15}N und ^{18}O ausgewählt. Der Fermentationskultur des zu untersuchenden Produzenten hinzugefügt, dann isoliert man den angereicherten Naturstoff und bestimmt dessen Anreicherung. Mittels NMR-Spektroskopie. Fütterungsexperimente mit radioaktiv markierten Vorläufern, die eine hohe Empfindlichkeit zeigen, werden heutzutage fast nur noch bei höheren Pflanzen angewendet, da sich auf Grund des pflanzlichen Metabolismus die Sekundärstoffe nur sehr langsam und in sehr geringen Mengen bilden.[4-6] Diese Art der Biosyntheseuntersuchung ist

sehr aufwendig, da die genaue Einbaustelle des radioaktiven Vorläufers erst nach chemischen Abbaureaktionen bestimmt werden kann. Bei Kultivierungsansätzen mit Zugabe von markierten Vorläufern mit stabilen Isotopen ergibt sich die Position der eingebauten Isotope aus NMR-Experimenten. Ein erfolgreicher Einbau von ^{18}O-Sauerstoff bewirkt einen Hochfeldshift des benachbarten ^{13}C-NMR-Kohlenstoffsignals. Der Einbau von ^{13}C-markierten Vorläufern führt zu einer Intensitätszunahme der Signale oder ^{13}C,^{13}C-Kopplungen. So kann z.B. die Analyse der resultierenden Kopplungskonstanten eines Fütterungsexperiments mit [1,2-$^{13}C_2$]Acetat, Aufschluss darüber geben, ob eine angereicherte C_2-Einheit mit beiden Kohlenstoffatomen der angereicherten C_2-Einheit während des Aufbaus vom Metaboliten intakt eingebaut wurde, oder ob sie getrennt und auf unterschiedlichen biosynthetischen Wegen in das Molekül eingebracht worden sind.[7] Der aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* isolierte Sekundärstoff Leupyrrin A_1 (**3**) ist ein Beispiel für eine komplexe Biosynthese, deren Bausteine aus grundlegend verschiedenen Stoffwechselwegen stammmen.

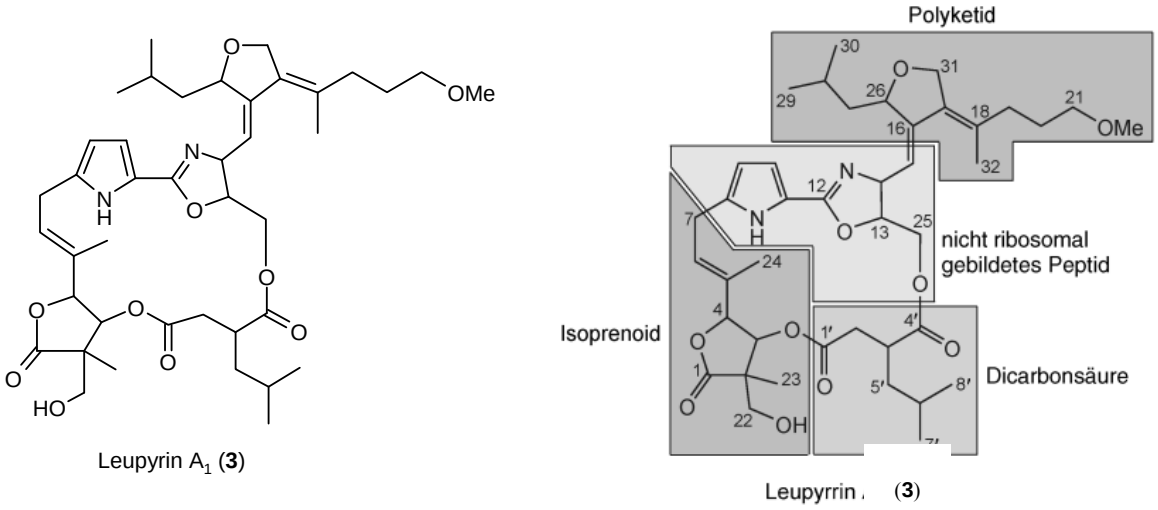


Abbildung 4: Struktur und biosynthetischer Ursprung von Leupyrrin A_1 (3). [aus H. B. BODE et al. [8, 9]]

Die Biosynthese von Leupyrrin A_1 (**3**) umfasst sowohl die Kondensation von Aminosäuren und Carbonsäuren als auch die Isoprenoidbiosynthese, wobei alle Strukturelemente noch weiter modifiziert werden, und dann das Makrodiolid-Grundgerüst bilden.[8, 9]

Bei genetisch orientierten Biosyntheseuntersuchungen müssen zuerst die für die Biosynthese verantwortlichen Gene identifiziert werden. Zum Auffinden des Biosynthese-Genclusters wird meist eine Cosmidbank angelegt. Dazu werden die DNA-Fragmente in ausgewählte Vektoren ligiert und mit diesen entweder bekannte Wirtsorganismen (heterologe Expression) oder der ursprüngliche Produzentenstamm transformiert. Anschließend können diese auf Produktion des Naturstoffs getestet werden und das dazugehörige Cosmid und die

entsprechend benachbarten Regionen sequenziert werden. Auf Grund der Größe von Biosynthesegenclustern (bis zu 100 kb), stellt sich die Methode der heterologen Expression als sehr schwierig und zeitaufwendig heraus. Bei der Alternative der Suche nach Biosynthese-Genclustern mithilfe spezifischer DNA-Sonden werden bekannte Enzymreaktionen zugrunde gelegt. Bei Identifizierung eines Biosynthesegens hat man die Möglichkeit über Sequenzähnlichkeiten bekannter Gene in Datenbanken dem Genabschnitt enzymatische oder regulatorische Funktionen zuzuweisen, die in Einzelfällen jedoch eines Nachweises mit biochemischen und enzymatischen Methoden bedarf.[10] Ein interessantes Beispiel für genetisch orientierte Biosyntheseuntersuchungen ist die Arbeit von H. B. BODE et al. an dem Naturstoff Myxalamid B (**4**) aus *Myxococcus xanthus*. Durch die Herstellung von Knock-out-Mutatanten war es ihnen möglich den Myxalamid-Biosynthese-Gencluster aufzuklären und über Kombinatorische Biosynthese neuartige Myxalamide herzustellen.[11] Es gelang durch Zufütterung verschiedener kurzkettiger Säuren insgesamt neun neue Derivate der Myxalamide zu erzeugen.

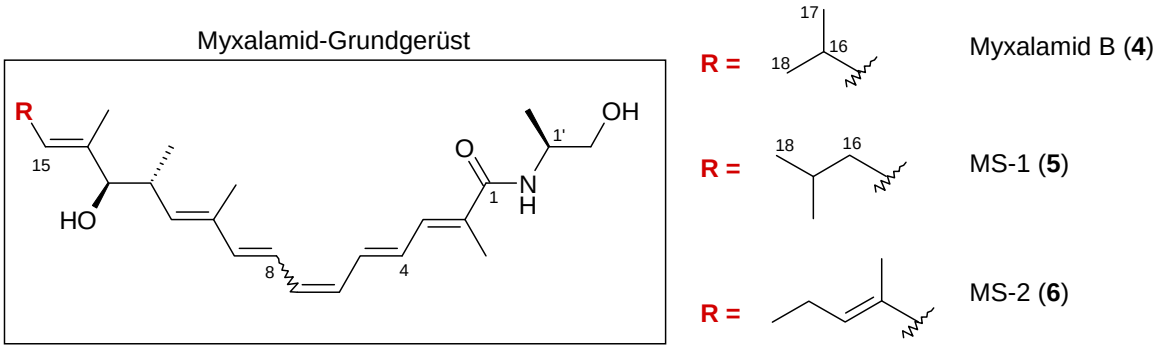


Abbildung 5: Chemische Struktur von Myxalamid B (4) und zwei durch Kombinatorische Biosynthese erzeugte Derivate MS-1 (5) und MS-2 (6).

1.2 Diels-Alder Reaktionen in der Natur

Die Diels-Alder-Reaktion, benannt nach Otto Diels (*1876, Hamburg) und Kurt Alder (*1902, Chorzów), ist eine [4+2]Cycloaddition, die ein leistungsfähiges Verfahren in der organischen Synthese zur Knüpfung von Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen darstellt. Sie ermöglicht einen einfachen und stereospezifischen Zugang zu sechsgliedrigen Ringsystemen. Hierbei können bis zu vier Stereozentren in einem Schritt aufgebaut werden.[12, 13] Seit den 70er Jahren wird dieser Reaktionstyp auch für den Aufbau einiger Sekundärmetaboliten postuliert und diskutiert.[14, 15] In einigen Fällen gibt es sogar Hinweise darauf, dass es sich um Diels-Alderase-katalysierte Biosynthesen handelt.[16]

Die Katalyse von Diels-Alder-Reaktionen durch Biomoleküle wurde erstmalig von HILVERT et al. diskutiert. Hier erzielten sie die Katalyse einer Diels-Alder-Reaktion durch monoklonale Antikörper.[17] Das Konzept einer Diels-Alder-Cycloadditon in der Natur wird kritisch diskutiert und ist ein aktuelles Forschungsgebiet.[18-26] Im Folgenden werden ausgewählte Naturstoffe im Detail beschrieben, für deren Biosynthese Diels-Alder-Reaktionen vorgeschlagen wurden.

1.2.1 Lovastatin (7)

Lovastatin (**7**) ist ein pilzlicher Sekundärmetabolit, der erstmalig aus *Aspergillus terreus* isoliert werden konnte.[27] Dieser Naturstoff, auch unter den Namen Mevinolin bekannt, ist ein effektiver Hemmstoff der Cholesterin-Biosynthese beim Menschen (HMG-Coenzym-A-Reduktase Inhibitor) und ein sehr erfolgreiches Medikament, welches z.B. unter dem Produktnamen Mevacor® vertrieben wird.[28] Die Einzelschritte der Biosynthese von Lovastatin (**7**) sind weitgehend bekannt. Es handelt sich um ein Polyketid, welches aus Malonat- und Acetateinheiten aufgebaut wird.[29] Biosynthesestudien mittels Fütterungsexperimenten mit isotopenmarkiertem Acetat und Methionin zeigten, dass Lovastatin (**7**) aus einer C_{18}- und einer C_4-Einheit aufgebaut wird. Spätere Fütterungsexperimente mit [1-$^{13}C^{18}O_2$]Acetat und ein Kultivierungsansatz unter $^{18}O_2$-Atmosphäre konnten die Herkunft der fünf Sauerstoffatome im Molekül bestimmen.[30, 31] Die Sauerstoffatome an den Kohlenstoffatomen C-1', C-11, C-13 und C-15 stammten aus Acetat

und das Sauerstoffatom an C-8 aus molekularem Sauerstoff.

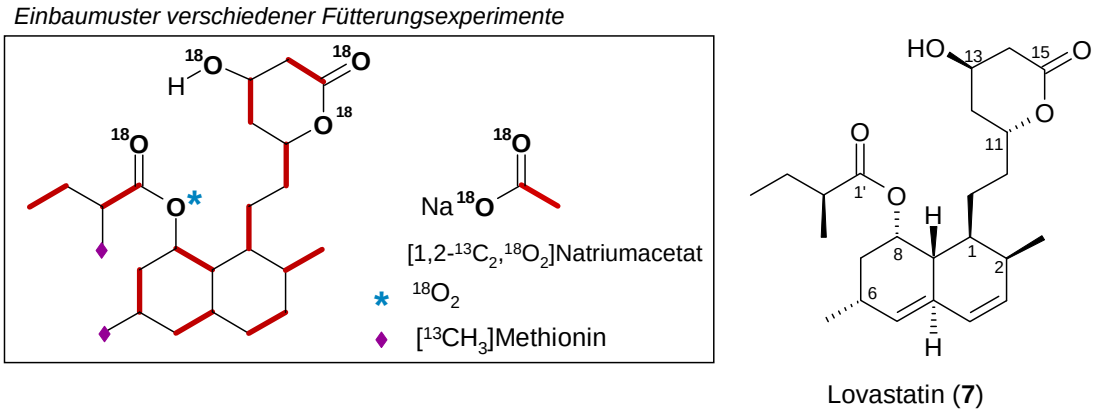


Abbildung 6: Einbaumuster isotopenmarkierter Vorläufer in Lovastatin (7). [30, 31]

Basierend auf den Einbauergebnissen formulierten VEDERAS et al. eine Biosynthesehypothese, in der das Lovastatin-Grundgerüst **9** durch eine Kondensation von Acetat, über Malonat zum Trien **8** mit anschließender *endo*-selektiver Diels-Alder-Cycloaddition aufgebaut werden konnte (siehe Abbildung 7).[30-32]

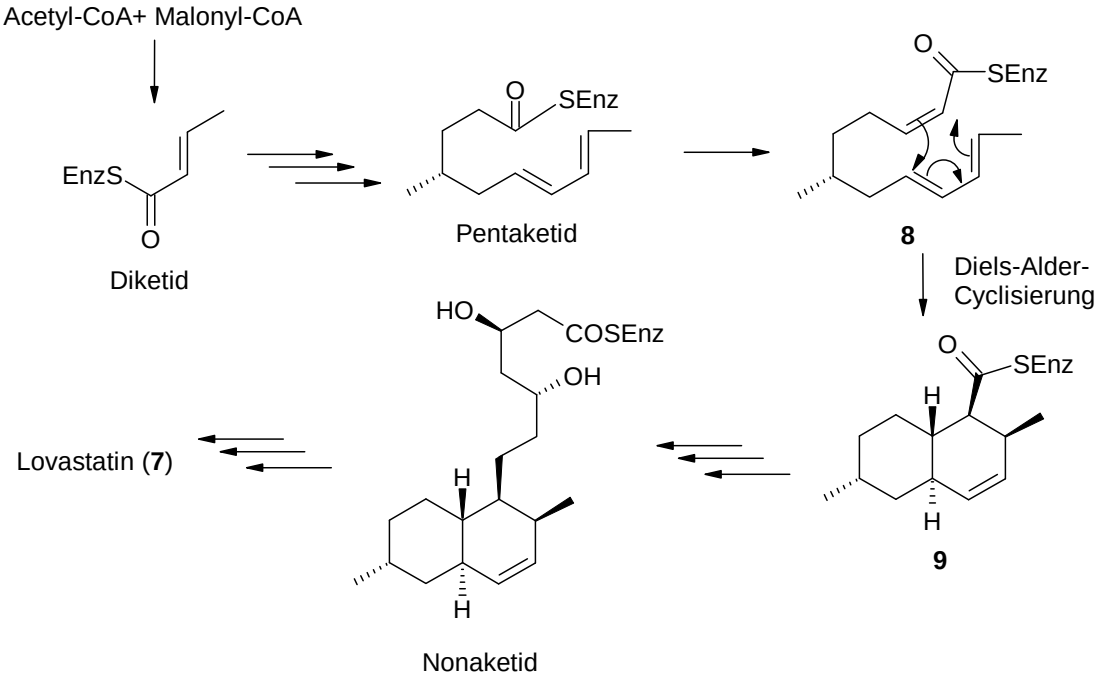
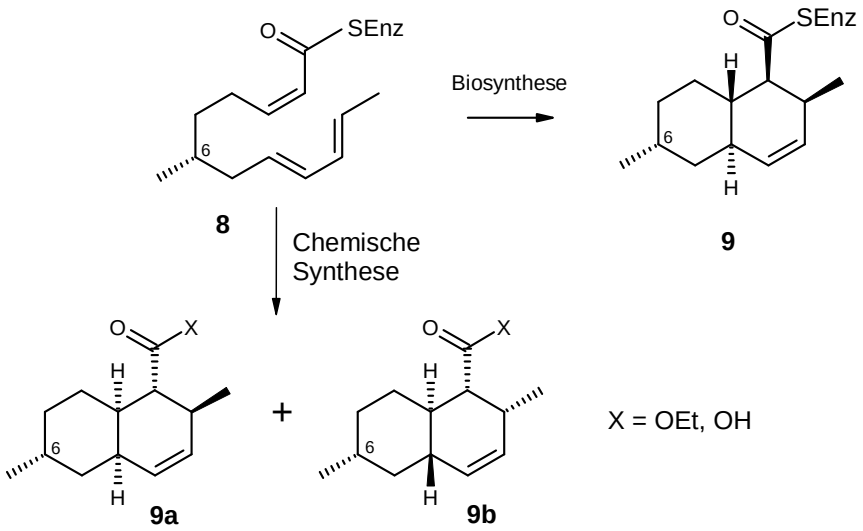


Abbildung 7: Hypothese zum Verlauf der Biosynthese von 7, katalysiert durch LNKS (Lovastation Nonaketid Synthase). [30-32]

Diese Hypothese wurde überprüft, indem zwei Syntheseansätze verfolgt wurden:

Analoga des Lovastatin-Decalin-Gerüstes **9** sollten einerseits thermisch und andererseits Lewis-Säure-katalysiert hergestellt werden. Innerhalb dieser Synthesestudie gelang es jedoch

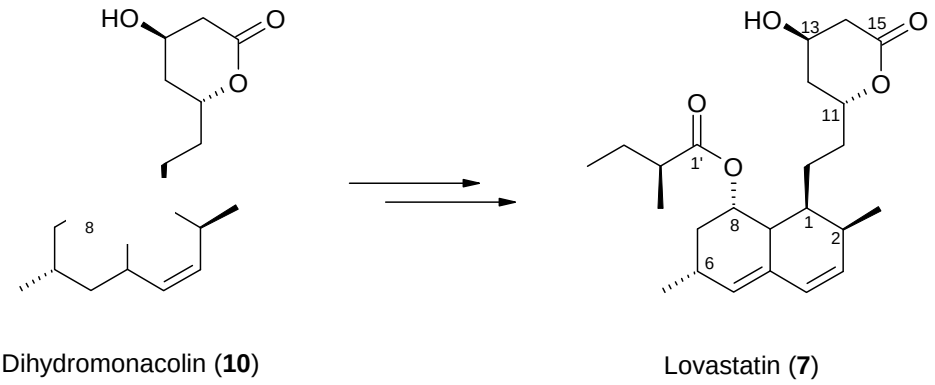
nur zwei der denkbaren Stereoisomere zu synthetisieren. Das Fehlen des Stereoisomers, welches die gleiche absolute Konfiguration wie das Lovastatin-Grundgerüst **9** aufweist, legte daher den Verdacht nahe, dass bei der Biosynthese von Lovastatin (**7**) eine enzymkatalysierte Diels-Alder-Reaktion vorliegt.



thermisch:	1	:	1
Lewis-Säure:	9	:	1

Abbildung 8: Synthese des Decalin-Gerüstes (9) von Lovastatin (7). [30-32]

Genetische Arbeiten am Biosynthesegencluster von Lovastatin (**7**) führten zur Isolierung der ersten natürlichen Diels-Alderase (*lovB* bzw. **L**ovastatin **N**ona**k**etid **S**ynthase (LNKS)) in Reinform, deren enzymatische Aktivität durch Zugabe der vermuteten Cycloadditonsstufe **8** getestet wurde.[29, 32] Somit findet die Biosynthese von Lovastatin (**7**) durch eine iterative PKS vom Typ I, die **L**ovastatin **N**ona**k**etid **S**ynthase (*lovB* bzw. LNKS), und einer zusätzlichen Enoylreduktase (*lovC*), deren Funktion bisher nicht geklärt ist, statt. Ausgehend von Malonyl-CoA und acht Einheiten Acetyl-CoA bildet sich zunächst das Nonaketid Dihydromonacolin L (**10**), welches durch Oxidation von Kohlenstoffatom C-8 zum sekundären Alkohol und Veresterung mit 2-Methylbuttersäure zu Lovastatin (**7**) führt (siehe Abbildung 9).



Dihydromonacolin (**10**) Lovastatin (**7**)

Abbildung 9: Postulierter Biosyntheseweg zu Lovastatin (7). [30-32]

Der bisherige Forschungsstand bezüglich der Lovastatin-Biosynthese, insbesondere die Isolierung der Lovastatin-Nonaketidsynthase weisen stark auf das Vorhandensein einer natürlichen Diels-Alderase-Aktivität hin. Aber ebenso kann angenommen werden, dass durch die Bildung einer enzymgebundenen reaktiven Trien-Zwischenstufe, wie es im Falle der PKS-Metaboliten gegeben ist, an der Enzymoberfläche eine hohe Stereoselektivität für dieCyclisierungsreaktion induziert wird. Eine ganz bestimmte Gensequenz wie ein ORF (open reading frame) kann der Diels-Alder-Aktivität nämlich derzeitig nicht zugeordnet werden.

1.2.2 Solanapyron A (11)

Solanapyron A (**11**) ist ein Phytotoxin des pathogenen Pilzes *Alternaria solani*, das von ICHIHARA et al. erstmalig 1983 isoliert wurde.[33] Durch biosynthetische Studien mittels Fütterungsexperimente mit isotopenmarkierten Acetat und Methionin konnte der Ursprung aller Kohlenstoffatome in Solanapyron A (**11**) aufgeklärt werden.[34]

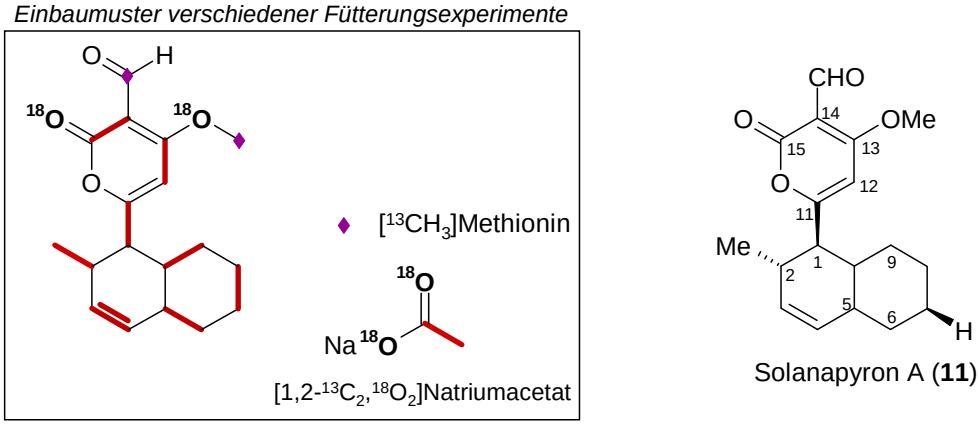


Abbildung 10: Einbau von isotopenmarkierten Acetat und Methionin in Solanapyron (11). [34]

Der Kultivierungsansatz mit Zugabe von [1-^{13},C^{18}O$_2$]Acetat führte zu einer deutlichen Anreicherung der Kohlenstoffatome C-13 und C-15, die auf Grund der ^{18}O-Markierung ihrer benachbarten Sauerstoffatome im ^{13}C-NMR Spektrum hochfeldverschoben waren. Zusätzliche Fütterungsexperimente mit [1-^{13}C,2-^{2}H$_3$]Acetat und [2-^{13}C,2-^{2}H$_3$]Acetat führte zur Aufklärung der Herkunft der im Molekül vorhandenen Wasserstoffatome. Ebenso weist das Vorliegen des (*pro-S*)-^{2}H-Wasserstoffatoms an C-7 auf die Beteiligung einer Enoylreduktase hin.[35, 36] Die erhaltenen Einbaumuster mit entsprechenden Konfigurationen ließen sich mit der Annahme vereinbaren, dass das Decalingrundgerüst von **11** durch eine Diels-Alder-Reaktion aufgebaut wird (siehe Abbildung 11).[37]

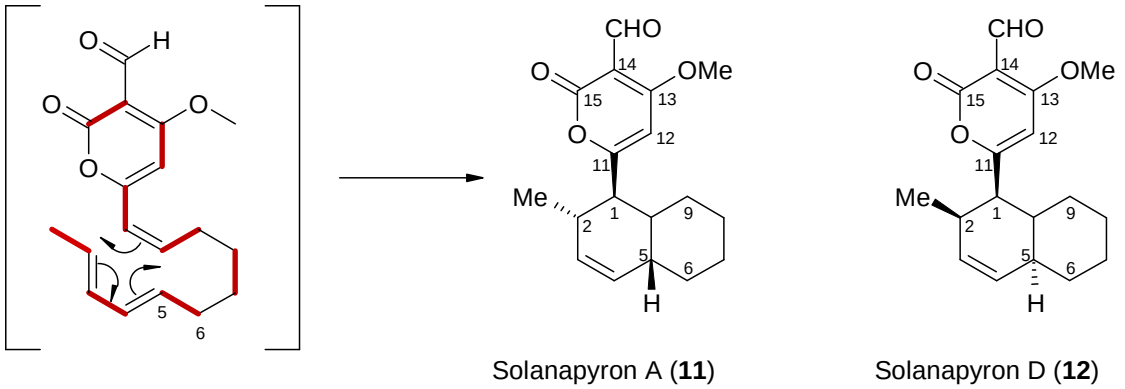


Abbildung 11: Postulierte Diels-Alder-Cyclisierung für die Biosynthese von Solanapyron A (11).

Auch die Isolierung von Solanapyron D (**12**), ein Diastereomer von **11** unterstütze die postulierte Biosynthesehypothese einer Diels-Alder-Reaktion. Betrachtet man die Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung zwischen C-5 und C-6, so erkennt man eine freie Drehbarkeit, die zu einem *exo*- und *endo*-Cycloaddukt führen könnte.[37] Die Enzymaktivität

der putativen Diels-Alderase wurde auch im zellfreien Extrakt von *Alternaria solani* nachgewiesen, wobei die Umsetzung des Vorläufers Prosolanapyron II (**13**) zu Solanapyron A (**11**) und Solanapyron D (**12**) katalysiert wurde. Die *exo*- oder *endo*-Cycloaddukte wurden in einem Verhältnis von 53:47 mit einer Gesamtausbeute von 25% gebildet (siehe Abbildung 12). In einem Kontrollexperiment mit denaturiertem Enzym betrug das *exo*/*endo*-Verhältnis 3:97 bei einer Ausbeute von 10%. Das Kontrollexperiment zeigte eine deutlich höhere Bildung des *endo*-Produktes, welches einen thermodynamisch stabileren Übergangszustand hat. Ebenso konnte eine Unterdrückung der enzymatischen Cycloaddition von Prosolanapyron II (**13**) unter reiner Argonatmosphäre beobachtet werden. Dieses Ergebnis und die beobachtete Stereoselektivität im zellfreien System wurden dahingehend interpretiert, dass sie ein Anzeichen für eine Enzymaktivität sind.[38] Genetische Untersuchungen könnten bei der Solanapyron-Biosynthese weitere Ergebnisse bezüglich einer hypothetischen Diels-Alderase-Aktivität bringen.

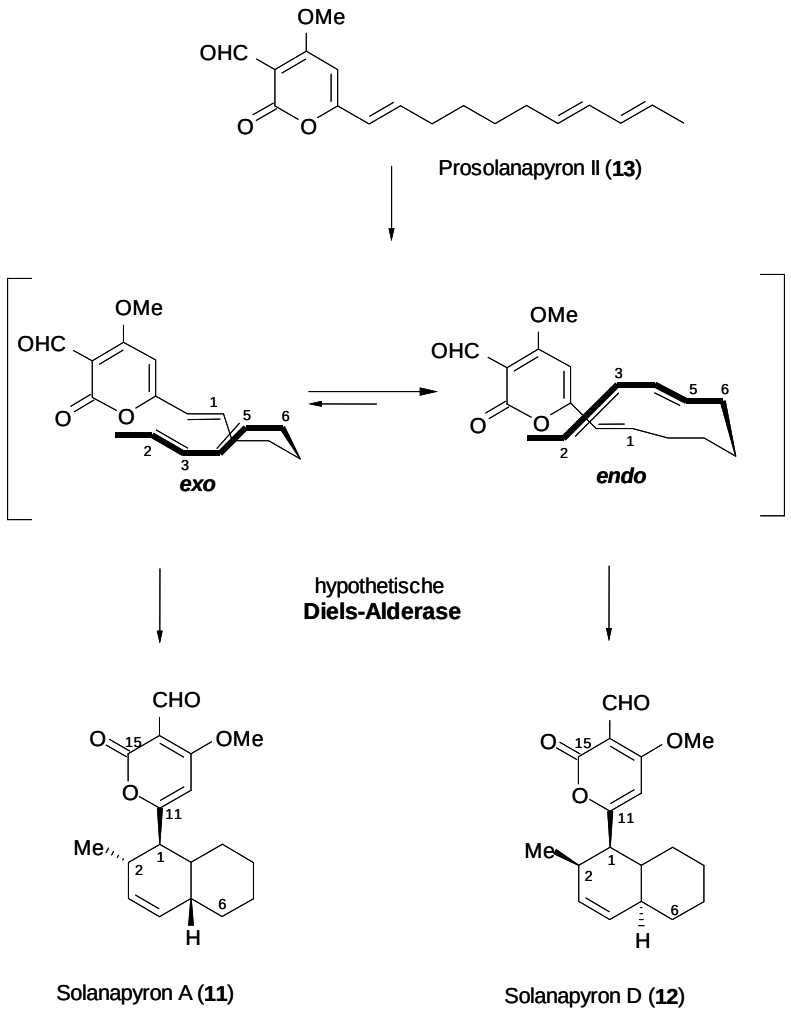


Abbildung 12: Biosynthesehypothese der Solanapyrone A (11) und D (12).

1.2.3 Betaenon B (14)

Ein weiteres Phytotoxin, Betaenon B (**14**), wurde 1983 von ICHIHARA et al. aus *Phoma betae* isoliert.[39] Dieser Pilz infiziert Zuckerrüben und ist der Auslöser der Blattfleckenkrankheit. Der Aufbau des polyketidischen Decalin-Gerüstes und die Isolierung eines Betaenon-Derivats, Diplodiatoxin (**15**), weckte Interesse an der Biosynthese. Fütterungsexperimente mit [1-^{13}C,^{18}O$_2$]Acetat führten zu signifikanten Anreicherungen in **14** und klärten den Ursprung des Sauerstoffatoms an C-16 mittels ^{13}C-NMR Spektroskopie. An dem Kohlenstoffatom C-18 konnte keine durch das Sauerstoffisotop (^{18}O) induzierte Verschiebung ins Hochfeld beobachtet werden. Fehlende Markierungen könnten aber z. B. durch Austauschreaktionen mit Wasser verursacht sein (siehe Abbildung 13).

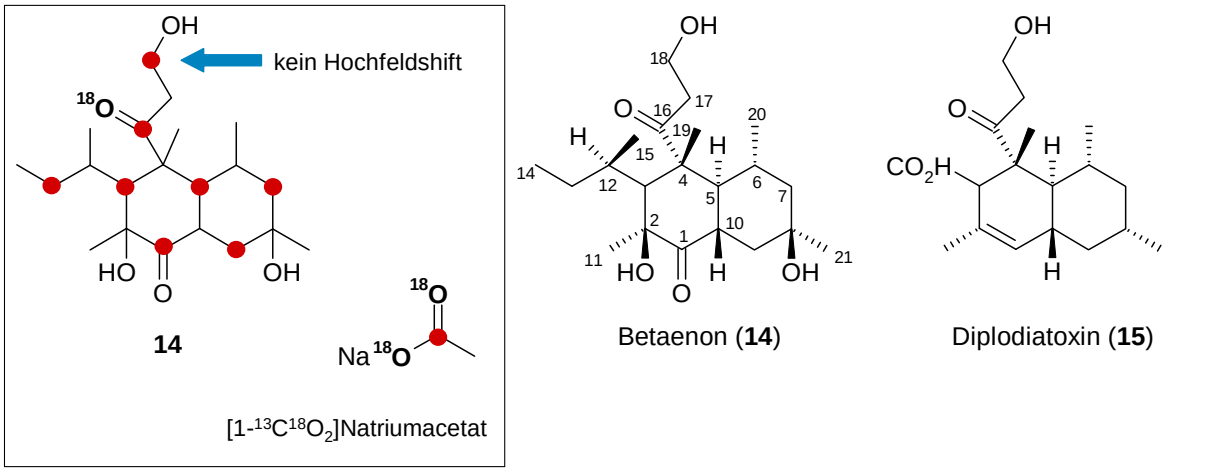


Abbildung 13: Einbaumuster isotopenmarkierter Vorläufer in Betaenon (14) und Betaeneon-Derivat Diplodiatoxin (15).

Probetaenon I (**16b**), ein desoxygeniertes Derivat von und mögliche Vorstufe von Betaenon B (**14**) konnte bei Kultivierungsexperimenten unter Zugabe des P_{450}-Inhibitors Ancymidol (**17**) isoliert werden. Die Produktion von Betaenon (**14**) wurde proportional zur Inhibitormenge gehemmt. Auf Grund dieser Ergebnisse postulierten OIKAWA et al. eine intramolekulare Diels-Alder-Reaktion des Intermediats **16a**, welche über **16b** zu Betaenon (**14**) führt.[40]

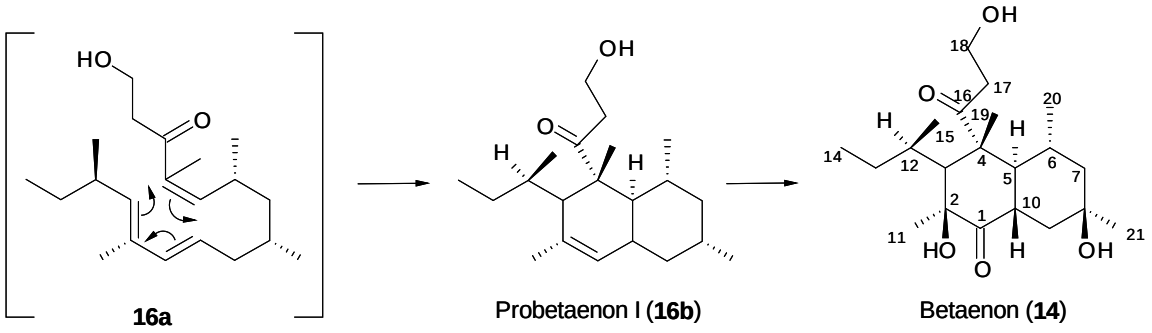
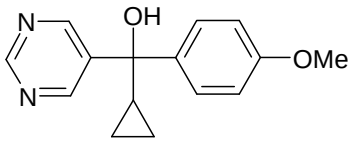
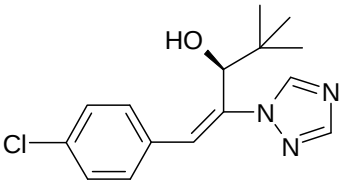


Abbildung 14: Hypothese: Biosynthese von 14 über das Intermediat (16a) und den Vorläufer 16b.

Durch weitere Kultivierungsansätze unter Zugabe isotopenmarkierter Vorläufer in Gegenwart des P_{450}-Oxygenase-Inhibitors SD-3307D (**18**) gelang es OIKAWA et al. isotopenmarkiertes Probetaenon I (**16b**) zu isolieren. Nachfolgende Zufütterung der so erhaltenen Isotopomere von **16b** führte zur oxidativen Umwandlung dieser Vorstufen in Betaenon (**14**).[41]



Ancymidol (**17**)

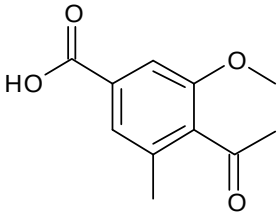


SD-3307D (**18**)

Die Synthese von **16b** durch eine intramolekulare Diels-Alder-Reaktion bestätigte dessen Struktur und untermauerte außerdem die Biosynthesehypothese.[42]

1.2.4 Makrophomsäure (19)

Makrophomsäure (**19**) ist ein Metabolit aus dem Pilz *Macrophoma commelinea*. Bezüglich seiner Biosynthese wurden an diesem kleinen, aber strukturell ungewöhnlichen Sekundärstoff detaillierte Untersuchungen durchgeführt. Auch hier wird nämlich diskutiert, dass sein Kohlenstoffgerüst über eine intermolekulare Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf oder über eine Michael-Aldol-Reaktion aufgebaut wird.



Makrophomsäure (**19**)

2003 gelang es OSE et al. die Kristallstruktur der Makrophomat-Synthase, einem Homodimer mit einer Größe von 36 kDa, zu

identifizieren. Dieses Protein katalysiert eine fünfstufige Umsetzung mit zwei Decarboxylierungen, zwei Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungsknüpfungen und einer Dehydrierung.[26] WATANABE et al. untersuchten die katalytische Aktivität der Makrophomat-Synthase, in dem sie diese mit Oxalacetat und verschiedenen 2-Pyronen inkubierten. Die gebildeten Produkte wiesen ebenfalls auf das Vorhandensein eines Enzyms hin, das Diels-Alder-artige Reaktionen katalysierte.[26, 43]

Trotzdem gibt es zwei mögliche Mechanismen für die C-C-Bindungsknüpfung.[26] Die erste Möglichkeit ist eine zweistufig ablaufende Michael-Aldolreaktion, wobei der Angriff eines gebildeten Enolats (**20**) die C-C-Bindung aufbaut und die negative Ladung an dem 2-Pyron (**21**) durch Delokalisation stabilisiert ist. Darauf folgend greift das Enolat die neu entstandene Carbonylfunktion an , so dass sich ein bicyclisches Intermediat **22** ausbildet. Hieraus entsteht unter Dehydratisierung und Decarboxylierung Makrophomsäure (**19**) (siehe Abbildung 15).

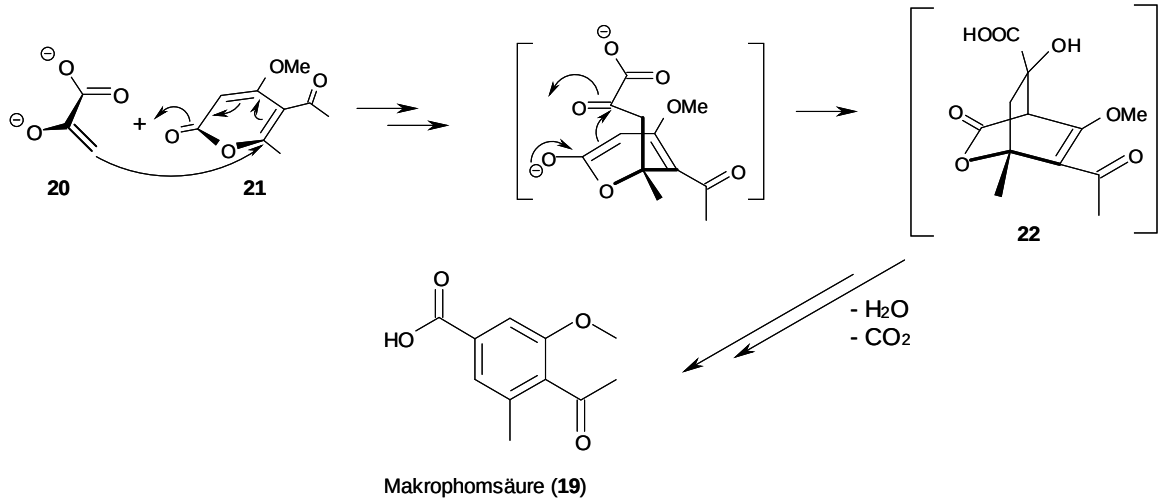


Abbildung 15: Bildung der Makrophomsäure (19) über eine doppelte Michael-Aldolreaktion.

Im zweiten Fall könnte die Cyclisierung über eine „echte konzertierte“ Diels-Alder-Reaktion ablaufen, wobei das bicyclische Intermediat **22** durch das Enzym stabilisiert werden würde (siehe Abbildung 16) und die Decarboxylierung und Dehydratisierung eine Triebkraft der Reaktion wären.

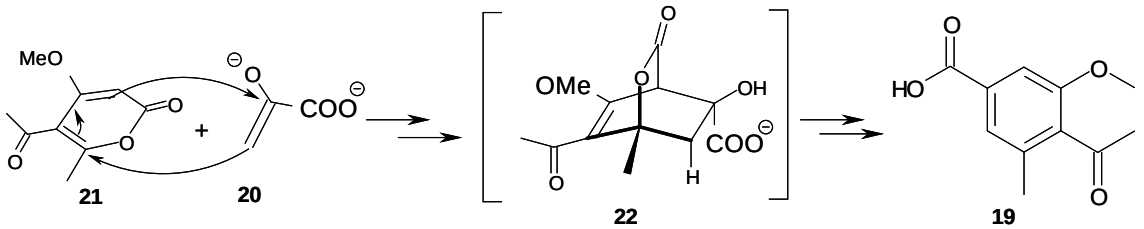


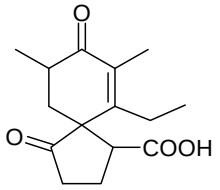
Abbildung 16: Bildung der Makrophomsäure (19) über eine Diels-Alder-Cyclisierung.

Die Bildung der Makrophomsäure (**19**) ist beispielhaft für den Stand der Forschung bezüglich der Existenz von Diels-Alderasen. Obwohl es OSE et al. gelungen ist, die Kristallstruktur der Makrophomat-Synthase mit Substrat aufzuklären, kann die Möglichkeit einer Michael-Aldol-Reaktion immer noch nicht ausgeschlossen werden.[21, 22] Theoretische Studien an der Kristallstruktur zeigten nämlich, dass eine Michael-Aldol-Reaktion im Gegensatz zu einer konzentrierten [4+2]Cycloaddition energetisch begünstigt und damit wahrscheinlicher ist.[44]

Neben den bereits beschriebenen Naturstoffen gibt es noch weitere Beispiele für mögliche Diels-Alder-vermittelte Biosynthesen in anderer Verbindungsklassen wie z.B. bei den Isoprenoiden oder Alkaloiden. Diese jedoch basieren auf Hypothesen, welche aus Ergebnissen totalsynthetischer Arbeiten stammen.[45-48]

2 Aufgabenstellung

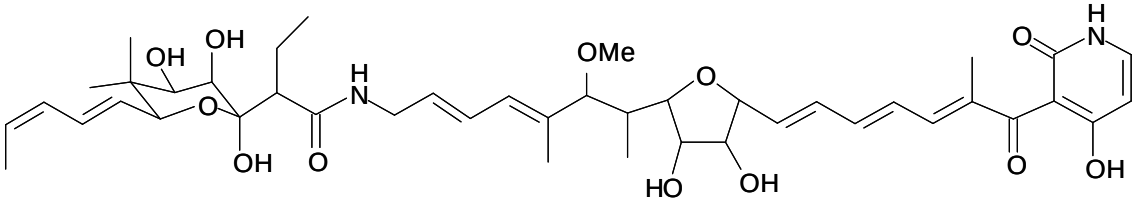
Im Rahmen eines physikochemischen Screenings mit Kulturextrakten von *Streptomyces* sp. Tü 6077 wurde aus dem Metabolitenspektrum die mit Anis/Schwefelsäure rosa anfärbbare Spirodionsäure (**23**) im Arbeitskreis von A. ZEECK isoliert.[49]



Spirodionsäure (**23**)

Die unter bakteriellen Naturstoffen einzigartige Struktur von Spirodionsäure (**23**) wurde mittels NMR- und MS-Analysen aufgeklärt, wobei die Bestimmung der absoluten Stereochemie nicht möglich war.[49] Die Biosynthese von **23** als erstem bakteriellen Spiro[4.5]decen war von außerordentlichem Interesse.

Ziel dieser Arbeit war es, für den Produzenten Tü 6077 optimale Kultivierungsbedingungen bezüglich einer hohen Produktion von **23** zu finden. Hierbei sollte auf die aus der Diplomarbeit stammenden Ergebnisse aufgebaut werden.[50] Durch Fütterungsexperimente mit isotopenmarkierten Vorläufern sollte die Biosynthesehypothese für **23** überprüft werden. Mittels chemischer Derivatisierung von **23** sollten neue Derivate geschaffen werden, um durch Kristallisation und anschließender Röntgenstrukturanalyse die absolute Konfiguration von **23** aufzuklären.



Kirromycin (**24**)

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten innerhalb einer Kooperation mit dem Arbeitskreis von T. WEBER (Universität Tübingen) biosynthetische Studien an dem Antibiotikum Kirromycin (**24**), welches die bakterielle Proteinbiosynthese hemmt, durchgeführt werden. Die Grundlage dieser Arbeiten stellte die erfolgreiche Identifizierung des Kirromycin-Biosynthese-Genclusters dar.[51] Fütterungsexperimente mit isotopenmarkierten Vorläufern sollten die aus der Analyse des Genclusters abgeleiteten Biosynthesehypothese zum Kirromycin (**24**) zweifelsfrei beweisen. Ebenso sollten Deletionsmutanten des Kirromycin-Produzenten mittels chemischen Screenings näher auf ihr Metabolitenspektrum untersucht werden.[51-54]

3 Der Produzent *Streptomyces* Tü 6077

3.1 Vorarbeiten

Der Stamm *Streptomyces* Tü 6077 wurde aus einer Erdprobe in Tübingen isoliert und von M. LANGBECKER auf seine Sekundärmetabolitenproduktion hin untersucht.[55] I. PAPASTAVROU analysierte sein Metabolitenmuster über ein physikochemisches HPLC-DAD-Screening (DAD = diode array detection). Sie prüfte im Rahmen ihrer Doktorarbeit, der aus Tübingen zur Verfügung gestellten Rohextrakt von Tü 6077. Aus dem Extrakt isolierte und charakterisierte sie Spirodionsäure (**23**), Griseolutein A (**25**) und Griseoluteinsäure (**26**), ebenso konnte sie die bereits aus dem Stamm bekannten Naturstoffe 3-Indolcarbonsäure und Desferrioxamin nachweisen. Die einzigartige Struktur von Spirodionsäure (**23**), deren Kern ein Spiro[4.5]decen ist, wurde von I. PAPASTAVROU mittels NMR- und MS-Analysen aufgeklärt, wobei ein Vorschlag zur Bestimmung der relativen Stereochemie gemacht wurde.[49]

Nachfolgend wurde der aus Tübingen zugesandte Stamm von J. von FRIELING bearbeitet. Hierbei galt es, den bisher nur in Tübingen kultivierten Produzenten in Göttingen zu fermentieren und die Kultivierungsbedingungen auf die höchste Ausbeute von Spirodionsäure (**23**) hin zu optimieren, um eine gute Basis für kommende Biosyntheseuntersuchungen zu schaffen. Hierbei lieferte eine Kombination von zwei Medien, SM- und SGG-Medium gute Ergebnisse. In dem gewählten SM-Medium wuchs die Vorkultur innerhalb von drei Tagen gut an. Der Wechsel zu SGG-Medium für die Hauptkultur führte bereits nach drei Tagen zu starkem Wachstum und erwies sich somit als sinnvoll. Die Vorarbeiten von J. von FRIELING ergaben, dass aus einem 500 mL Ansatz 3.4 mg Spirodionsäure (**23**) isoliert werden konnten. Die von J. von FRIELING erarbeiteten Bedingungen wurden im Rahmen der Diplomarbeit übernommen. Leider konnten seine Ergebnisse nicht reproduziert werden. Die eigenen Arbeiten zeigten, dass der Stamm Tü 6077 immer noch keine stabile Produktion von **23** aufwies, die Aufarbeitung und Isolierung von Spirodionsäure (**23**) weiterhin schwierig und zeitaufwendig war. Somit mussten weitere Kultivierungs- und Aufarbeitungsvariationen durchgeführt werden, die eine stabile Produktion und hohe Ausbeute von **23** liefern sollten.

3.2 Stammhaltung und Kultivierung

Der Einfluss von Nährmedienbestandteilen auf die Sekundärstoffproduktion, und insbesondere der starke Einfluss der Kohlenstoffquelle Glycerin kann z. B. an den Arbeiten von MAO et al. gezeigt werden. Sie untersuchten den Einfluss der Medienzusammensetzung in Bezug auf die Produktion des neuen Derivates CS101 von FR-008/Candicidin. Dabei verwendeten sie zur Analyse zwei statistische Methoden, nämlich das „Plackett-Burmann Design“, welches die Schlüsselkomponenten für die beste Medienzusammensetzung finden sollte und die RSM-Methode (RSM = response surface methodology), mit der die besten Konzentrationen der Medienkomponenten ermittelt wurden. Dabei zeigte es sich, das Glycerin, Pepton und Kupfersulfat einen signifikanten Einfluss auf die Produktion von CS101 ausübten. Mit optimierten Kultivierungsbedingungen konnten sie die Ausbeute von CS101 um das zehnfache erhöhen (191 mg/L).[56]

Wegen der stark schwankenden Produktion von Spirodionsäure (**23**) wurden sowohl die Bedingungen der Stammhaltung als auch die Kultivierungsbedingungen überprüft. Die Analyse der Agarplattenkultivierung sollte zeigen, ob gute Ausgangsbedingungen bezüglich der Produktion von **23** gegeben waren.

3.2.1 Stammhaltung

Im Rahmen der eigenen Diplomarbeit wurden die von J. VON FRIELING entwickelten Bedingungen übernommen. Der Stamm *Streptomyces* Tü 6077 wurde für 5 Tage auf SM-Agarplatten (Soja/Mannit) bei 28 °C inkubiert. Die Platten zeigten eine weiße, gut sporulierte Oberfläche. Die Stammhaltung fand bei 4 °C statt, wobei sich nach 2 - 3 Wochen Lagerung die weiße Oberfläche grau bis schwarz verfärbte und diese Platten als Animpfmaterial für Flüssigkultivierungen nicht mehr geeignet waren, da sie zu einer geringen Produktion von Spirodionsäure (**23**) führten. Nur maximal ein bis zwei Wochen alte Agarplatten, auf denen der Stamm Tü 6077 eine weiße Oberfläche zeigte, führten als Inokulum bei Flüssigkultivierungen zu guten Ausbeuten von **23**. Ältere Platten konnten für die Stammhaltung verwendet werden, wobei sie maximal 4 Monate bei 4 °C aufbewahrt wurden. Parallel erfolgte eine Langzeiterhaltung in flüssigen Stickstoff.

Der Einfluss des Nährmediums zur Agarplattenkultivierung wurde mittels einer Testreihe überprüft, wobei insgesamt zehn verschiedene Agrarplatten mit Tü 6077 angeimpft wurden.

Dabei achtete man auch darauf, dass keine unterschiedlichen Animpfgenerationen verwendet wurden, um den Einfluss durch Mutation veränderter Generationen von Tü 6077 auf die Produktion von **23**, möglichst gering zu halten. Die Produktionsanalyse fand durch den Vergleich des pH-Verlaufs, der einen starken Einfluss auf die Produktion von Spirodionsäure (**23**) hat (siehe 4.2) statt. Außerdem wurde das Wachstum der Kulturen über 72 Stunden in Flüssigkultur mit Medium S beobachtet. Es zeigte sich, dass bei einer Stammhaltung auf M2- und M2Ca-Agarplatten (Malz/Glucose/Hefe) das Wachstum in Flüssigkultur wesentlich schneller fortschritt als bei SM-Agarplatten. Die Analyse des pH-Verlaufs offenbarte jedoch Schwankungen von pH = 4.9 bis 5.3 bereits nach 48 Stunden der Kultivierung. Die Kulturen, die von SM-Agarplatten beimpft wurden, wiesen nach 48 Stunden eine relativ geringe Dichte an Zellmaterial auf, aber der sehr regelmäßige pH-Verlauf von 5.2 bis 5.3 zeigte bessere Produktionsbedingungen für **23** an. Somit stellte die von J. von FRIELING gefundene Stammhaltung auf SM-Agarplatten eine gute Ausgangssituation dar.

3.2.2 Vorarbeiten der Kultivierungsbedingungen

In eigenen Vorarbeiten wurden die von J. von FRIELING erarbeiteten Kultivierungsbedingungen weiter verfolgt. Im SM-Medium wuchs die Vorkultur innerhalb von drei Tagen gut an. Der Medienwechsel für die Hauptkultur zu SGG-Medium wies ebenfalls ein starkes Wachstum des Produzenten nach drei Tagen auf. Jedoch schwankten die Produktion von Spirodionsäure (**23**) recht stark (1 - 6 mg/L **23**) und dies erforderte eine weitere Optimierung der Kultivierungsbedingungen.

So wurden im Rahmen der Diplomarbeit die Kultivierungsparameter variiert, um die Produktion von **23** zu erhöhen und reproduzierbare Ausbeuten zu erreichen. Gleichzeitig musste auch ein Ersatz für das fetthaltige SGG-Medium gefunden werden, da dies die Aufarbeitung deutlich erschwerte.

In einem kleinen Maßstab wurde eine Testreihe mit sieben verschiedenen Kultivierungsansätzen (je 300 mL pro Kultivierung) durchgeführt. Dabei wurde die Produktion von Spirodionsäure (**23**) beim Wechsel vom Rund- zum Längsschüttler, ein Wechsel zum Mangelmedium Medium S und die Zugabe von Zusätzen untersucht (siehe 3.2.3). Medium S sollte ein Ersatz zu dem fetthaltigen SGG-Medium darstellen. Es weist ein ähnlich komplexes Nährstoffangebot auf, hat aber einen geringen Fettgehalt und erleichtert somit die Aufarbeitung und Isolation von Spirodionsäure (**23**). Bei den Zusätzen handelte es sich zum einen um HEPES-Puffer (32.7 mM), der während der Inkubation einen konstanten

pH-Wert gewährleisten sollte. Die Zugabe von Natriumbromid (9.7 mM) sollte zum anderen den Salzgehalt während der Kultivierung erhöhen.[57] Ebenso wurden drei potentielle Vorläufer von Spirodionsäure (**23**) (Natriumacetat, 25.5 mM; Natriumpropionat, 16.8 mM und Dinatrium-α-Ketoglutarat, 25.3 mM) der Kultivierung zugesetzt, um eine Produktionssteigerung von **23** zu erreichen.[50]

Für die Tests wurden vierzehn 1 L Erlenmeyerkolben mit 150 mL Medium S befüllt und autoklaviert. Man impfte mit 10 mL Vorkultur an. Für die Kultivierungen auf dem Rundschüttler wurden Erlenmeyerkolben (EMK) mit drei Schikanen verwendet, auf dem Längsschüttler wurden Kolben ohne Schikanen eingesetzt. Die Kultivierungen fanden bei 28 °C für 72 Stunden statt. Die zu fütternden Substanzen wurden in 5 mL bidest. Wasser gelöst, ein pH-Wert von 6.7 eingestellt und die Proben wurden mit bidest. Wasser auf ein Volumen von 10 mL verdünnt. Die Zugabe erfolgte steril nach 10 Stunden Kultivierung. Die sieben Kultivierungsvariationen wurden alle gleich aufgearbeitet. Die Kulturbrühe wurde mit 0.5 M HCl auf pH 5 eingestellt, das Mycel durch Zugabe von Celite über Filtration abgetrennt. Anschließend adsorbierte man die Kulturfiltrate an XAD-16 und eluierte nach Waschen mit demin. Wasser mit Methanol und entfernte das Lösungsmittel im Vakuum. Die Rohprodukte wurden in demin. Wasser aufgenommen und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die so erhaltenen Rohextrakte wurden mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC-ESI-MS analysiert (siehe 8.2). Dabei zeigte sich, dass ein Wechsel zu einem Längsschüttler, zu Medium S und der Zusatz von α-Ketoglutarat bzw. HEPES-Puffer die Produktion von Spirodionsäure (**23**) verbesserte. Die Variation wies rechnerisch auf eine Erhöhung der Ausbeute auf 16-41 mg/L Spirodionsäure (**23**) hin.[50]

3.2.3 Optimierung der Kultivierungsparameter

Die innerhalb der Diplomarbeit erarbeiteten Kultivierungsbedingungen zeigten im Weiteren jedoch keine reproduzierbaren Ergebnisse bezüglich der Produktion von **23**. Somit mussten weitere Optimierungsarbeiten durchgeführt werden, um eine stabile Produktion von Spirodionsäure (**23**) zu ereichen.

Da die eigenen Vorarbeiten darauf hinwiesen, dass die Produktionsrate von **23** sehr positiv auf einen Nährmedienwechsel reagiert hatte, wurde diese Idee weiter verfolgt. Es wurden sowohl die Bedingungen der Vorkulturen als auch die der Hauptkulturen variiert. Die Variation der Vorkulturen sollte dabei wichtige Hinweise auf die stark schwankende Produktion von **23** liefern.

3.2.3.1 Vorkulturen

Der Einfluss, der in den Nährmedien enthaltenen Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphatquellen wie auch der der Spurenelemente wurde überprüft. Es wurden die komplexen Nährlösungen Medium S, SM-Medium und die synthetischen Medien NL 1153, NL 1154, NL 1161, NL 1345 und NL 1358 getestet. Bei Medium S und NL 1345 wurde auch der Ersatz von Glycerin als C-Quelle durch eine höhere Menge an Glucose und Stärke analysiert. Diese variierten Nährmedien sollten bei Fütterungsexperimenten mit isotopemarkierten Glycerin angewendet werden. Die beiden glycerinarmen Nährlösungen wurden dann als Medium S* und NL 1345* beziffert.

Ebenso wurde eine Variation des Kultivierungsgefäßes und der Durchmischungsart, nämlich 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikanen auf einen Längsschüttler (120 spm) bzw. 1 L EMK mit drei Schikanen auf einen Rundschüttler (180 rpm) untersucht. Durch einen Wechsel der Schüttler wurde durch die Mischungsart die Sauerstoffzufuhr variiert. Hierbei wurde die Annahme getroffen, dass während einer Kultivierung auf einem Längsschüttler der Sauerstoffpartialdruck in der Kulturlösung höher als bei einem Rundschüttler sein müsste. Der Einfluss der Kultivierungszeit wurde als weiterer Parameter in die Untersuchung mit einbezogen. Es wurde keine Variation der Temperatur durchgeführt, alle Kultivierungen fanden bei 28 °C statt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich Medium S für die Vorkulturen von *Streptomyces* Tü 6077 am besten zur Produktion von Spirodionsäure (**23**) erwies. Die Kultivierung auf einen Längsschüttler (120 spm) in 1 L EMK ohne Schikane (100 mL Medium) für 48 h bei 28 C zeigte eine stabile Produktion von **23**. Die HPLC-ESI-MS-Analyse der Rohextrakte der Vorkulturen wies auf eine konstante Produktion von 5 - 8 mg Spirodionsäure (**23**) hin (Säule 1, Programm 1, siehe 8.2). Somit wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Kultivierungsbedingungen für die Vorkulturen von *S.* Tü 6077 bezüglich einer größtmöglichen Produktion von **23** optimiert.

3.2.3.2 Hauptkulturen

Innerhalb der Vorarbeiten fanden alle Fermentationen in SGG-Medium für drei Tage bei 28 °C, 500 rpm und 4 vvm Luftzufuhr ohne pH-Regulation statt.[50] Diese Bedingungen zeigten jedoch keine reproduzierbare Produktion von Spirodionsäure (**23**).

Während der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Kultivierung im Fermenter und in Schüttelkulturen auf die Produktion von **23** hin optimiert. Der Schwerpunkt der Variationen der Hauptkultur lag vor allem auf der Kultivierung im Fermenter, da diese Art der

Kultivierung bei den Biogenesestudien an Spirodionsäure (**23**) angewendet werden sollte. Die Variation der Schüttelkulturen wird im Kapitel 4.4 näher besprochen, da sie im Rahmen der Vorläufer-dirigierten Biosynthese stattfand.

Während dieser Optimierungsarbeiten der Kultivierung von Tü 6077 im Fermenter wurden zahlreiche Ansätze durchgeführt, wobei die Art und Menge des Nährmediums, die Zugabe von Vorläufern und Oberflächenmaterial ausprobiert wurden. Ebenso untersuchte man den Einsatz einer pH-Sperre, einer Füllstandsregulation durch eine Niveauregelung und die Variation der Kultivierungszeit.[50]

Der Einfluss der Nährmedien Medium S, Medium S* und NL 1345* auf die Bildung von Spirodionsäure (**23**) war am deutlichsten. Das glycerinhaltige Medium S ermöglichte eine gute Produktion von Spirodionsäure (**23**), wohingegen aus Kultivierungen mit Medium S* und NL 1345*, die als Glycerin-Ersatz einen höheren Gehalt an Stärke und Glucose beinhalten, nur sehr geringe Mengen Spirodionsäure (**23**) produziert wurden. Dieser starke Einfluss der Kohlenstoffquelle Glycerin auf die Sekundärstoffproduktion wurde bei der bereits beschriebenen biotechnologischen Untersuchung an dem Mutanten-Stamm von *Streptomyces* sp. FR-008 beobachtet.[56]

Die Zugabe von α-Ketoglutarat als potentieller Vorläufer von **23** hatte keine klaren Auswirkungen auf die Produktion von **23**, ebenso die Zugabe des Adsorberharzes XAD-16 (ca. 30 – 40 g/L).

Die Betrachtung der Kultivierungsdauer zeigte, dass die Fermentation mindestens drei Tage dauern musste, da bei kürzeren Inkubationszeiten nur sehr geringe Mengen von Spirodionsäure (**23**) detektiert werden konnten.

Eine Füllhöhenarretierung der Kulturbrühe mit autoklavierten Wasser zeigte ebenfalls keinen erkennbaren Einfluss auf die Produktion von **23**. Das Zuschalten einer pH-Sperre, die den pH-Verlauf der Fermentation in einem definierten pH-Bereich hält (pH = 5.5 ± 0.5), führte sogar zu einer schlechteren Produktion von **23**. Die einzelnen Fermentationsansätze sind tabellarisch im experimentellen Teil zusammengefasst (siehe Kapitel 9.1.2.1).

Der Sauerstoffpartialdruck innerhalb der Kulturbrühe kann einen starken Einfluss auf die Produktion von Sekundärmetaboliten ausüben.[58] So zeigte ein „scale-up“- Experiment von Tü 6077 in einem 10 L Fermenter (300 rpm, 10 vvm) keine Produktion von **23**, was auf eine unzureichende Belüftung schließen ließ.

Andere Vorarbeiten zeigten, dass eine Erhöhung der Belüftung einen positiven Effekt auf die Produktion von Spirodionsäure (**23**) ausübt. Die Produktion von **23** ließ sich durch eine

Erhöhung der Sauerstoffzufuhr von 1 vvm auf 4 vvm steigern. [50] Während der vorliegenden Doktorarbeit wurde ein Kultivierungsexperiment im Airlift-Fermenter mit 5 bar Überdruck durchgeführt, um diesen Effekt zu bestätigen. In diesen Ansatz wurde jedoch nur eine sehr geringe Menge Spirodionsäure (**23**) detektiert, was einen direkten Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks in der Kulturlösung auf die Produktion von **23** widerlegte. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch ROSA et al. bei ihren Untersuchungen zur Produktion von Clavulansäure, die ein Inhibitor der β-Lactamase ist. Sie überprüften den Einfluss der Menge des in der Kulturbrühe gelösten Sauerstoffs (DO = dissolved oxygen) und weitere Parameter wie den Einfluss der Scherkräfte bei Kultivierungen in Rührblattfermentern. Sie fanden heraus, dass der DO-Level keinen erheblichen Einfluss auf die Produktion von Clavulansäure hat, wenn ein kritischer Level überschritten wurde. Es zeigte sich, dass eine signifikante Verbesserung durch eine hohe Rührblattgeschwindigkeit erreicht werden konnte. [59]
Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der Biostat-B Fermenter mit 2 L Medium S, 1 g/L α-Ketoglutarat, 96 h Kultivierungsdauer bei 28 °C, 500 rpm und einer Luftzufuhr von 4 vvm für die Produktion von Spirodionsäure (**23**) (ca. 15 mg/L **23**) geeignet sein sollte.

3.2.4 Aufarbeitung

Die über weite Strecken wenig reproduzierbare und nicht-zufrieden stellende Produktion von **23** erforderte auch eine detaillierte Überprüfung der Aufarbeitung. Falls hohe Verluste an Spirodionsäure (**23**) bei der bisher üblichen Aufarbeitung zu niedrigen Ausbeuten geführt haben, sollte dem wirkungsvoll begegnet werden.
Somit wurden neben Variationen der Kultivierungsbedingungen auch neue Aufarbeitungsmethoden getestet, um eine möglichst effiziente Form für die Gewinnung von Spirodionsäure (**23**) zu erreichen.
Im Rahmen der Diplomarbeit erfolgte die Aufarbeitung nach Einstellung des pH-Wertes mit 1 M HCl auf pH = 4–5, gefolgt von einer Abtrennung des Mycels mittels Filtration unter Zusatz von Celite. Die HPLC-ESI-MS-Analyse des Mycels zeigte keine Spirodionsäure (**23**) und wurde verworfen (Säule 2, Programm 2 siehe 8.2). Anschließend wurde das Kulturfiltrat an XAD-16 adsorbiert, mit demin. Wasser gewaschen und mit Methanol eluiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und der wässrige Rückstand gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde abschließend mit Ethylacetat extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Die bisherige Aufarbeitungsmethode führte zu Rohextrakten, die noch sehr viele Komponenten enthielten, die sowohl die Detektion als auch die Isolierung von **23** erschwerten. Ebenso könnten während der Extraktion mit Ethylacetat und während der Adsorption an XAD-16 Verluste entstehen, wenn beispielsweise Spirodionsäure (**23**) bei der pH-Einstellung nicht vollständig protoniert wurde. Während der vorliegenden Arbeit wurde versucht, diesen Ablauf der Aufarbeitung auf verschiedene Arten zu variieren und die Variante mit höchster Spirodionsäure-Anreicherung und mit möglichst wenigen Nebenkomponenten zu bestimmen.

Die Eingrenzung des Polaritätsbereichs der isolierten Substanzen durch Adsorption an XAD-16 oder durch Extraktion mit Ethylacetat wurde untersucht.

Man ließ beispielsweise die Adsorption an XAD-16 weg und extrahierte direkt das Kulturfiltrat mit Ethylacetat. Ebenso wurde getestet, ob die Extraktion mit Ethylacetat vernachlässigt werden konnte, indem man das Kulturfiltrat an XAD-16 adsorbierte und das erhaltene Eluat untersuchte. Oder man verwendete Methylenchlorid anstelle von Ethylacetat zur Extraktion, um eine leichte Verschiebung des Polaritätsfensters zu erreichen.

Bei Fermentationen unter Zugabe eines Oberflächenmaterials wurde das vom Kulturfiltrat abgetrennte Mycel-XAD-Gemisch über zwei verschiedene Arten aufgearbeitet. Da Spirodionsäure (**23)** sowohl in Aceton als auch in Methanol sehr gut löslich ist, wurden diese beiden Lösungsmittel für die Eluation getestet. Auch ein zusätzlicher Reinigungsschritt durch zehnminütiges Waschen der Mycel-XAD-Mischung mit demin. Wasser wurde geprüft.

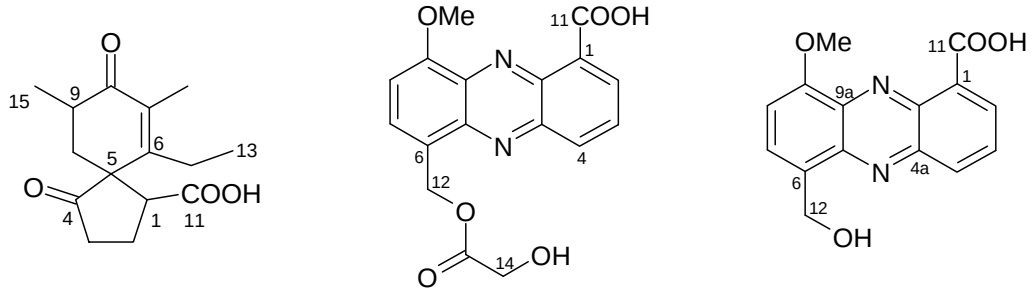
Um die Löslichkeit von Spirodionsäure (**23)** in unpolaren Lösungsmitteln ausnützen zu können, wurden auch verschiedene Soxhlet-Extraktionen mit *n*-Heptan und 1-Butanol durchgeführt. Hierbei wurde das Kulturfiltrat lyophilisiert, mit Sand vermischt und mit den jeweiligen Extraktionsmitteln unterschiedlich lang behandelt (0.5 – 3.0 h). Dabei zeigte sich jedoch, dass noch ein großer Anteil von **23** im Rückstand der *n*-Heptan-Extraktion zurückgeblieben war, den man durch Extraktion mit Ethylacetat herauslösen konnte. Die einzelnen Variationen sind im Detail unter 9.2 beschrieben.

Als eine effektive Aufarbeitungsmethode stellte sich hierbei folgender Ablauf heraus: Der pH-Wert der Kulturbrühe wurde mit 1 M HCl auf pH = 4-5 eingestellt. Das Mycel, welches keine Spirodionsäure (**23**) enthielt, wurde mittels Filtration unter Zusatz von Celite abgetrennt. Anschließend wurde das Kulturfiltrat gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in wenig demin. Wasser (ca. 100 mL/L Kulturfiltrat) aufgenommen, dreimal mit Ethylacetat (Volumina Ethylacetat:Kulturfiltrat ca. 1:1) extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für eine optimale Kultivierung von *Streptomyces* sp. Tü 6077 zur Produktion von Spirodionsäure (**23**) die Stammhaltung auf SM-Agarplatten und die Fermentation der Vorkulturen in 100 mL Medium S in 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikane für 48 h auf einen Lägsschüttler erfolgen sollte. Für die Hauptkultur zeigte sich eine Inkubation von 2 L Medium S im Biostat-B Fermenter von 96 h bei 28 °C, 500 rpm und einer Luftzufuhr von 4 vvm optimal. Der Zusatz von 1 g/L α-Ketoglutarat nach 9 - 10 h Fermetationsdauer schien ebenso förderlich. Eine effiziente Aufarbeitungsmethode stellte die Einstellung des pH-Wertes der Kulturbrühe mit 1 M HCl auf pH = 4-5 und die anschließende Abtrennung des Mycel mittels Filtration unter Zusatz von Celite dar. Das erhaltene Kulturfiltrat wurde lyophilisiert und in wenig demin. Wasser (ca. 100 mL/L Kulturfiltrat) aufgenommen. Die dreimalige Extraktion mit Ethylacetat (ca. 3 x 100 mL) führte zu einem Rohprodukt, welches immer noch einige Nebenkomponenten enthielt, aber eine eindeutige Detektion von **23** über analytische HPLC (Säule 1, Programm 1 siehe 8.2) ermöglichte. Die Ausbeute an Spirodionsäure (**23**) konnte, verglichen mit den eigenen Vorarbeiten, von 1-3 mg/L auf bis zu 15 mg/L gesteigert werden.

3.3 Sekundärmetaboliten aus Tü 6077

Im Rahmen eines physikochemischen Screenings untersuchte M. LANGBECKER (AK FIEDLER, Tübingen) die Sekundärmetabolitenproduktion von *Streptomyces* sp. Tü 6077. I. PAPASTAVROU (AK ZEECK) isolierte die bekannten Naturstoffe Griseolutein A (**25**)[60, 61] und Griseoluteinsäure (**26**)[62, 63] und wies die Bildung der Metaboliten Desferrioxamin und 3-Indolcarbonsäure durch Vergleiche der UV/VIS-Spektren nach.[49] Außerdem wurde erstmals ein Spiro[4.5]decen aus bakterieller Quelle, dem Streptomycetenstamm Tü 6077, isoliert und Spirodionsäure (**23**) benannt.[49]



Spirodionsäure (**23**) Griseolutein A (**25**) Griseoluteinsäure (**26**)

Abbildung 17: Von I. PAPASTAVROU isolierte Naturstoffe aus dem Stamm *Streptomyces* Tü 6077.

Eigene Experimente mit *Streptomyces* sp. Tü 6077[i] erweiterten das Metabolitenspektrum um zwei weitere cyclische Naturstoffe im Rahmen der Diplomarbeit. Es wurde ein Ethyldimethyltrihydroxybenzol isoliert. Vergleiche mit der Literatur zeigten, dass es sich bei dieser Verbindung um ein unsymmetrisches Regioisomer (**28**) von Barnol (**27**) handeln musste. Barnol (**27**) wurde 1964 erstmalig aus *Penicillium baarnese* isoliert. Die Struktur des Barnol-Regioisomers (**28**) konnte nicht vollständig aufgeklärt werden, da sich die Substanz rasch zersetzt hatte, weiterführende NMR-Messungen nicht zuließ und eine erneute Isolierung fehlschlug. Außerdem konnte ein 2*H*-Pyron isoliert und durch Abgleich mit Literaturdaten als 6-Ethyl-4,5-hydroxy-3,5-dimethylpyran-2-on (**29**) bestimmt werden.[50, 64]

---

[i] Wir danken dem Arbeitskreis von Prof. H.-P. FIEDLER für die Überlassung des Stammes *Streptomyces* sp. Tü 6077.

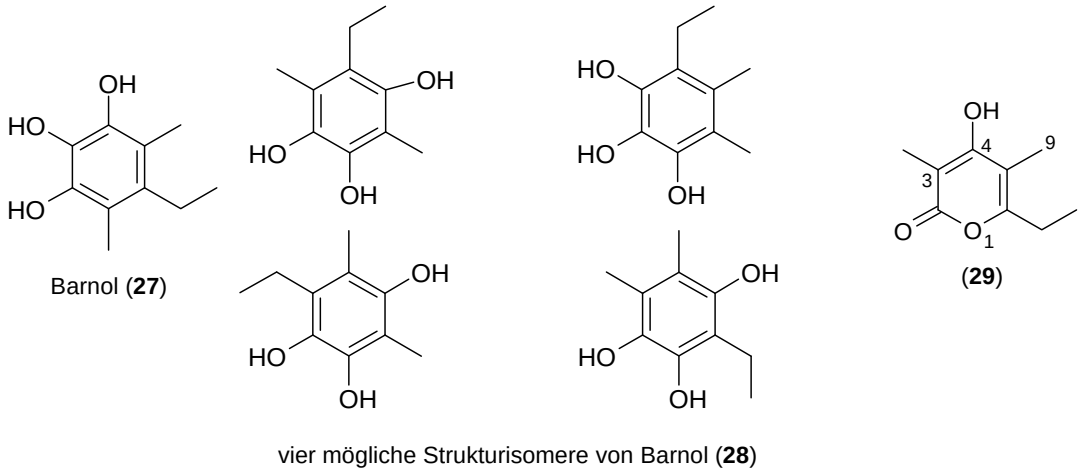


Abbildung 18: Im Rahmen der Diplomarbeit zusätzlich isolierte Metaboliten aus Tü 6077.[50]

Der Metabolit 6-Ethyl-4-hydroxy-3,5-dimethylpyran-2-on (**29**) wurde erstmals 1989 aus dem Pilz *Emericella heterothallica* isoliert[65] und ist sowohl als Sekundärmetabolit von Pflanzen als auch von Bakterien literaturbekannt.[66, 67] Außerdem wurde die *2H*-Pyronstruktur im Rahmen von Studien an Polyketidsynthasen (PKS) bearbeitet. KHOSLA et al. isolierten **29** während ihrer Arbeiten an einer rekombinanten, modularen PKS. Hierbei handelte es sich um die ersten zwei Module der 6-Desoxyerythronolid B-Synthase, der eine Thioesterase angefügt wurde. (DEBS1 + TE).[67]

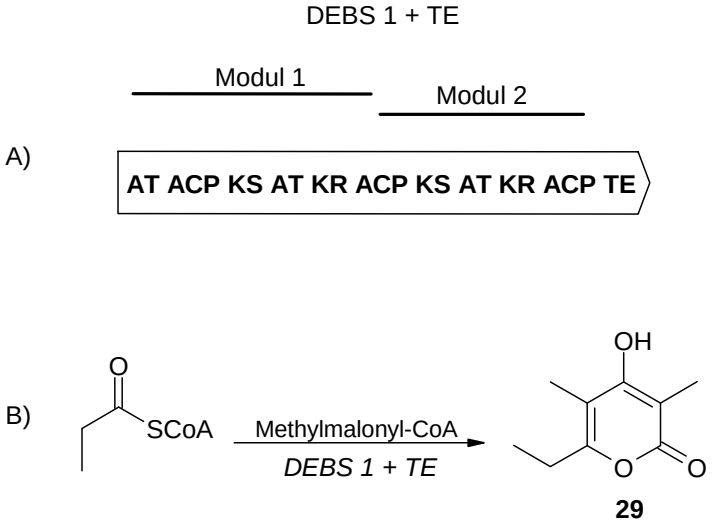


Abbildung 19: A) Schema der Module der rekombinanten PKS DEBS1+TE; ACP: Acyl-Carrier-Protein-Domäne, AT: Acyltransferase-Domäne, KS: Ketosynthase Domäne, KR: Ketoreduktase-Domäne. B) Die von DEBS1+TE katalysierte Umwandlung von Propionyl-CoA und Methylmalonyl-CoA zu 29. [67]

Arbeiten von ABE et al. mit einer neuen pflanzenspezifischen PKS (Typ III), nämlich einer Oktaketidsynthase in *Aloe arborescens* zeigten, dass diese racemisches (2*RS*)-

Methylmalonyl-CoA akzeptierte und die Bildung von **29** katalysierte.[64, 66]

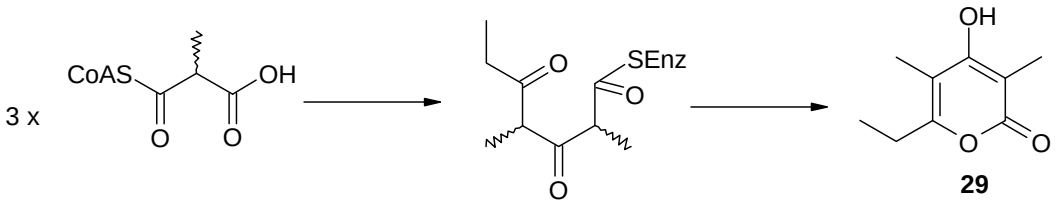


Abbildung 20: Bildung von 29 über schrittweise Kondensationsreaktionen unter Decarboxylierung von drei Molekülen 2-(*RS*)-Methylmalonyl-CoA. [64, 66]

3.3.1 Isolierung der Sekundärmetaboliten

Zur Isolierung der Sekundärstoffe aus dem Stamm Tü 6077 wurde 1 L Kulturbrühe mit 1 M bzw. 0.5 M HCl auf pH = 4–5 eingestellt und das Mycel unter Zugabe von Celite abgetrennt. Das Kulturfiltrat wurde gefriergetrocknet und das Lyophilisat wurde in wenig demin. Wasser aufgenommen und mit Ethylacetat extrahiert. Das Rohprodukt wurde wie im unten dargestellten Schema weiter bearbeitet. Es konnte neben Sekundärmetaboliten **28** und **29** außerdem das Dihydrosarkomycin (**30**) isoliert werden, dessen Charakterisierung im Folgenden näher erläutert wird.

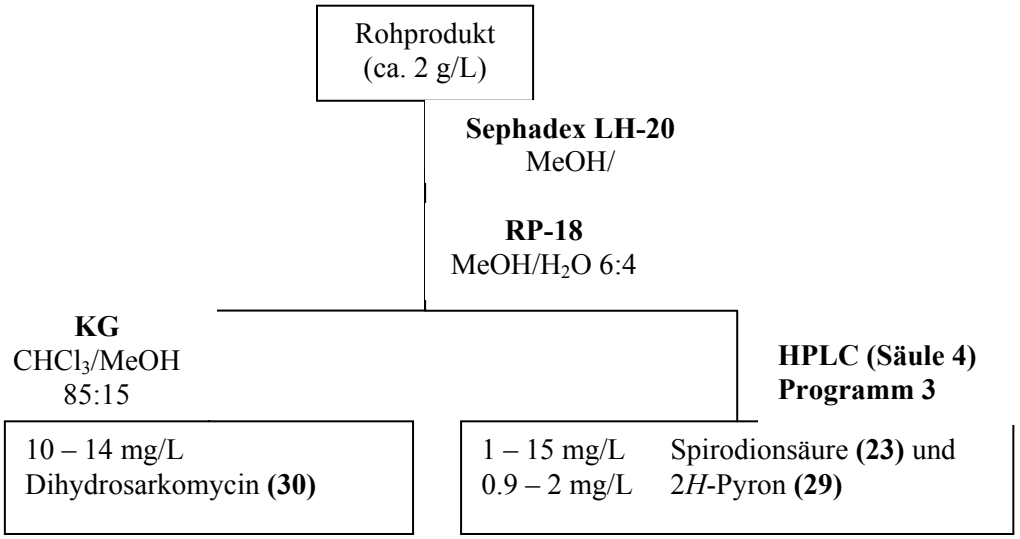
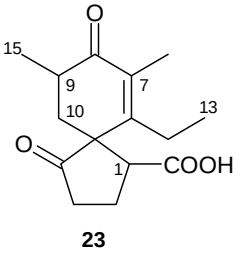


Abbildung 21: Isolierungsschema für die Sekundärmetaboliten (23, 29 und 30) aus *Streptomyces* Tü 6077.

Die bereits beschriebenen Metaboliten Griseolutein A (**25**), Griseoluteinsäure (**26**) wurden nicht detektiert. Es gelang nicht, das im Rahmen der Diplomarbeit isolierte unsymmetrische Ethyldimethyltrihydroxybenzol (**28**) erneut zu isolieren.

Spirodionsäure (23)

Der Metabolit löscht UV-Licht der Wellenlänge 254 nm und zeigt mit dem Anfärbereagenz Anisaldehyd/H_2SO_4 nach Erwärmung eine rosa Farbe. Das EI-Massenspektrum von **23** zeigt einen Ionenpeak bei *m/z* = 264 und ein HR-EI-MS-Experiment lieferte die Summenformel $C_{15}H_{20}O_4$ (m/z = 264.1360 $[M]^+$). Die Analyse des IR-Spektrums dieser Verbindung weist auf Hydroxylgruppen (3436 cm^{-1}) und Carbonylfunktionen (1738, 1664 cm^{-1}) hin. Das Absorptionsmaximum im UV-Spektrum liegt bei 253 nm, welches im basischen Bereich hypochrome (251 nm) und im sauren bathochrome Verschiebung (255 nm) zeigt. Die Struktur wurde über ^{1}H-, ^{13}C- und 2D-NMR-Experimente von I. PAPASTAVROU aufgeklärt, wobei sie durch verschiedene NMR-Experimente herausfand, dass Pyridin-d_5 ein geeignetes Lösungsmittel war.[49] Das ^{1}H-NMR zeigt Signale von 19 Protonen, wovon drei H_3-Signale auf das Vorhandensein von Methylgruppen (δ_H = 1.11, 1.26 and 1.95 ppm) hinwiesen. Ebenso können vier gut differenzierbare Signale bei δ_H = 1.73, 2.05, 2.92 und 3.56 ppm und ein Multiplett-Bereich (δ_H = 2.25 bis 2.65 ppm) im aliphatischen Raum beobachtet werden.



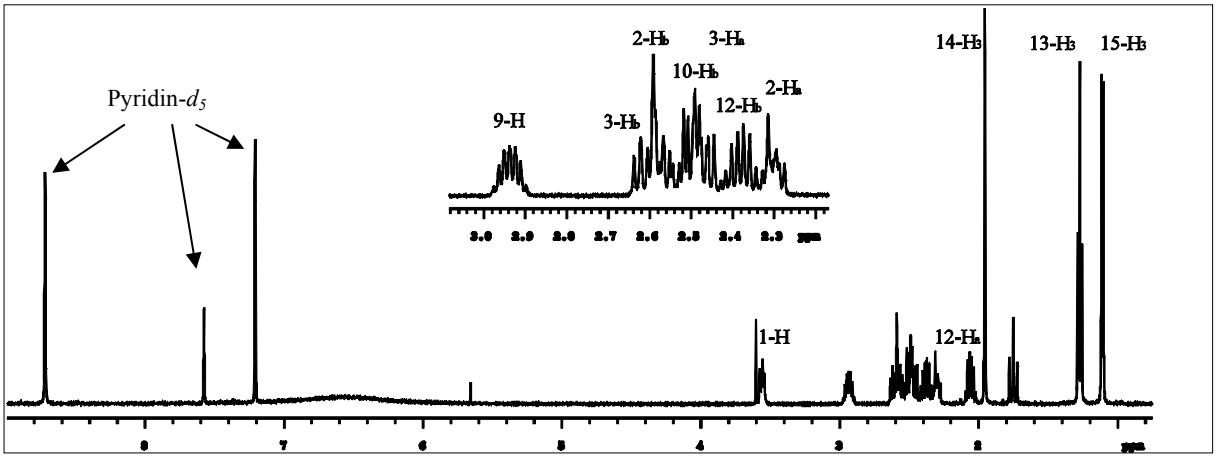


Abbildung 22: ^{1}H-NMR-Spektrum von Spirodionsäure (23); 300 MHz, Pyridin-d_5.

Das ^{13}C-NMR-Spektrum ist durch zwei Ketofunktionen (δ_C = 200.0, 218.4 ppm), eine Carbonsäure (δ_C = 175.8 ppm), zwei voll substituierte Doppelbindungen (δ_C = 135.0 und 155.8 ppm) und ein quartäres C-Atom (δ_C = 59.9 ppm) gekennzeichnet.[68]

Daten aus dem HSQC-Experiment unterstützen die Zuordnung von vier Methylen- (δ_C = 23.3, 26.4, 34.5, 37.8 ppm) und zwei Methin-Einheiten (δ_C = 36.2, 49.0 ppm), die sich mittels ^{1}H,^{1}H-COSY- und HMBC-Korrelationen zu zwei Fragmenten verknüpfen ließen. Somit entstand ein Grundgerüst, welches aus zwei Ringen aufgebaut war. Auf dieser Grundlage

wurde dem Naturstoff ein spiroverbrückter Bicyclus zugeordnet, die 6-Ethyl-7,9-dimethyl-4,8-dioxospiro[4.5]deca-6-en-1-carbonsäure (**23**).

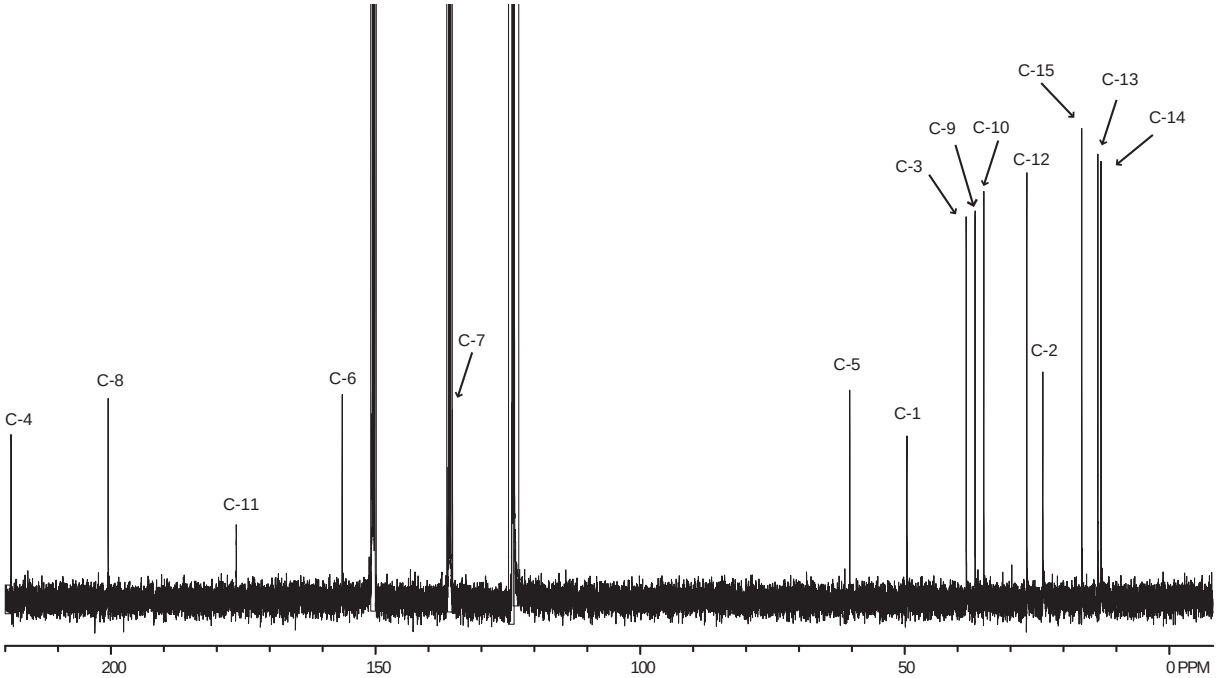


Abbildung 23: ^{13}C-NMR-Spektrum von Spirodionsäure (23); 125 MHz, Pyridin-d_5.

1D-ROESY and 2D-NOESY-Experimente führten zu Hinweisen auf die relative Stereochemie am Spirozentrum (C-5), aber der Beweis stand noch aus. Die 3-H_2 Methylenprotonen zeigen NOE-Korrelationen zu 12-H_2 und 9-H, unterstützen den Strukturvorschlag **23** und weisen darauf hin, dass sich die Ethylgruppe an C-6, und die Protonen 9-H und 3-H auf einer Seite befinden.

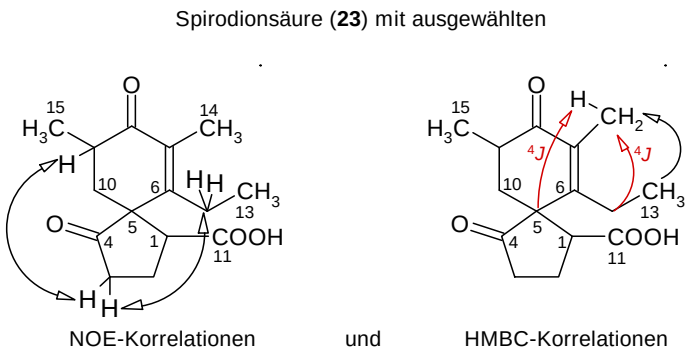


Abbildung 24: Ausgewählte NOE- und HMBC -Korrelationen von Spirodionsäure (23) ^4J-HMBC-Korrelationen sind in rot dargestellt.

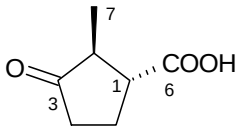
Interessanterweise erweist sich die Methylgruppe an C-9, als stabil gegenüber

Isomerisierungsreaktionen. In den NMR-Experimenten im basischen Lösungsmittel Pyridin-d_5 konnten keine tautomeren Effekte beobachtet werden konnten.

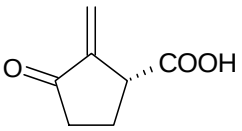
Dihydrosarkomycin (30)

Der farblose, kristalline Feststoff zeigt keine UV-Absorption und weist mit Anisaldehyd/H_2SO_4 in der Wärme eine gelbe Farbreaktion auf. Der Metabolit ist in Aceton und Methanol gut löslich.

Das EI-Massenspektrum des Naturstoffs liefert einen Molekülpeak *m/z* 114 $[M]^+$, sowie ein weiteres charakteristisches Fragment mit *m/z* = 97 $[M\text{-COOH}]^+$, das die Verbindung ohne Säurefunktion repräsentiert. Ein HR-EI-MS-Experiment lieferte die Summenformel $C_7H_{10}O_3$ (m/z 142.0629 $[M]^+$). Das IR-Spektrum dieser Verbindung weist auf Hydroxylgruppen (3448 cm^{-1}) und auf Carboxylfunktionen (1733 cm^{-1}) hin.



30



31

Im ^{1}H-NMR-Spektrum sind Signale von neun Protonen im aliphatischen Bereich zu detektieren. Ein H_3-Signal (δ_H = 1.04 ppm) weist auf eine Methylgruppe hin, wobei die Aufspaltung zum Dublett (^3J = 7 Hz) die Nachbarschaft zu einer Methinfunktion anzeigt.

Die weiteren Signale erweisen sich als komplexe Multiplettsignale. Das ^{13}C-NMR ist durch eine Ketofunktion (δ_C = 217.9 ppm), eine Carbonsäure (δ_C = 177.0 ppm) und eine Methylgruppe bei δ_C = 13.4 ppm charakterisiert. Mit diesen strukturellen Informationen und der Summenformel konnte eine Struktur mithilfe der Datenbank ANTIBASE rasch und effizient vorgeschlagen werden.[69] Es handelte sich um Dihydrosarkomycin (**30**), einem literaturbekannten Sekundärmetabolit aus *Streptomyces erythrochromogenes*, der zusammen mit dem Antitumorwirkstoff Sarkomycin (**31**), einem instabilen Strukturanalogon isoliert worden war.[70, 71] Die Instabilität von **31** ist auf die reaktive exocyclische Doppelbindung zurückzuführen. Seine biologische Aktivität als Cytostatikum wurde von ISHIYAMA in einer klinischen Studie an 78 Patienten, die an inoperablen Krebserkrankungen litten, untersucht. Er erzielte in 26 Fällen beachtliche klinische Verbesserungen.[72] Auf Ehrlich-Aszites-Tumore in Mäusen, Yoshida-Sarkome, Sarkom-180 und humane Hela-Karzinom-Zelllinien zeigte **31** starke inhibitorische Effekte. Sarkomycin (**31**) wurde in den 60er Jahren als verschreibungspflichtiges Antitumormittel in Japan verwendet.[73-75] Ebenso hatte die einfache Struktur des Sarkomycins (**31**) Synthesechemiker in der Vergangenheit immer wieder dazu

veranlasst, neue Methoden für seine Darstellung zu erschließen. Die verschiedenen Ansätze zur Darstellung des racemischen und enantiomerenreinen Sarkomycins (**31**) [76-80] – vor allem des letzten Jahrzehnts – spiegeln das großes Interesse an der Synthese dieser Verbindung wieder.[81, 82]

4 Biosynthese von Spirodionsäure (23)

Spiroverbindungen in der Natur

Das spirocyclische Grundgerüst Spiro[4.5]decan ist vor allem aus einer Reihe von pflanzlichen Naturstoffen und einigenwenigen pilzlichen Metaboliten bekannt. Die folgende Abbildung zeigt die aus Naturstoffdatenbanken erhaltenen Einträge für strukturelle Analoga der Spirodionsäure (**23**) (siehe Abbildung 25).[69, 83]

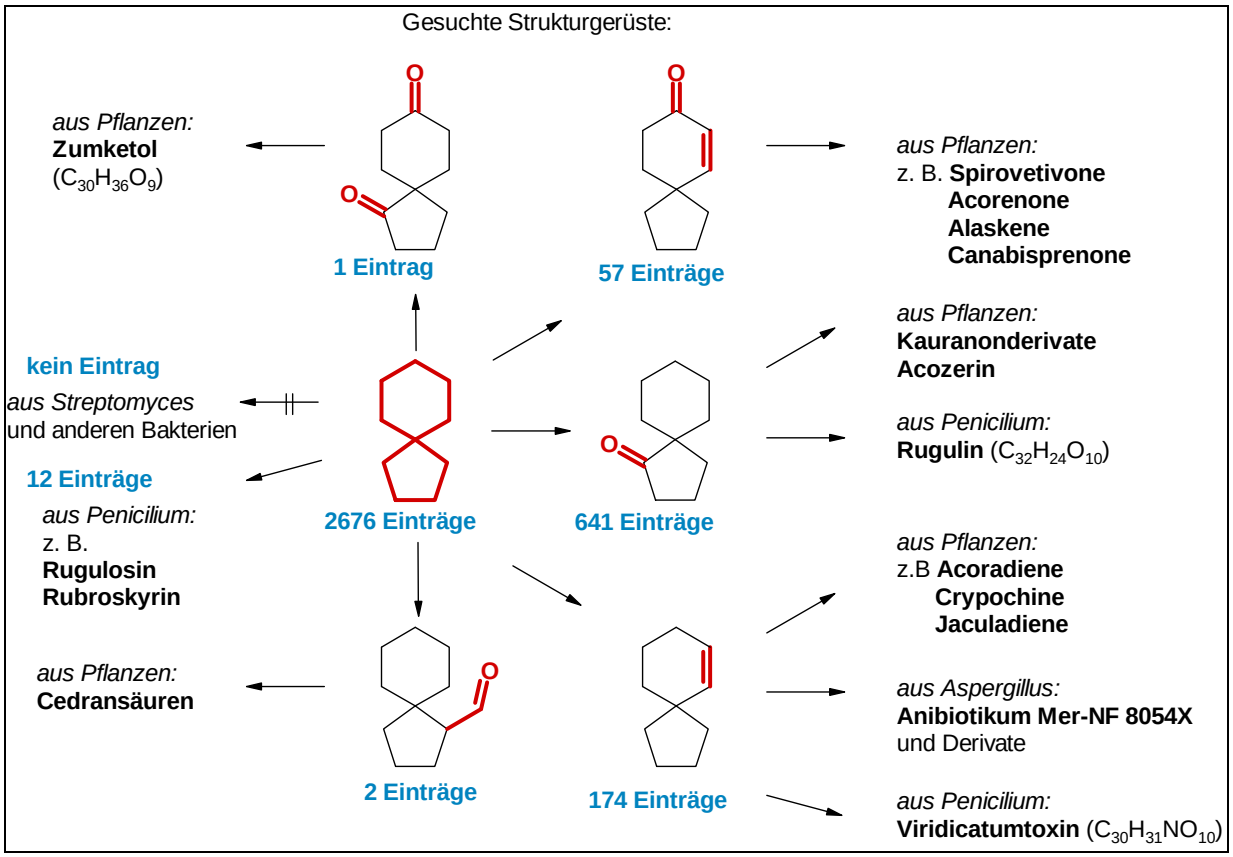
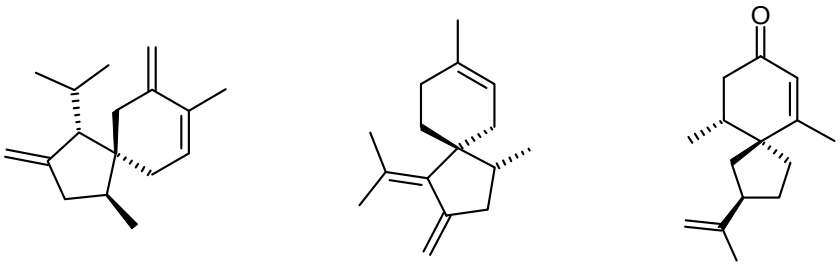


Abbildung 25: Suche nach strukturellen Analoga von Spirodionsäure (23) in einer Naturstoffdatenbank.[83, 49]

Die Klasse der Spiro[4.5]decane kann in drei Gruppen unterteilt werden, den Acoranen, Spirovetivanen und Alaskenen, die sich im Substitutions- und Oxidationsmuster unterscheiden (siehe Abbildung 26).[84] Das Spiro[4.5]decan-Gerüsts tritt meist als Untereinheit komplexer Terpenverbindungen auf.[85-87]

Dahingegen ist das Spiro[4.5]decan-Gerüst aus Bakterien, wie *Streptomyces* bisher nicht in

der Literatur bekannt, was die Einzigartigkeit von Spirodionsäure (**23**) verdeutlicht.[64]



Acoran (**32**) β-Alasken (**33**) Solavetivon (**34**)

Abbildung 26: Ausgewählte Verbindungen als Beispiele von drei als pflanzliche Metaboliten vorkommenden Spiro[4.5]decan-Klassen (32, 33, und 34).[88-92]

4.1 Biosynthesehypothesen

Aus dem Metabolitenspektrum des Stammes Tü 6077 wurde Spirodionsäure (**23**) als einzige Spiro[4.5]decen-Verbindung isoliert. [49] Da sie ein bakterieller Sekundärstoff ist, wurde die Annahme getroffen, dass die Bildung dieses Naturstoffs über die Polyketidbiosynthese ablaufen sollte. Zusätzlich wurde auf Grund ihres Substitutionsmusters eine Isoprenoid-Biosynthese ausgeschlossen.

Aus diesen Annahmen können folgende Biosynthesehypothesen abgeleitet werden, die mittels ^{13}C-markierter Vorläufer überprüft werden sollten. Die Fütterungsexperimente sollten mit isotopenmarkierten PKS-Bausteinen wie Acetat, Propionat und Malonat erfolgen, um die Annahme, dass es sich bei Spirodionsäure (**23**) um ein Polyketid handelt, zu überprüfen.

Nach einer möglichen Hypothese A) erfolgt der Aufbau einer linearen Polyketidkette durch eine Claisen-ähnliche Kondensationsreaktion von drei Propionat-, einer Acetat- und einer α-Ketoglutarateinheit. Die Ausbildung des Spirobicyclus sollte anschließend durch zweimalige Aldol-Kondensation erfolgen. In Hypothese B) könnte alternativ auch die Kettenverlängerung mit zwei weiteren Acetateinheiten anstelle von α-Ketoglutarat stattfinden (siehe Abbildung 27).

Diese Hypothesen waren zunächst die Grundlagen der Fütterungsexperimente mit stabilen, ^{13}C-markierten Vorläufern innerhalb der Diplomarbeit.[50]

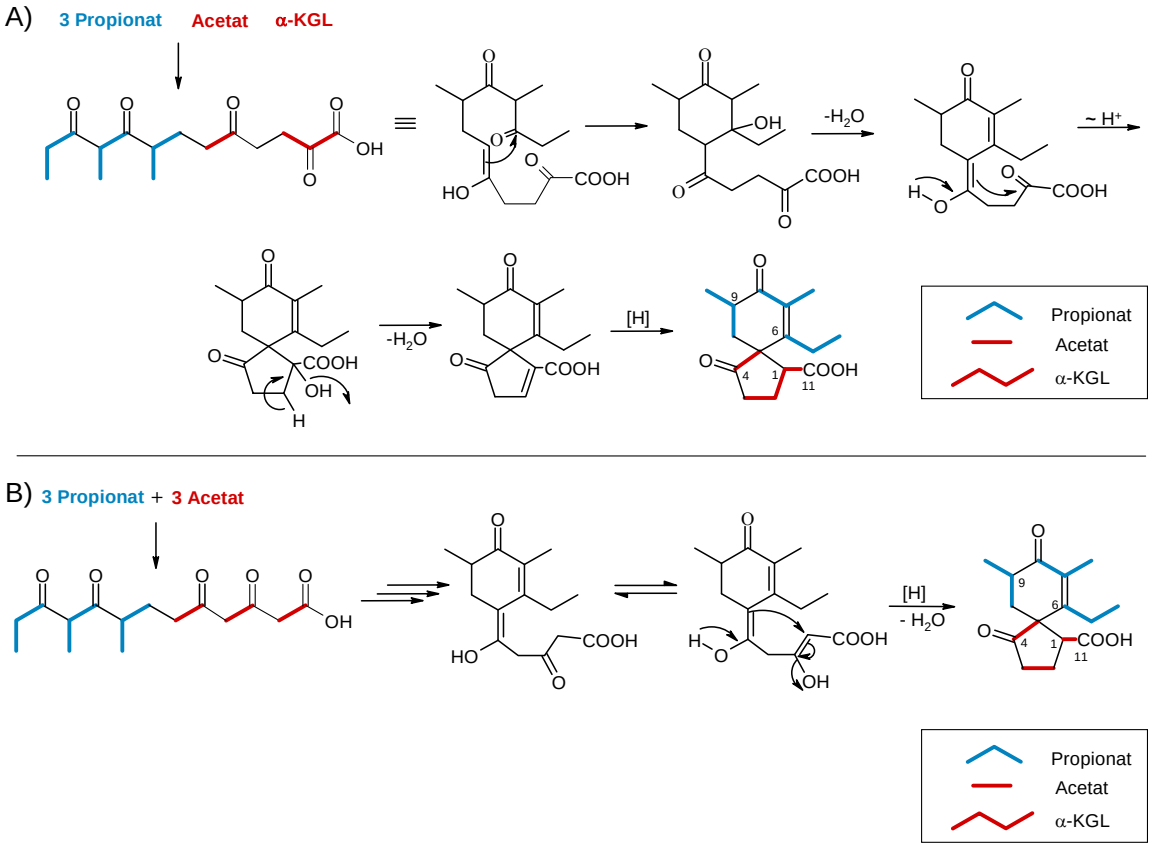


Abbildung 27: Hypothetische Biosynthesewege für 23.[49]

Zusätzlich zu den von I. PAPASTAVROU aufgestellten Biosynthesehypothesen hinsichtlich der Bildung des Spirobicyclus von Spirodionsäure (**23**) werden hier weitere Möglichkeiten diskutiert. In Anlehnung an literaturbekannte Biogenesestudien an dem pflanzlichen Spiro[4.5]decan-Phytoalexin Lubimin (**35**). Dieser isoprenoide Naturstoff wird über die Mevalonatbiosynthese aufgebaut. Das Phytoalexin **35** wird neben anderen Sesquiterpenen von Kartoffelpflanzen gebildet, die mit dem Pilz *Alternaria solani* infiziert wurden. Lubimin (**35**) stellt dabei ein Intermediat von Rishitin (**37**) dar, welches ein antifungischer Stressmetabolit ist. Dabei erfolgt die Bildung von Rishitin (**37**) über Solavetivon (**34**), Lubimin (**35**) und Oxylubimin (**36**).[93]

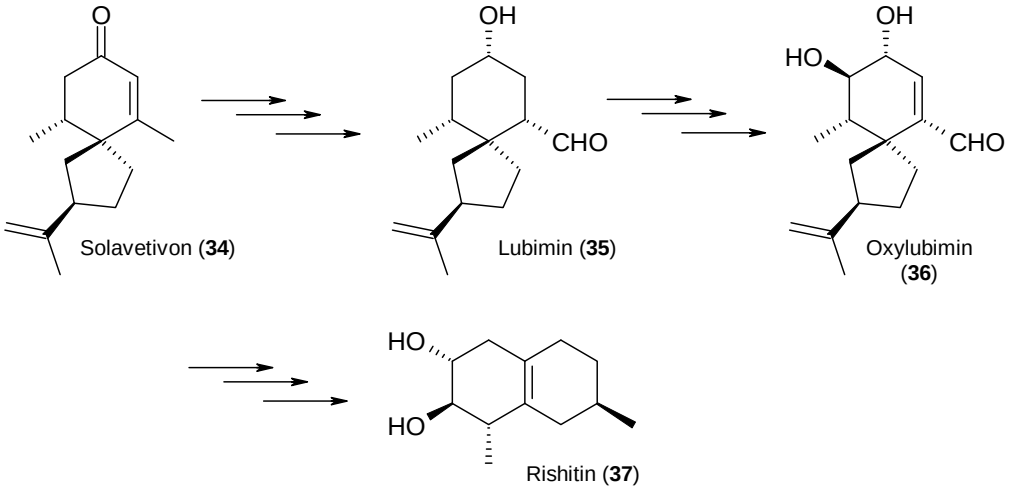


Abbildung 28: Bildung von Rishitin (37) über die Intermediate Solavetivon (34), Lubimin (35) und Oxylubimin (36) bei infizierten Kartoffelpflanzen.[93]

Die in Abbildung 28 dargestellten Pflanzenmetaboliten werden über die klassische Terpenbiosynthese mit Mevalonsäure als Zwischenstufe aufgebaut. Hierbei wird aus Mevalonsäure Isopentenylpyrophosphat (IPP) gebildet, welches durch Kondensations-Reaktionen verlängert wird.[94] Die Reaktion von Farnesylpyrophosphat (FPP) zu einem Spirobicyclus ist in Bezug auf die Biosynthese von Spirodionsäure (**23**) ein interessanter Schlüsselschritt. Die Ausbildung des charakteristischen Spiro[4.5]decen-Gerüstes von **36** erfolgt nämlich über eine 1,2-Wagner-Meerwein-Umlagerungsreaktion, die zu einer Kontraktion des Ringsystems führt (siehe Abbildung 29).[95-97]

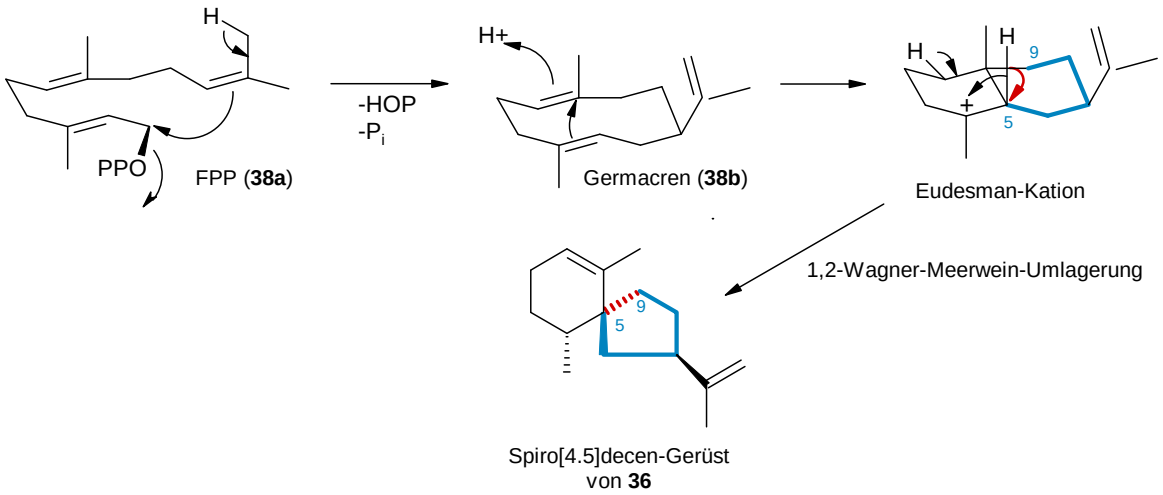


Abbildung 29: Wagner-Meerwein-Umlagerung zur Ausbildung des Spirobicyclus.[95-97]

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte, wurde die folgende neue Biosynthesehypothese von Spirodionsäure (**23**) formuliert: Über eine Polyketidsynthase sollte sich eine durchgehende

Polyketidkette aus drei Propionat- und drei Acetateinheiten bilden, die über eine C-C-Verknüpfung das Decalin-Gerüst aufbaut. Die Bildung des Spirobicyclus könnte durch einen β-Wasserstoff-Shift erfolgen. Das Oxidations- und Substitutionsmuster würde dabei dem von Polyketiden entsprechen. Demnach sollte Spirodionsäure ein Produkt einer bakteriellen Polyketidsynthase vom Typ I sein (siehe Abbildung 30).

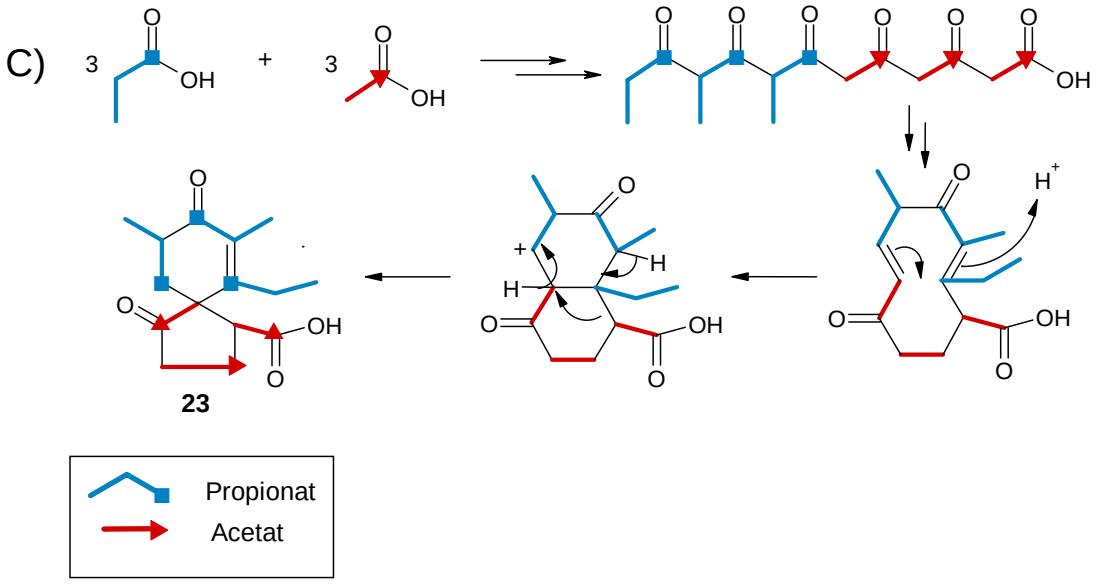


Abbildung 30: Biosynthesehypothese von Spirodionsäure (23) in Anlehnung an die Biosynthese von Lubimin (35).[95-97]

4.2 Fütterungsexperimente mit ^{13}C-markierten Vorläufern

4.2.1 Ergebnisse der Fütterungsexperimente aus Vorarbeiten

Im Rahmen der eigenen Diplomarbeit wurden Fütterungsexperimente durchgeführt, um die für Spirodionsäure (**23**) aufgestellte Biosynthesehypothese zu überprüfen. Es wurden [1-^{13}C]Acetat (653 mg/L, 8.0 mmol/L), [1,2-$^{13}C_2$]Acetat (634 mg/L, 7.7 mmol/L), [2-^{13}C]Acetat (706 mg/L, 8.6 mmol/L) und [1-^{13}C]Propionat (701 mg/L, 7.3 mmol/L) an den Produzenten Tü 6077 verfüttert. Zur Auswertung der Fütterungsexperimente wurden alle NMR-Signalintensitäten auf den Durchschnitt möglicher nicht angereicherter Kohlenstoffatome referenziert. In Tabelle 1 sind die spezifischen Einbauraten der individuellen Vorläufer der Spirodionsäure (**23**) aufgelistet. Die Berechnung erfolgte anhand

der von SCOTT et al. hergeleiteten Formel 3, welche in Kapitel 8.3.6 beschrieben ist.[98]
Aus dem Fütterungsexperiment mit [1,2-$^{13}C_2$]Acetat wurde kein spezifischer Einbau errechnet, somit sind die erhaltenen Kopplungskonstanten als Vermerk in der Tabelle 1 mit aufgeführt.[64]

C-Atom[a]	δ_C [ppm]	[1-^{13}C]Acetat spez. Einbau [a]	[2-^{13}C]Acetat spez. Einbau [a]	[1-^{13}C]Propionat spez. Einbau [a]
1	49.0	**1.53**[b]	0.19	0.89
2	23.3	0.72	0.35	0.58
3	37.8	0.25[b]	**1.49**	0.29
4	218.4	**4.44**[b]	0.56	**1.03**
5	59.9	0.44	0.38	**1.99**
6	155.8	0.87	0.66	**17.73**
7	135.0	0.48	0.13	**2.12**
8	200.0	0.49	0.78	**16.62**
9	36.2	0.20	0.40	0.06
10	34.5	0.23	0.48	0.12
11	175.8	**5.58**[b]	0.56	**6.21**
12	26.4	0.07]	0.26	0.00[ref]
13	13.0	0.22[ref]	0.14[ref]	0.07[ref]
14	12.4	0.22[ref]	0.14[ref]	0.03[ref]
15	16.0	0.09[ref]	0.11[ref]	0.12[ref]

Tabelle 1: ^{13}C-NMR Analyse von angereicherter Spirodionsäure (23) nach Fütterungsexperimenten mit ^{13}C-angereicherten Vorläufern. Ein spezifischer Einbau >1 ist hervorgehoben. [a] ^{13}C-NMR-Spektren (150.8 MHz, Pyridin-d_5); [b] [1,2-$^{13}C_2$]Acetat: Kopplungskonstanten ($J_{C,C}$) C-3/C-4: 38 Hz, C-1/C-11: 60 Hz; [ref]: Referenzierung mittels Durchschnittsbildung.[50]

Das Fütterungsexperiment mit [1-^{13}C]Acetat zeigte nur hohe spezifische Einbauraten für die C-Atome C-1, C-4 und C-11, wobei das aus der Biosynthesehypothese erwartete Kohlenstoffatom C-2 keine Anreicherung trug. Die Fütterungsexperimente mit [2-^{13}C]Acetat und [1,2-$^{13}C_2$]Acetat untermauerten die Ergebnisse aus der [1-^{13}C]Acetat-Fütterung, indem man eindeutig zwei Kopplungen zwischen C-3/C-4 und C-1/C-11 und eine signifikante Anreicherung von C-3 aus den Signalen der ^{13}C-NMR Spektren entnehmen konnte. Jedoch zeigte das Kohlenstoffatom C-1 nur einen äußerst schwachen Einbau. Gemäß der Biosynthesehypothese ging man davon aus, dass der Cyclohexenonring aus drei

Propionateinheiten aufgebaut wird. Dieses sollte ein Fütterungsexperiment mit [1-^{13}C]Propionat bestätigen, allerdings wurden hierbei charakteristische Anreicherungen der C-Atome C-6, C-8 und C-11 beobachtet. Einen schwachen Einbau zeigten die Kohlenstoffatome C-4, C-5 und C-7, dessen Anreicherungen sich auf einen starken Stoffwechsel von Propionat zurückführen ließen. Abbildung 31 fasst das erwartete Einbaumuster gemäß der postulierten Biosynthesehypothese und die beobachteten Anreicherungen graphisch zusammen.[64]

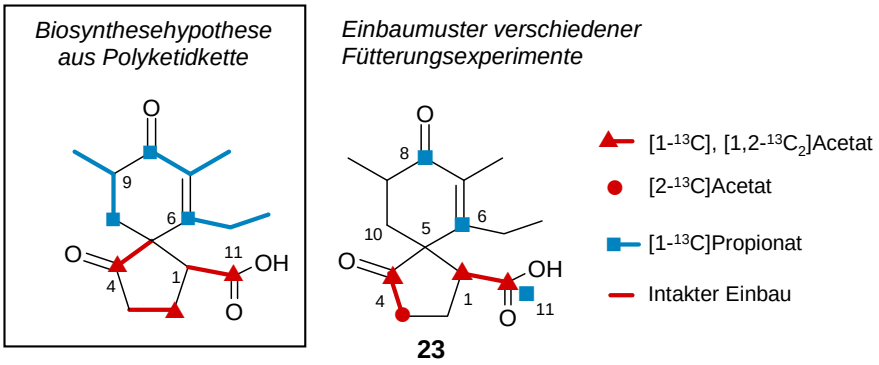


Abbildung 31: Die ersten Biosynthesehypothesen (A,B,C) und das beobachtete Einbaumuster in Spirodionsäure (23) aus den Fütterungsexperimenten mit [1-^{13}C]Acetat, [1,2-$^{13}C_2$]Acetat, [2-^{13}C]Acetat und [1-^{13}C]Propionat.[50]

Die Ergebnisse der Fütterungsexperimente konnten diese erste Biosynthesehypothese damit nicht belegen.[50] Das Einbaumuster aus den Fütterungsexperimenten mit [1-^{13}C]Acetat und [1,2-$^{13}C_2$]Acetat zeigten, dass im Molekül zwei intakte Acetateinheiten eingebaut wurden, die offensichtlich nicht in der vermuteten Polyketidbiosynthese-Kette gebildet wurden. Hierbei würde ein Einbau in den Kohlenstoffatomen C-1/C-11, C-2/C-3 und C-4/C-5 erwartet werden.

Das Fütterungsexperiment mit [1-^{13}C]Propinat zeigte zwar eindeutige Anreicherungen in den Kohlenstoffatomen C-6 und C-8. Es konnte jedoch kein erfolgreicher Einbau in das Kohlenstoffatom C-10 beobachtet werden, was im Gegensatz zu den ersten Biosynthesehypothesen stand, die von drei Propionateinheiten als Bausteine des Cyclohexenonringes ausgingen. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die erste Biosynthesehypothesen (A, B, C), die von einer Polyketidkette ausgehenEinkettenmechanismus postulierte, durch die Fütterungsexperimente mit ^{13}C-markierten Vorläufern nicht bestätigt werden konnte.

Im Rahmen der Doktorarbeit konnte das *2H*-Pyron (**29**) in angereicherter Form aus den Rohextrakten der Fütterungsexperimente mit [1-^{13}C]Acetat und [1-^{13}C]Propionat nach dem

unter 3.3.1 vorgestellten Schema isoliert werden. Die Analyse der gemessenen ^{13}C-NMR-Spektren zeigte lösungsmittelabhängige Isomerisierungen des 2*H*-Pyrons, weshalb ein Lösungsmittelwechsel zu CD_3OD durchgeführt wurde. Das ^{13}C-NMR-Spektrum des Fütterungsexperimentes mit [1-^{13}C]Acetat zeigte eine starke Anreicherung des Kohlenstoffatoms C-4 und moderaten Einbauraten in die C-Atome C-2 und C-6. Das Fütterungsexperiment mit [1-^{13}C]Propinat führte wiederum zu sehr starken Anreicherungen der C-Atome C-2 und C-6 und zu einem starken Einbau in das Kohlenstoffatom C-4 (siehe Abbildung 32). Die erhaltenen Anreicherungen aus dem Fütterungsexperiment mit [1-^{13}C]Propionat und das Substitutionsmuster zeigten deutliche Analogien zu der Cyclohexenoneinheit in Spirodionsäure (**23**).[64] Doch der bisherige Stand der biosynthetischen Arbeiten ließ keine weiteren Schlüsse bezüglich der Biosynthese von **23** zu.

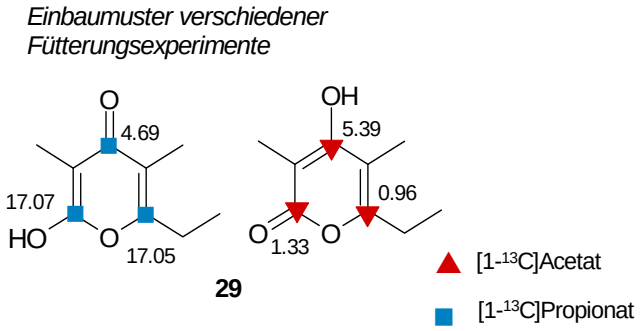


Abbildung 32: Zusammenfassung der beobachteten Anreicherungsmuster in 29 der Fütterungsexperimente mit [1-^{13}C]Acetat und [1-^{13}C]Propionat mit Angabe der spezifischen Anreicherung. Referenzatome: Durchschnitt von Methylgruppen C-8, C-9 und C-10.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollten die Ergebnisse der Vorarbeiten zur Biosynthese des interessanten Metaboliten Spirodionsäure (**23**) völlig neu überdacht und experimentell im Detail erarbeitet werden. Die detaillierte Prüfung der bisherigen Ergebnisse begann mit der Erstellung einer Produktionskurve von Spirodionsäure (**23**) während der Kultivierung des Stammes Tü 6077 in Medium S.

4.2.2 Fermentationskurve

Fermentationskurven zeigen für jeden Mikroorganismus einen charakteristischen Verlauf und sind ein notwendiges Werkzeug bei klassischen Biogenesestudien an Naturstoffen. Sie spiegeln das Verhalten des Produzenten während der Kultivierung wider und liefern wichtige

Hinweise über den pH-Verlauf und die Produktion von Sekundärmetaboliten. Mit ihrer Hilfe kann man den geeigneten Zeitpunkt und Dauer von Fütterungsexperimenten ermitteln. Demnach muss das Fütterungsexperiment zu Beginn der Produktion des anzureichernden Naturstoffes starten und mit dessen maximaler Konzentration enden. Kontinuierliche Fütterungsverfahren, die die markierten Vorläufer über einen definierten Zeitraum der Kultivierung zufügen, ermöglichen längere Fütterungszeiträume, die dem natürlichen Stoffwechsel gerecht werden. Die Aufnahme einer Fermentationskurve von **23** wurde im Rahmen der Doktorarbeit zweimal wiederholt und zeigte dabei reproduzierbare Ergebnisse an. Zur Erstellung der Fermentationskurve wurde der Stamm Tü 6077 in einem Biostat-B Fermenter kultiviert (2 L Medium S, 1 g/L α-Ketoglutarat nach 9 h, 28 °C, 500 rpm, Belüftung 4 vvm; siehe 9.1.2.1 Fermentationsansatz AJ). Es wurden alle sechs Stunden 15 mL Kulturbrühe entnommen, erstmals nach Animpfen bis zur 72. Inkubationsstunde. Die Aufarbeitung erfolgte analog zu Variante IV (siehe 9.2), wobei die Proben nicht lyophilisiert, sondern die Rohextrakte direkt in 110 µL MeOH gelöst und zentrifugiert wurden. Man entnahm 100 µL für die Analyse mittels analytischer HPLC (Säule 1, Programm 1, siehe 8.2). Die Analyse gestaltete sich hierbei immer noch als schwierig, da Nebenkomponenten mit intensiver UV-Absorption Spirodionsäure (**23**) überlagerten und somit eine relative Mengenbestimmung erschwerten. Im Vergleich zur Analyse über Dünnschichtchromatographie war dies aber eine geeignete Methode, da man **23** zweifelsfrei detektieren konnte. Über die HPLC-Analyse erfolgte eine Abschätzung des relativen Gehalts an Spirodionsäure (**23**) (grün) über die Fermentationszeit in Bezug auf den pH-Verlauf (rot) (siehe Abbildung 33).

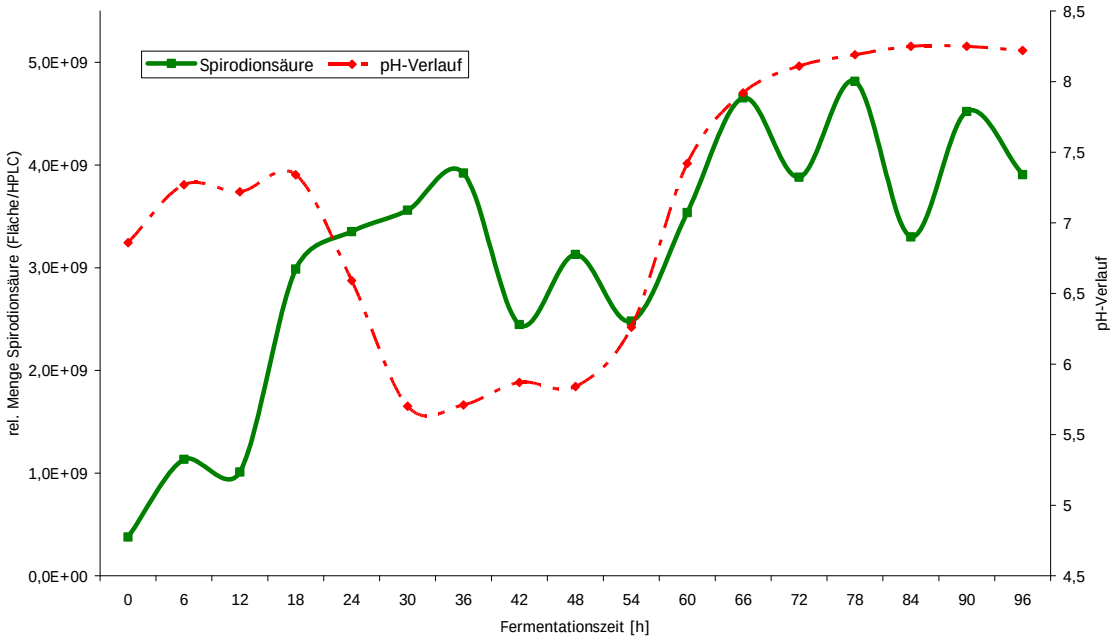


Abbildung 33: Fermentationsverlauf des Produzenten Tü 6077. Der Gehalt an Spirodionsäure (23) ist grün, der pH-Verlauf ist rot dargestellt. Die dargestellten Kurven wurden mit EXCEL bearbeitet.

Die Messpunkte der Kurve sind aus den Integralen der HPLC-Intensitäten von Spirodionsäure (**23**) bei 254 nm ermittelt.

Die Fermentationskurve (siehe Abbildung 33) zeigt innerhalb der ersten 18 h einen pH-Anstieg von 6.8 zu 7.3. Ab der 24. Stunde sinkt der pH-Wert stark und stagniert im Bereich 5.7 bis 5.8. Ab der 50. Stunde der Fermentation steigt der pH-Wert bis 8.2. Der Gehalt an **23** beginnt ab der 12. Stunde zu steigen und zeigt sein erstes Maximum in der Fermentationsphase, in der der pH-Verlauf sein Minimum erreicht. Diese Produktionskurve verdeutlicht den ungewöhnlichen Fermentationsverlauf des Produzenten Tü 6077. Lediglich Kultivierungen, die diesen Fermentationsverlauf aufwiesen, zeigten eine Produktion von **23**. Kultivierungsversuche mit einer künstlichen pH-Regulation (pH-Sperre von 24. bis 50. Stunde) konnten jedoch eine Produktion von Spirodionsäure (**23**) nicht erzwingen. Anhand dieser Ergebnisse galt es bei Fermentationen mit Tü 6077 den pH-Verlauf strengstens zu beobachten und im Falle einer Abweichung vom typischen Verlauf die Kultivierung frühzeitig abzubrechen und auf eine Zufütterung ^{13}C-markierter Vorläufer zu verzichten.

4.2.3 Fütterungsexperiment mit [2-^{13}C]Malonat

Im Rahmen der biosynthetischen Arbeiten an Spirodionsäure (**23**) erfolgte ein weiteres Fütterungsexperiment, um die zuvor erhaltenen Daten zum postulierten Polyketidmechanismus (Hypothese A, B; C Abbildung 27, Abbildung 30) zu überprüfen. Es wurde [2-^{13}C]Malonat als Vorläufer ausgewählt, um die Daten aus den Fütterungsexperimenten mit ^{13}C-angereicherten Acetat zu verifizieren. Das Ziel war es dabei, durch eine Zufütterung von ^{13}C-markierten Malonat, welches eine Alternative zu Acetat darstellt, eine bessere Gesamtanreicherung in Spirodionsäure (**23**) hervorzurufen.[99] Ebenso sollte ein Vergleich der Intensitäten der vorliegenden Einbaumuster der Acetat-Fütterungsexperimente mit dem der Malonat-Fütterung einen Hinweis auf die Startereinheit und die Verlängerungseinheiten geben.[100] Im Rahmen der Doktorarbeit wurden zuvor je zwei Fütterungsexperimente mit [1-^{13}C]Acetat und [1,2-$^{13}C_2$]Acetat durchgeführt. Aus den erhaltenen Rohextrakten konnte jedoch keine Spirodionsäure (**23**) isoliert werden.

Der Stamm *Streptomyces* Tü 6077 wurde im Biostat-B Fermenter mit 1.5 L Medium S* (glycerinarmes Nährmedium) unter Niveauregulierung fermentiert (siehe 10.2.1). Nach 10 h Kultivierung fügte man der Kulturbrühe 1 g/L α-Ketoglutarat unter sterilen Bedingungen hinzu. Die Lösung von [2-^{13}C]Dinatriummalonat wurde ab der 48. Stunde mittels einer Schlauchpumpe über 12 h kontinuierlich der Kulturbrühe zugefügt. Dabei fütterte man dem Stamm 1000 mg/L (6.8 mmol/L) [2-^{13}C]Dinatriummalonat in 50 mL wässriger Lösung (pH = 6.8) zu. Nach der 72. Stunde wurde die Fermentation beendet. Die Aufarbeitung erfolgte nach Variante VII (siehe 9.2). Die Aufreinigung erfolgte nach der in 9.3 beschriebenen Methode. Es konnten 1.0 mg/L angereicherte Spirodionsäure (**23**) isoliert werden. In folgender Tabelle ist der spezifische Einbau von [2-^{13}C]Malonat in Spirodionsäure (**23**) abgebildet. Die Berechnung erfolgte nach Formel 3 (Kap. 8.3.6).[98] Als Referenz diente dabei der Durchschnitt der im Molekül enthaltenen Methylgruppen (Durchschnitt von C-13, C-14, C-15), die mögliche nicht angereicherte C-Atome waren.[64]

C-Atom[a]	δ_C [ppm]	[2-^{13}C]Malonat spez. Einbau[a]
1	49.0	n.d.
2	23.3	**2.14**
3	37.8	**2.87**
4	218.4	n.d.
5	59.9	**4.02**
6	155.8	n.d.
7	135.0	**1.10**
8	200.0	n.d.
9	36.2	0.44
10	34.5	0.10
11	175.8	n.d.
12	26.4	0.24
13	13.0	0.06[ref]
14	12.4	0.07[ref]
15	16.0	0.16[ref]

Tabelle 2: ^{13}C-NMR Analyse der angereicherten Spirodionsäure (23) nach dem Fütterungsexperiment mit [2-^{13}C]Malonat. Spezifische Einbauraten >1.0 sind hervorgehoben. [a] ^{13}C-NMR Spektrum (150.8 MHz; Pyridin-d_5); [ref]: Referenzierung mittels Durchschnittsbildung; n.d. = nicht bestimmbar.

Bei diesem Fütterungsexperiment mit [2-^{13}C]Malonat konnte nur einer sehr geringe Menge Spirodionsäure (**23**) isoliert werden, dementsprechend ergab das ^{13}C-NMR-Experiment nur ein ungenügendes Signal-Rausch-Verhältnis, was sich in fünf fehlenden Signalen widerspiegelte.

Man beobachtete jedoch signifikante Anreicherungen der C-Atome C-2, C-3 und C-5. Einen schwachen Einbau zeigte das Kohlenstoffatom C-7 (siehe Abbildung 34). Dieses Ergebnis unterstützte die bisher erhaltenen Daten, jedoch brachte es keine neuen Erkenntnisse bezüglich der Biosynthese von **23**.[64]

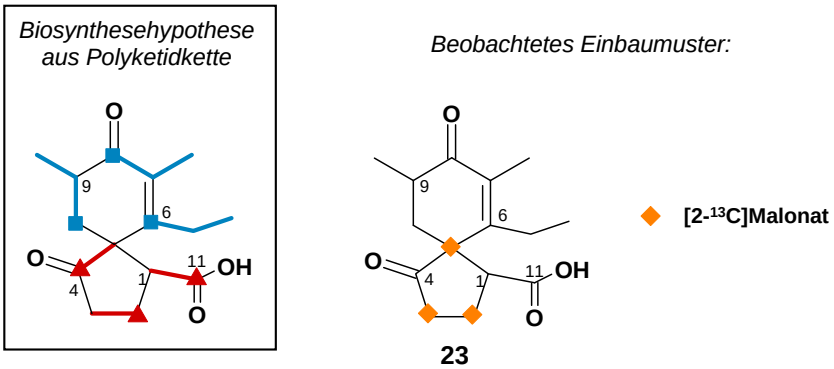


Abbildung 34: Die ersten Biosynthesehypothesen (A,B,C) und das beobachtete Einbaumuster in Spirodionsäure (23) aus den Fütterungsexperimenten mit [2-^{13}C]Malonat.[64]

Das Fütterungsexperiment mit [2-^{13}C]Malonat führte erstmals zu einem erfolgreichen Einbau in das Kohlenstoffatom C-5. Es konnte jedoch kein erfolgreicher Einbau in C-10 beobachtet werden. Um neue Erkenntnisse bezüglich der Biosynthese von **23** zu erhalten, musste ein weiteres Fütterungsexperiment mit ^{13}C-angereicherten Vorläufern durchgeführt werden. Da die typischen Polyketidbausteine wie Acetat, Propionat und Malonat keine Anreicherung des Kohlenstoffatoms C-10 zur Folge hatten, wurde Glycerin als möglicher Vorläufer ausgewählt.

4.3 „Separated-cell“ Experiment mit [U-$^{13}C_3$]Glycerin

Die Variationen der Kultivierungsbedingungen des Stammes Tü 6077 zeigten, dass mit glycerinhaltigem Medium S eine gute Produktion von Spirodionsäure (**23**) erzielt werden konnte. Demgegenüber wurden aus Kultivierungen mit Medium S* und NL 1345*, die als Glycerin-Ersatz einen Gehalt an Stärke und Glucose beinhalten, nur sehr geringe Mengen Spirodionsäure (**23**) hergestellt. Das wurde bereits während des Fütterungsexperiments mit [2-^{13}C]Malonat beobachtet. Der Einfluss der Kohlenstoffquelle Glycerin auf die Sekundärstoffproduktion von **23** wurde durch weitere Experimente, nämlich durch die Kultivierung des Produzenten in dem glycerinarmen Medium S* mit Zufütterung von unmarkiertem Glycerin überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Produktion von Spirodionsäure (**23**) sehr reduziert wurde und teilweise nicht stattfand. Aus diesen Beobachtungen wurde abgeleitet, dass Glycerin einen wichtigen Einfluss auf die Biosynthese von **23** haben und höchstwahrscheinlich ein essentieller Vorläufer von **23** sein musste. Ebenso schien es, dass der starke Bedarf an Glycerin besonders innerhalb der frühen Phase der Fermentation des Stammes Tü 6077 die Produktion der Spirodionsäurebiosynthese auslöste. Die Problematik

bestand nun darin, ein geeignetes Fütterungsexperiment mit ^{13}C-markierten Glycerin unter optimalen Bedingungen für die Produktion von **23** durchzuführen. Es musste eine ausreichende Menge an Glycerin zu Beginn der Kultivierung vorhanden sein, damit die Biosynthese von **23** initiiert werden konnte. Aber es durfte kein glycerinhaltiges Medium innerhalb des Fütterungszeitraumes vorherrschen, da dies die ^{13}C-angereicherte Glycerin-Lösung verdünnen würde und somit keine signifikanten Anreicherungen in **23** zur Folge haben könnte. Daher musste ein aufwendiges Fütterungsexperiment mit zwei verschiedenen Kultivierungsansätzen von Tü 6077 durchgeführt werden, um eine erfolgreiche Anreicherung der Spirodionsäure (**23**) in guten Ausbeuten in Aussicht zu stellen. Hierfür erfolgten zunächst zwei Fermentationen mit variierten Medien parallel im 1 L-Maßstab in Biostat B Fermentern: Ein Ansatz mit Medium S (glycerinhaltig) sollte innerhalb der ersten 24 Stunden die Produktion von **23** initiieren. Dessen Zellen sollten zunächst aus ihrer Kulturlösung isoliert werden und dann innerhalb der Produktionsphase von **23** ab der 24. Stunde in einem zweiten Ansatz in Medium S* (ohne Glycerin) weiter fermentiert und unter kontinuierlicher Zugabe der wässrigen [U-$^{13}C_3$]Glycerin-Lösung über zwölf Stunden kultiviert werden. Dieses Vorgehen sollte einen Verdünnungseffekt der ^{13}C-angereicherten Vorläuferlösung durch Glycerin aus dem Nährmedium vermeiden und eine optimale Anreicherung von **23** gewährleisten.[64]

Im Folgenden wird diese eher ungewöhnliche Idee im Detail beschrieben: Beide Fermentationsansätze wurden mit je 150 mL einer 72 h alten Vorkultur (1 L EMK ohne Schikane, 150 mL Medium S) angeimpft. Die Fermentationen erfolgten bei 28 °C, 500 rpm, 4 vvm und ohne pH-Sperre. Nach 24 h wurden beide Fermentationen abgebrochen und die Zellen unter sterilen Bedingungen vom Kulturfiltrat getrennt, indem man die Kulturbrühen bei 4 °C, 4000 rpm für 1 min steril zentrifugierte. Die Zellen der glycerinreichen Fermentation (mit Medium S) wurden nun mit dem Kulturüberstand der glycerinarmen Fermentation (mit Medium S*) unter sterilen Bedingungen vereinigt. Damit sollte gewährleistet sein, dass die Zellen durch einen anfänglichen hohen Gehalt an Glycerin im Medium S für die Spirodionsäure-Produktion vorbereitet wurden. Diese „aktivierten“ Zellen konnten nun im glycerinarmen Medium optimal die ^{13}C-angereicherte Glycerin-Lösung verwenden und die Produktion von ^{13}C-angereicherter Spirodionsäure (**23**) beginnen Die Kultivierung wurde fortgesetzt und das [U-$^{13}C_3$]Glycerin (505 mg/L, 5.3 mmol/L) wurde über eine Schlauchpumpe kontinuierlich bis zur 36. h zugefüttert. Die Fermentation wurde nach 72 h beendet und aufgearbeitet. Die Aufarbeitung erfolgte nach Variante I (siehe 9.2). Die

Aufreinigung erfolgte nach der in 9.3 beschriebenen Methode. Es wurden 5.8 mg/L angereicherte Spirodionsäure (**23**), das 2*H*-Pyron (**29**) und Dihydrosarkomycin (**30**) isoliert (siehe 4.3.1).[64]

Das ^{13}C-NMR Spektrum von **23** präsentierte signifikante Kopplungsmuster und wies auf einen hohen Einbau von [U-$^{13}C_3$]Glycerin in **23** hin. Es ließen sich intakte C_2-Einheiten für die C-Atome C-1/C-11, C-3/C-4, C-5/C-10, C-7/C-14, C-9/C-15 und C-12/C-13 ableiten. Eine zusätzliche Kopplung zwischen C-1/C-2 und ein intensiver Einbau in das Kohlenstoffatom C-2 zeigten, dass Isotopomere vorliegen mussten und führten zu der Annahme, dass die Bildung von Spirodionsäure (**23**) über verschiedene Pfade erfolgen musste. Zusätzlich wurde keine starke Einzelanreicherung in C-11 beobachtet.

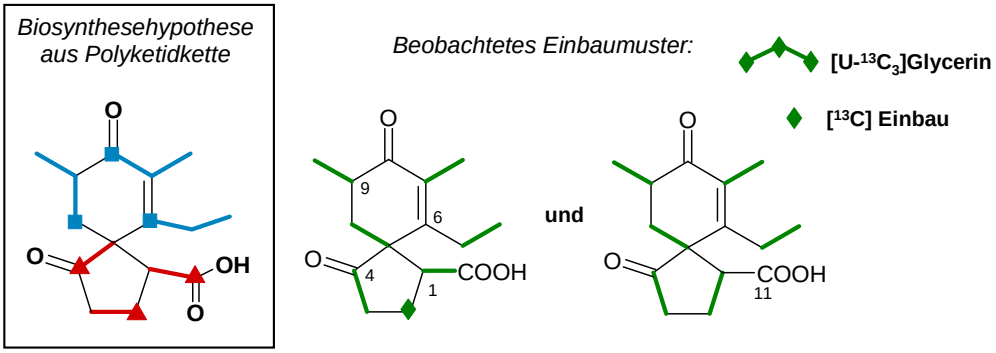


Abbildung 35: Die erste Biosynthesehypothese und im Vergleich das beobachtete Einbaumuster in Spirodionsäure (23) aus dem Fütterungsexperiment mit [U-$^{13}C_3$]Glycerin.

Die erhaltenen Einbaumuster zeigten eindeutig, dass die bisherige Biosynthesehypothese von Spirodionsäure (**23**) in der Form nicht gelten kann. Die erhaltenen Einbaumuster wiesen stark darauf hin, dass es sich bei der Biosynthese von **23** um einen komplexeren Mechanismus handeln musste, der nicht auf eine einfachen Polyketidkette aus Propionat und Acetat mit anschließender Cyclisierung zurückgeführt werden kann.[64]

4.3.1 Metabolitenmuster zur Aufklärung der Biosynthese von Spirodionsäure (23)

Das zuvor besprochene „separated-cell“-Experiment mit [U-$^{13}C_3$]Glycerin lieferte neben Spirodionsäure (**23**) auch das 2*H*-Pyron **29** und Dihydrosarkomycin (**30**) (sieheAbbildung 36).

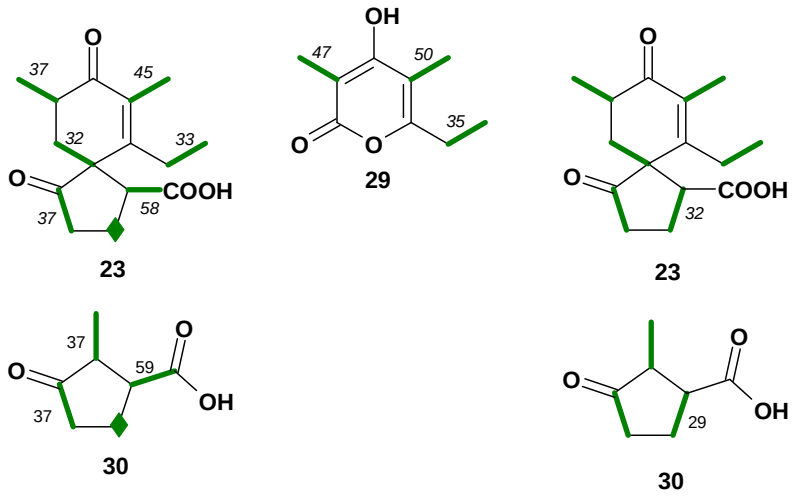


Abbildung 36: Die isolierten Sekundärstoffe Spirodionsäure (23), Dihydrosarkomycin (30) und das 2*H*-Pyron 29 mit beobachteten Einbaumuster und Kopplungskonstanten aus dem Fütterungsexperiment mit [U-$^{13}C_3$]Glycerin.

Vergleicht man das erhaltene Einbaumuster in dem 2*H*-Pyron **29** mit dem Cyclohexenonanteil („Kopf“-Teil) von **23**, so kann man klare Parallelen erkennen. Ebenso lässt ein Vergleich zwischen der Cyclopentanoneinheit („Schwanz“-Anteil) von **23** mit dem ungewöhnlichen Einbaumuster in **30** einen Zusammenhang vermuten.

Auf Grund dieser Erkenntnisse wurde die Theorie aufgestellt, dass die Bildung von Spirodionsäure (**23**) über eine Cyclisierung vom Diels-Alder-Typ der Sekundärstoffe **29** und **30** ablaufen sollte.[64] Folgende Tabelle stellt einen deutlichen Vergleich der erhaltenen ^{13}C-NMR-Daten von Spirodionsäure (**23**), Dihydrosarkomycin (**30**) und dem 2*H*-Pyron **29** mit beobachteten Einbaumuster und Kopplungskonstanten aus dem Fütterungsexperiment mit [U-$^{13}C_3$]Glycerin dar. Der „Kopf“-Anteil von **23** ist in Bezug auf **29** und der „Schwanz“-Anteil von **23** ist im Vergleich zu **30** dargestellt

C-Atom	δ_C [a] (23)	$J_{(C,C)}$ (23)	C-Atom	δ_C [b] (29)	$J_{(C,C)}$ (29)
C-1	49.0	32, 58	C-1	49.9	29, 59
C-2	23.3	32	C-5	25.2	29
C-3	37.8	37	C-4	37.2	37
C-4	218.4	37	C-3	217.9	37
C-5	59.9	32	C-2	47.9	37
C-10	34.5	32	C-7	13.4	37
C-11	175.8	58	C-6	177.0	59
-	-	-	**C-Atom**	**δ_C [c] (30)**	**$J_{(C,C)}$ (30)**
C-6	155.8	-	C-6	159.2	-
C-7	135.0	45	C-5	106.9	n.d.
C-8	200.0	-	C-4	166.1	-
C-9	36.2	37	C-3	98.3	n.d.
C-12	26.4	33	C-7	24.4	35
C-13	13.0	33	C-8	11.7	35
C-14	12.4	45	C-9	10.0	50
C-15	16.0	37	C-10	10.2	47
-	-	-	C-2	165.7	-

Tabelle 3: ^{13}C-NMR-Daten der angereicherten Metaboliten 23, 29 und 30 des Fütterungsexperiments mit [U-$^{13}C_3$]Glycerin im Vergleich (δ_C in ppm, $J_{(C,C)}$ = ^{13}C,^{13}C Kopplungskonstanten in Hz). [a] ^{13}C-NMR Spektrum (150.8 MHz, Pyridin-d_5). [b] ^{13}C-NMR Spektrum (125.7 MHz, Aceton-d_6). [c] ^{13}C-NMR Spektrum (150.8 MHz, CD_3OD).

Auf Grund der Hypothese, dass der Aufbau von Spirodionsäure (**23**) über eine Cyclisierung vom Diels-Alder-Typ mit den Metaboliten **29** und **30** erfolgen sollte, ließ sich eine neue Biosynthesehypothese für **23** formulieren. Sie ist graphisch in Abbildung 37 dargestellt.[64]

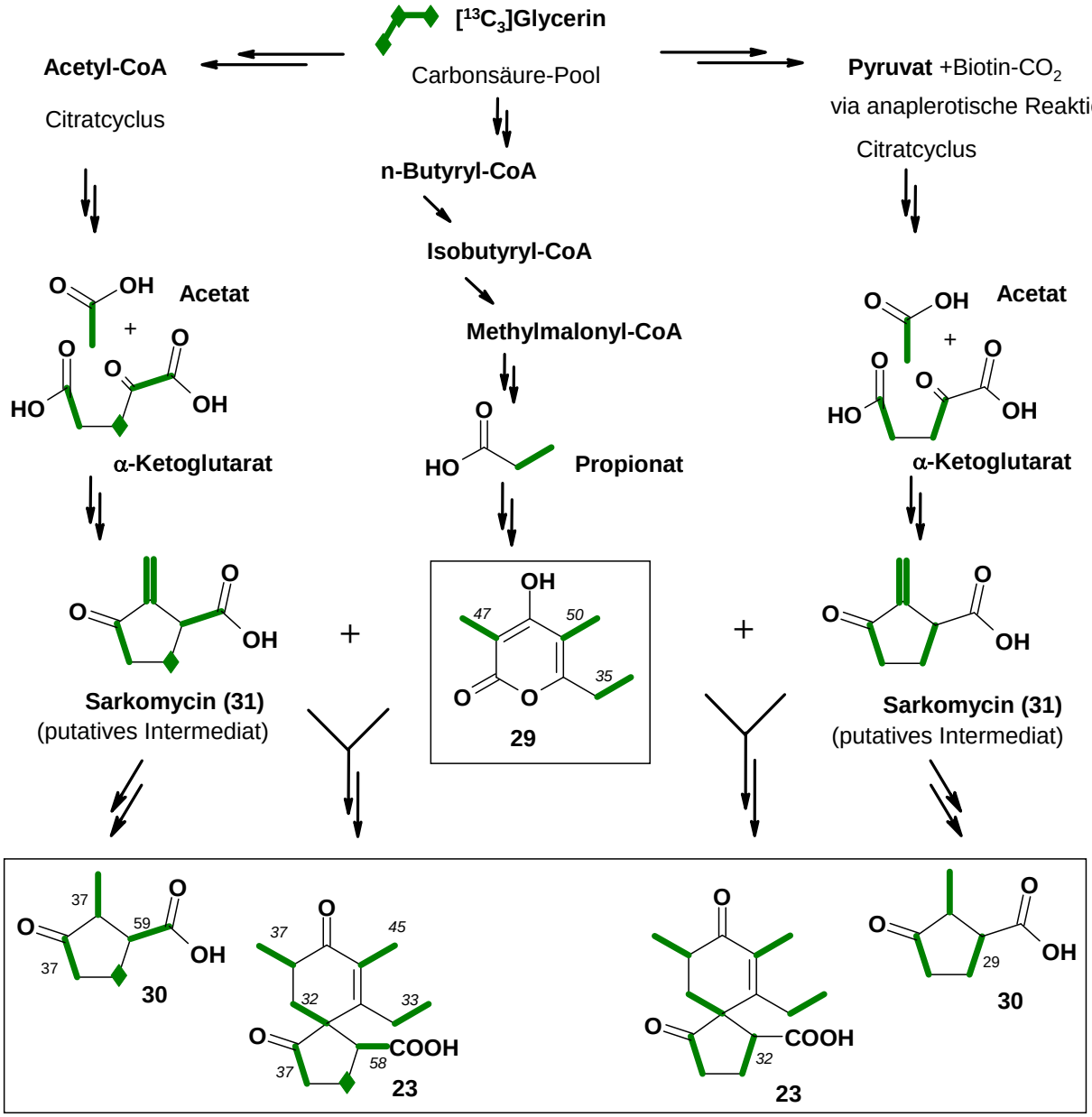


Abbildung 37: Biosynthesehypothese von Spirodionsäure (23) und den Sekundärmetaboliten 29 und 30, basierend auf den beobachteten Einbaumustern (Kästen). Die $^{13}C,^{13}C$-Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben und Rauten markieren Einzelanreicherungen.[64]

Aus dem Fütterungsexperiment mit [U-$^{13}C_3$]Glycerin sind für Spirodionsäure (**23**) intakte C_2-Einheiten der Kohlenstoffatome C-1/C-11, C-3/C-4, C-5/C-10, C-7/C-14, C-9/C-15 und C-12/C-13 zu beobachten. Das Entstehen von C_2-Einheiten aus dem C_3-Körper Glycerin ist mit dem bekannten Metabolismus von Glycerin über Glycerinaldehyd-3-phosphat und Phosphoenolpyruvat zu Acetyl-CoA zu erklären.[101-105]

Cyclohexenon-Biosynthese

Der „Kopf"-Anteil von Spirodionsäure (**23**) wird vermutlich über das 2*H*-Pyron **29** wie folgt in der Biosynthese aufgebaut: Zwei Claisen-ähnliche Kondensationsreaktionen überführen das vollständig angereicherte Acetyl-CoA über n-Butyryl-CoA, iso-Butyryl-CoA und schließlich zu Methylmalonyl-CoA. Letzteres reagiert anschließend, katalysiert durch die Methylmalonyldecarboxylase, unter CO_2-Abspaltung zu Propionat, dessen Einbaumuster nur noch eine intakte C_2-Einheit an den Kohlenstoffatomen C-2/C-3 beinhaltet. Der Metabolit **29** wird aus Propionat als Startereinheit und zwei Methylmalonylextendereinheiten aufgebaut, die sich in seinem Einbaumuster widerspiegeln.[101-105] Dabei ist anzumerken, dass keine weiteren Abbau- und Umbaureaktionen („scrambling") des markierten Glycerins über andere metabolische Biosynthesepfade beobachtet werden konnte. Aus diesem Grund überträgt das markierte Glycerin maßgeblich seine Anreicherung auf Acetat (C-1/C-2) und Propionat (C-2/C-3), die als Vorläufer der Biosynthese von **23**, **29** und **30** fungieren.

Cyclopentanon-Biosynthese

Die Cyclopentanon-Einheit der Spirodionsäure (**23**) zeigt aus dem Fütterungsexperiment mit [U-$^{13}C_3$]Glycerin ebenfalls den Einbau von intakten C_2-Einheiten. Hier lässt sich der Citratcyclus als Biosynthesepfad zugrunde legen. Das aus Glycerin entstandene Acetyl-CoA durchläuft den Citratcyclus und führt zu dem Aufbau von α-Ketoglutarat, welches zusammen mit Acetat die Cyclopentanon-Einheit bildet (siehe Abbildung 37). Wie jedoch bereits zu Beginn angemerkt, war eine zusätzliche Kopplung zwischen den C-Atomen C-1/C-2 zu beobachten. Diese zusätzliche intakte C_2-Einheit weist auf einen zusätzlichen Biosynthesepfad zu α-Ketoglutarat hin. Es handelt sich hierbei um den aus Bakterien bekannten anaplerotischen Aufbau von Oxalacetat aus Pyruvat, der über eine Biotin-CO_2 vermittelte Carboxylierung abläuft.[106, 107] Oxalacetat kann anschließend über den Citratcyclus zu α-Ketoglutarat reagieren und mit Acetat die Cyclopentanon-Einheit aufbauen (siehe Abbildung 37). Das beobachtete Einbaumuster des Cyclopentanonringes in **23** gibt über die Höhe der ^{13}C-Anreicherungen Aufschlüsse in welchem Maße der Stamm Tü 6077 diesen Stoffwechselweg zum biosynthetischen Aufbau der Cyclopentanon-Einheit nutzt. Zwei verschiedene Quellen, einerseits Acetyl-CoA und andererseits der anaplerotische Pfad, speisen diesen Kreislauf des Citratcyclus mit ^{13}C-markierten Precursoren, die ursprünglich aus [U^{13}-C_3]Glycerin stammen, und zwar im Verhältnis 3:2.[101-105]

Dihydrosarkomycin-Biosynthese

Außerdem wurde aus diesem Fütterungsexperiment mit [U-$^{13}C_3$]Glycerin das Dihydrosarkomycin (**30**) isoliert, in dessen ^{13}C-NMR-Spektrum hohe Einbauraten zu beobachten waren. Zusätzlich präsentiert **30** das gleiche ungewöhnliche Kopplungsmuster wie die Cyclopentanoneinheit in Spirodionsäure (**23**). In dem angereicherten Sekundärmetaboliten **30** ließen sich intakte C_2-Einheiten für die C-Atome C-1/C-5, C-2/C-7, C-3/C-4, eine zusätzliche Kopplung zwischen C-1/C-6 und ein intensiver Einbau in das Kohlenstoffatom C-5 detektieren. Dieses Muster zeigt, dass **30** auch α-Ketoglutarat und Acetat als Vorläufer hat. Auch hier wird das α-Ketoglutarat offensichtlich über die zwei beschriebenen Stoffwechselwege im Verhältnis 3:2 gebildet, nämlich über den Citratcyclus direkt und über die Biotin-CO_2-vermittelte anaplerotische Bildung von Oxalacetat, welches dann über den Citratcyclus zu α-Ketoglutarat reagiert.

2*H*-Pyron-Biosynthese

Für das 2*H*-Pyron **29** wurde mittels der Ergebnisse des Fütterungsexperimentes mit [1-^{13}C]Propinat eine mögliche Biosynthese aus drei Propionateinheiten dargelegt (siehe 4.2.1). [108] Auch das Fütterungsexperiment mit [U-$^{13}C_3$]Glycerin bestätigt diese Annahme durch das beobachtete Einbaumuster (siehe Abbildung 37). Ein ähnliches Einbaumuster lässt sich auch in dem Cyclohexenonring von Spirodionsäure (**23**) wieder finden. Der 2*H*-Pyron **29** zeigte drei intakte C_2-Einheiten in den beiden Methyl- und in den Ethylgruppen. Spirodionsäure (**23**) wies ebenso in seinen Methyl- und Ethylgruppen intakte C_2-Einheiten auf. Jedoch zeigte **23** eine zusätzliche C_2-Einheit in den Kohlenstoffatomen C-5/C-10, die in **29** nicht vorkommen. Diese C_2-Einheit stellt immer noch eine zu klärende Frage in der Biosynthese von **23** dar.

Es lässt sich also eine eindeutige biosynthetische Beziehung der Metaboliten **23**, **29** und **30** feststellen. Daraus lässt sich schließen, dass die Biosynthese von Spirodionsäure (**23**) über eine intermolekulare Reaktion von **29** und **30** stattfindet. Die ersten Biosynthesehypothesen, in denen angenommen wurde, dass **23** aus einer Polyketidkette aufgebaut wird, konnten somit ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse des Fütterungsexperiments mit [U-$^{13}C_3$]Glycerin legen die Vermutung nahe, dass Sarkomycin (**31**) und **29** über eine in der Biosynthese bisher unbekannte, einzigartige Diels-Alder-artige Reaktion als Dien und Dienophil cyclisieren und anschließend über Decarboxylierung die Spiro[4.5]decen-Struktur ausbilden. Hierbei sei anzumerken, dass also eine Diels-Alder-artige Reaktion den Aufbau eines cyclischen Produkts durch die Reaktion eines Diens mit einem Dienophil beschreibt, wobei es sich dabei

sowohl um eine konzertierte Cycloaddition oder eine ionische Michael-Addition handeln kann. Abbildung 38 illustriert die putative Diels-Alder-Reaktion zur Bildung von Spirodionsäure (**23**).[64]

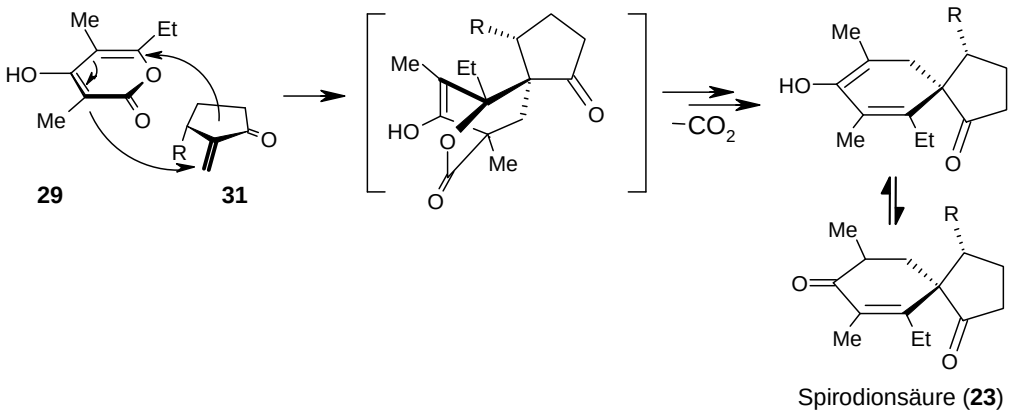


Abbildung 38: **Hypothetischer Biosyntheseweg: Intermolekulare Diels-Alder Reaktion für die Bildung von Spirodionsäure (23).**

Die aufgestellte Hypothese kann jedoch nicht die Möglichkeit einer Cyclisierung über eine doppelte ionische Michael-Addition ausschließen. In diesem Fall würde das Sarkomycin (**31**) als Michael-Akzeptor, das 2*H*-Pyron **29** nach Deprotonierung in seiner Enolat-Form als Michael-Donor fungieren (siehe Abbildung 39).[64]

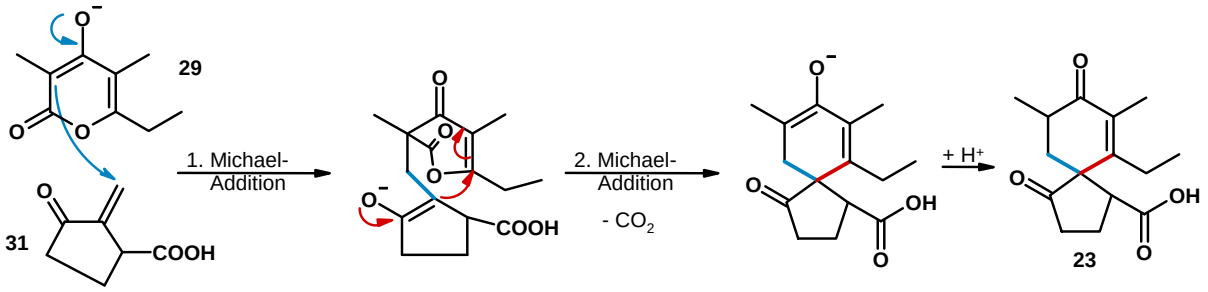


Abbildung 39: Alternativer Mechanismus einer doppelten ionischen Michael-Addition zur Ausbildung von Spirodionsäure (23).

Die Biosynthese von Spirodionsäure (**23**) gibt erstmals einen Hinweis auf eine bakterielle, intermolekulare Diels-Alder-Reaktion. Auf Grund des bisherigen Ergebnisstandes kann jedoch auch ein zweiter Mechanismus, eine doppelte ionische Michael-Addition als mögliche Biosynthese von **23** postuliert werden. Ein ähnliches Beispiel für diese Situation ist der pilzlichen Metabolit Makrophomsäure (**19**).[26] Die intensiven Biosynthesestudien an diesem

Sekundärstoff gaben starke Hinweise auf eine Diels-Alder-Cyclisierung. Obwohl es 2003 gelang die Makrophomat-Synthase mit Substrat zu kristallisieren, konnte eine Michael-Additon als plausible Alternative nicht ausgeschlossen werden.[21, 22] Quantenmechanische und molekular mechanistische Simulationen wiesen sogar auf eine höhere Wahrscheinlichkeit einer Tandem Michael-Aldol-Reaktion hin.[44]

Die Ergebnisse des Fütterungsexperimentes mit [U-$^{13}C_3$]Glycerin gewähren einen interessanten Einblick in den Metabolismus des Stammes Tü 6077. Die Biosynthesehypothese von **23** geht davon aus, dass der Aufbau dieses Sekundärstoffes über zwei Biosynthesepfade verläuft.

4.4 Vorläufer-dirigierte Biosynthese

Aufbauend auf den Erkenntnissen der Diels-Alder-artigen Biosynthesehypothese galt es, die Herstellung weiterer Spirodionsäure-Derivate zu untersuchen. Hierbei bot sich die Vorläufer-dirigierte Biosynthese an. Diese biologische Methode wird genutzt, um einen Naturstoff effektiv zu variieren und so z. B. Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erkennen oder eine Verbesserung der biologischen Aktivität zu erreichen. Außerdem können weitere Einblicke in seine Biosynthese gewonnen werden. Sie beruht auf der relativ geringen Substratspezifität der Enzyme des Sekundärstoffwechsels und nutzt aus, dass oft gering modifizierte Substratderivate akzeptiert werden. Dabei müssen die Vorläufer membranpermeabel sein und die entsprechenden Enzymapparate der Biosynthese erreichen. Bei der biologischen Derivatisierung muss zusätzlich sicher gestellt sein, dass die gefütterten Substanzen vom Produzenten toleriert werden, d. h. nicht toxisch für den Produzenten sind oder die Biosynthese des zu untersuchenden Metaboliten ausschalten.

Fütterungsexperimente mit Analoga des 2*H*-Pyrons **29** sollten den Produzenten Tü 6077 dazu veranlassen, Spirodionsäure-Derivate zu bilden. Der Nachweis dieser neuen Verbindungen würde die postulierte Biosynthese unterstützen. Da es sich bei Sarkomycin (**31**) um eine sehr reaktive Verbindung handelt, deren Analoga unter den vorherrschenden Fütterungsbedingungen cyclisieren würden, wurde von diesem Baustein von **23** vorerst abgesehen. Das 2*H*-Pyron **29** ist der vermutete Baustein des Cyclohexenon-Anteils in **23** und eine wesentlich stabilere Verbindung. Seine Analoga wurden somit für die Vorläufer-dirigierte Biosynthese ausgewählt.

4.4.1 Fütterungsexperiment mit 4-Hydroxy-6-methyl-2-pyron (39)

Als Voraussetzung für die Fütterungsexperimente sollte zunächst geklärt werden, ob der Stamm Tü 6077 unter Zugabe von Niax und DMSO, die die Aufnahme von Stoffen in die Zelle erleichtern könnten, die entsprechenden Naturstoffe synthetisiert.

Der Produzent Tü 6077 wurde in 1 L Erlenmeyerkolben (150 mL Medium S, Zusatz Spur 11 2.5 mL/L) kultiviert, indem man mit 10 mL Vorkultur beimpfte. Nach der 44. und 48. Stunde der Fermentation wurde dem Stamm in verschiedenen Kultivierungsansätzen jeweils Niax, DMSO bzw. das käuflich erhältliche 4-Hydroxy-6-methyl-2-pyron (**39**) unter sterilen Bedingungen zugefüttert. Die Fermentation erfolgte bei 28 °C und 180 rpm für 72 h in einem Rundschüttler (Variante D siehe 9.1.2.2). Die Kulturbrühe wurde nach pH-Einstellung mittels Celite-Zusatz filtriert und das Mycel wurde verworfen. Das erhaltene Kulturfiltrat wurde lyophilisiert, in Methanol aufgenommen und die unlöslichen Bestandteile abfiltriert. Die erhaltenen Rohprodukte wurden via HPLC-MS analysiert (c = 4 mg/mL), da diese Methode im Vergleich zur dünnschichtchromatographischen Analyse zur Detektion von Spirodionsäure (**23**) und ihren möglichen Derivaten geeignet war.

Die Analyse mittels HPLC-gekoppelter Massenspektrometrie zeigte, dass in den drei Kultivierungsansätzen Spirodionsäure gebildet (**23**) wurde, die folgenden Abbildungen zeigen die HPLC-ESI-MS-Chromatogramme der verschiedenen Fütterungsexperimente (siehe Abbildung 40, Abbildung 41 und Abbildung 43).

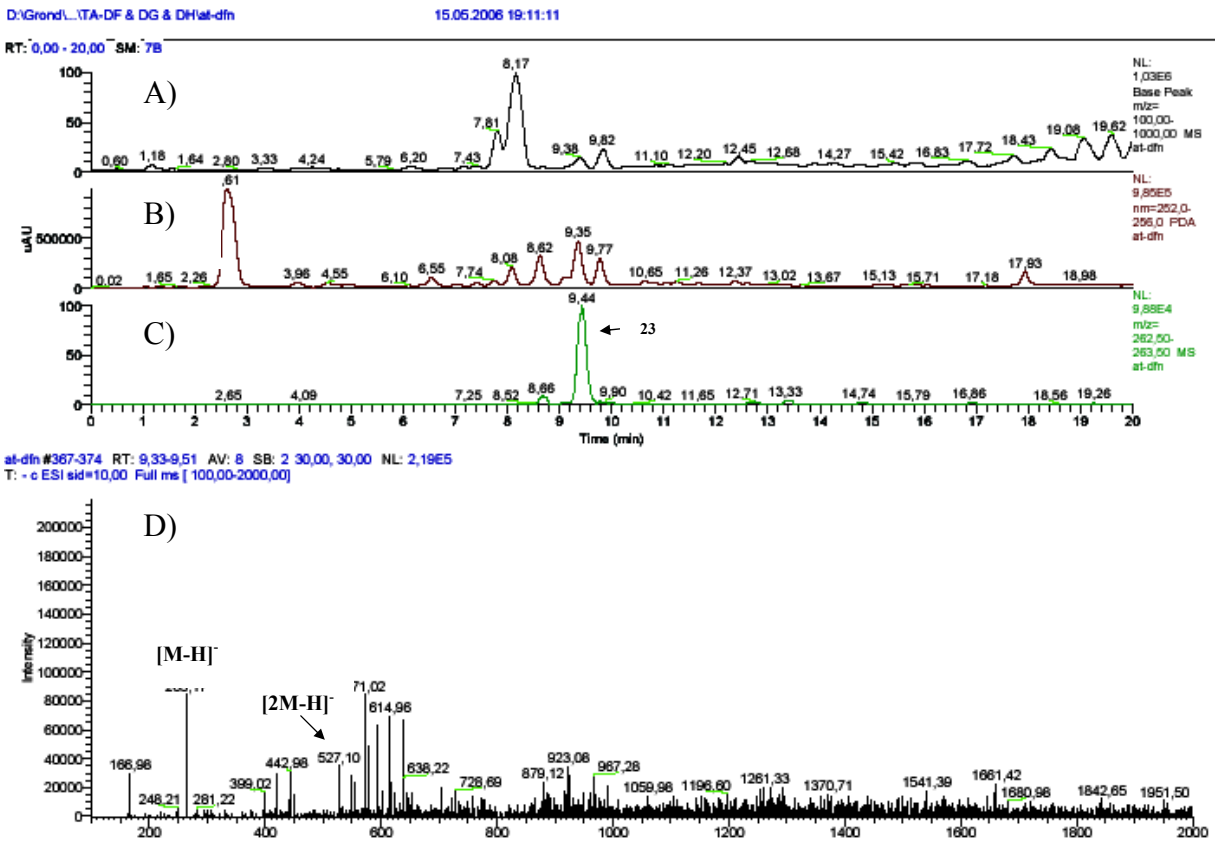


Abbildung 40: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm des Fütterungsexperiments mit Niax. A) Massenchromatogramm: Auftreten aller detektierbarer Massen, B) UV-Chromatogramm bei 252-256 nm, C) Massenchromatogramm mit eingeschränkter Suche von *m/z* = 263, D) ESI-MS-Spektrum von Spirodionsäure (23) im Rohprodukt.

Fütterungsexperiment mit Zugabe von Niax

Im Kultivierungsansatz mit Zufütterung von Niax wurde eindeutig Spirodionsäure (**23**) gebildet (siehe Abbildung 40). Abbildung 40 stellt das ausgewertete HPLC-ESI-Massenchromatogramm des Kultivierungsansatzes mit Zufütterung von Niax dar. Es ließen sich hierbei die zu **23** gehörenden Massen *m/z* = 263 $[M-H]^-$ und m/z = 527 $[2M-H]^-$ reproduzierbar bei einer Retentionszeit von ca. 9.5 min detektieren (Analytische HPLC mit MS-Kopplung, Säule 2, Programm 2; siehe Kapitel 8.2).

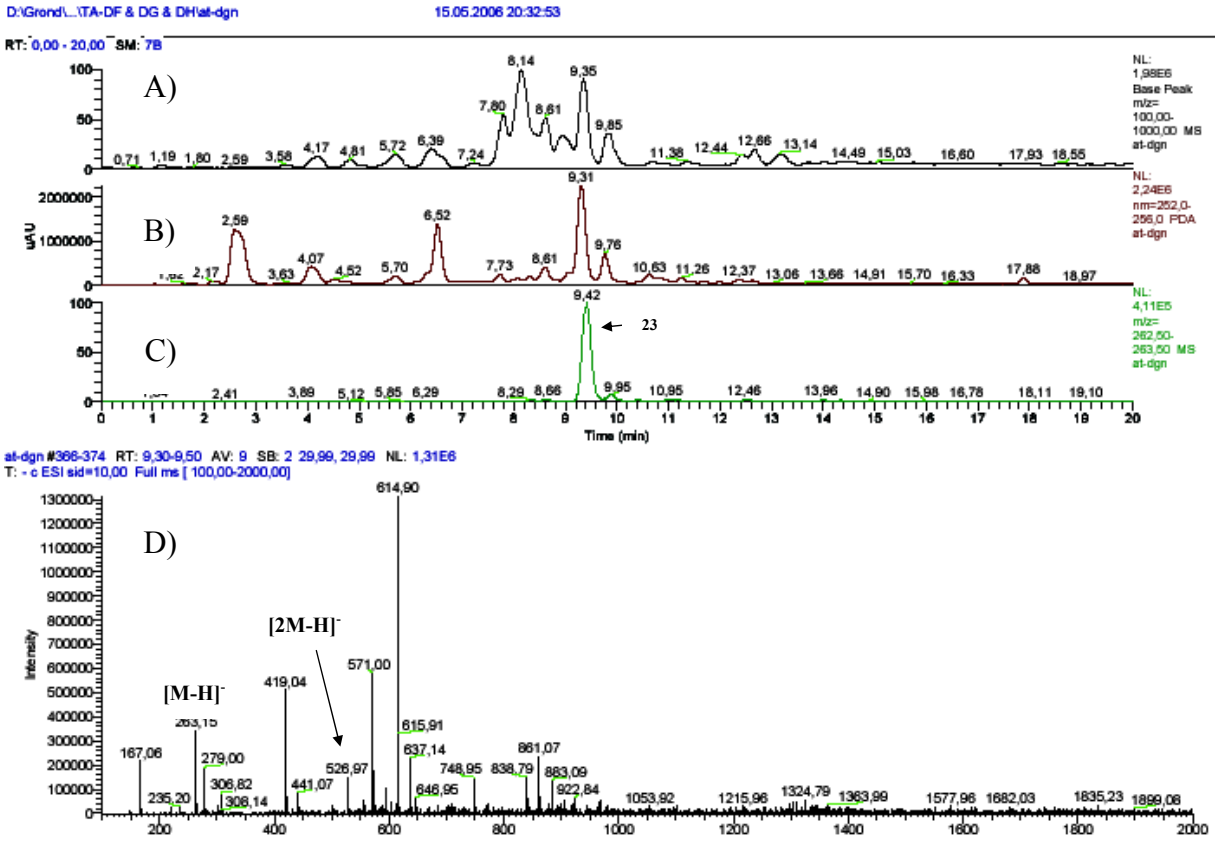


Abbildung 41: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm des Kultivierungsansatzes mit Zufütterung von DMSO. A) Massenchromatogramm B) UV-Chromatogramm (254 nm), C) Massenchromatogramm mit eingeschränkter Suche von *m/z* = 263, D) ESI-MS-Spektrum von Spirodionsäure (23) im Rohprodukt.

Fütterungsexperiment mit Zugabe von DMSO

Ebenso wurde im Kultivierungsansatz mit Zufütterung von DMSO eindeutig Spirodionsäure (**23**) gebildet. Abbildung 41 stellt das ausgewertete HPLC-ESI-Massenchromatogramm des Experimentes dar. Hierbei ließen sich die zu **23** gehörenden Massen *m/z* = 263 $[M-H]^-$ und m/z = 527 $[2M-H]^-$ im negativen Modus reproduzierbar bei einer Retentionszeit von ca. 9.5 min detektieren (Analytische HPLC mit MS-Kopplung, Säule 2, Programm 2; siehe Kapitel 8.2).

Fütterungsexperiment mit Zugabe von 6-Methyl-4-hydroxy-2-pyron (39)

Die Zufütterung des Vorläufers 6-Methyl-4-hydroxy-2-pyron (**39**) sollte analog zur Biosynthesehypothese (siehe Abbildung 37) die Herstellung des Spirodionsäure-Derivats **40** ermöglichen (siehe Abbildung 42).

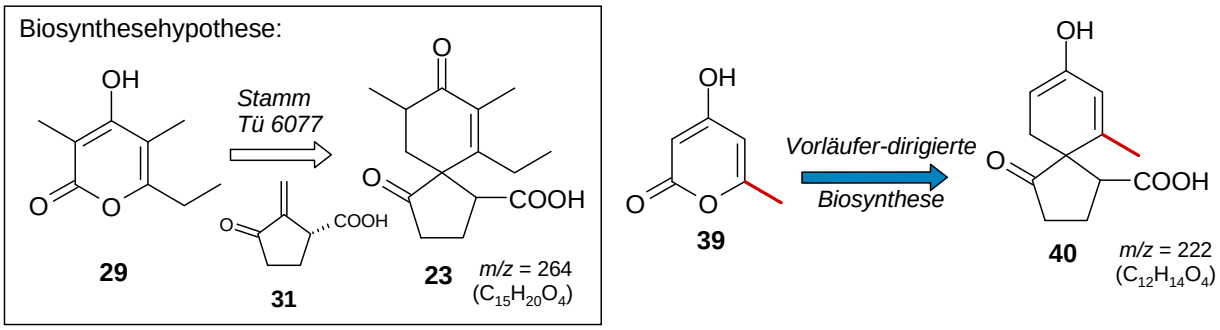


Abbildung 42: Biosynthesehypothese von Spirodionsäure (23) und Hypothese zur Vorläufer-dirigierten Biosynthese mit dem Stamm Tü 6077.[64]

Im Kultivierungsansatz mit Zufütterung von dem käuflich erwerbbaren 6-Methyl-4-hydroxy-2-pyron (**39**) wurde Spirodionsäure (**23**) produziert (siehe Abbildung 43). Das ESI-Spektrum (negativer Modus) des Signals mit einer Retentionszeit von 9.5 min zeigt sowohl den Signal mit *m/z* =263 $[M-H]^-$ als auch den mit *m/z* =527 $[2M-H]^-$.

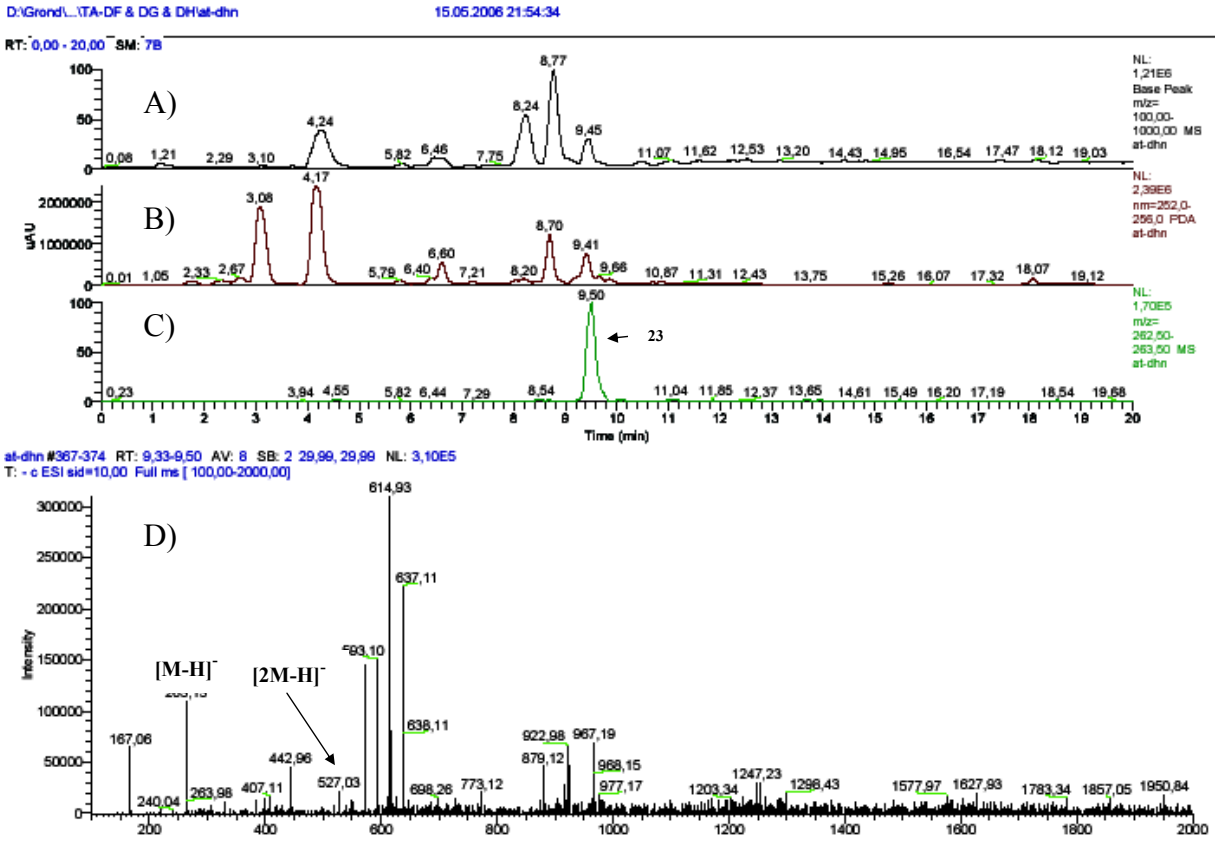


Abbildung 43: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm des Fütterungsexperiments mit 6-Methyl-4-hydroxy-2-pyron (39). A) Massenchromatogramm, B) UV-Chromatogramm (252-256 nm), C) Massenchromatogramm mit spezieller Suche von *m/z* = 263, D) ESI-MS-Spektrum von Spirodionsäure (23) im Rohprodukt.

Die HPLC-ESI-MS-Analyse lieferte kein Ergebnis bezüglich des erfolgreichen Einbaus des Vorläufers **40** (siehe Abbildung 44). Im negativen Modus konnte mittels definierter Massenpeaksuche ein Signal mit *m/z* = 221 (Rt = 4.2 min) detektiert werden, dessen Intensität (3×10^4) als sehr gering einzuschätzen war (siehe Abschnitt D in Abbildung 44). Die Analyse des dazugehörigen positiven Modus erbrachte keine entsprechenden Daten. Der bei einer Retentionszeit von Rt = 4.2 min detektierte Signal scheint ein Metabolit mit *m/z* = 266 $[M-H]^-$ zu sein, der jedoch keiner bisher diskutierten Struktur zuzuordnen ist. Somit weisen die Daten darauf hin, dass das Fütterungsexperiment mit 6-Methyl-4-hydroxy-2-pyron (**39**) als Vorläufer nicht zu einem entsprechenden Spirodionsäure-Derivat (**40**) geführt hat.

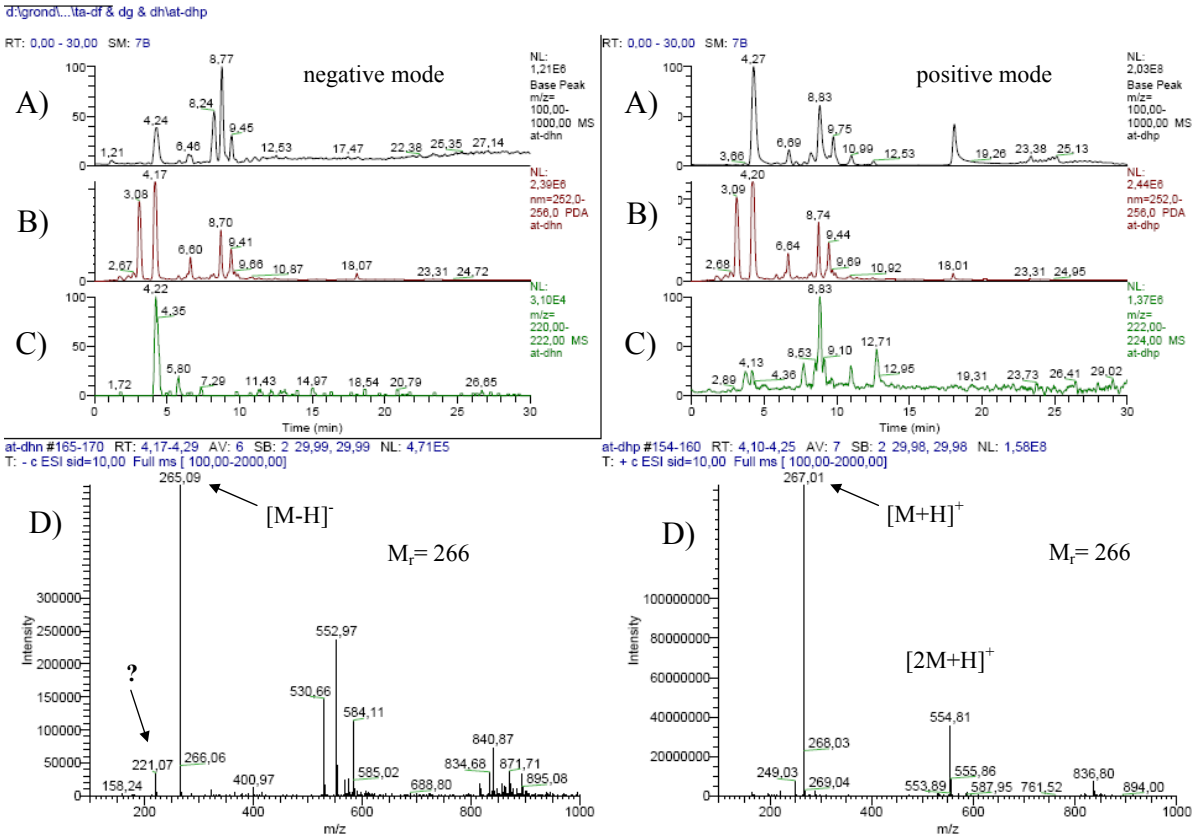


Abbildung 44: HPLC-ESI-MS-Chromatogramme des Fütterungsexperiments mit 6-Methyl-4-hydroxy-2-pyron (39). Linke Seite: Negativer Modus; Rechte Seite: Positiver Modus A) Massenchromatogramm B) UV-Chromatogramm (252-256 nm), C) Massenchromatogramm mit definierter Massenpeaksuche von *m/z* = 221 bzw. *m/z* = 223, D) ESI-MS-Spektrum des Signals mit der Retentionszeit = 4.22 min bzw. 4.17 min im Rohprodukt.

Zusammenfassend wird die relative Menge von **23** in Abbildung 45 in den Rohprodukten der verschiedenen Fütterungsexperimente graphisch gegenübergestellt. Eine genaue Bestimmung der Spirodionsäure-Menge mithilfe der Integrale der aus Rohextrakten erhaltenen MS-Chromatogramme ist nicht möglich, da sich die Vielzahl der detektierbaren Metaboliten überlagern, eine Abschätzung sei jedoch erlaubt. Vergleicht man die relativen Mengen von **23** der Rohprodukte, so zeigt sich, dass der Kultivierungsansatz mit Zufütterung von DMSO die höchste Produktion von Spirodionsäure (**23**) in dem Produzenten Tü 6077 hervorrief. Dieses Phänomen könnte eine Stressreaktion des Stammes auf den Zusatz DMSO, der die Zellwände angreift, sein. Der Zusatz Niax, der bei Kultivierungen üblicherweise als Entschäumer verwendet wird, zeigte die niedrigste Produktionsrate von **23**. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Zusatz dieses Polyalkohols anscheinend einen negativen Einfluss auf die Produktion **23** hatte. Die vergleichende Quantifizierung der gebildeten Spirodionsäure (**23**)

aus dem Rohextrakt gelingt über die Auswertung der UV-Chromatogramme der verschiedenen Fütterungsexperimente.

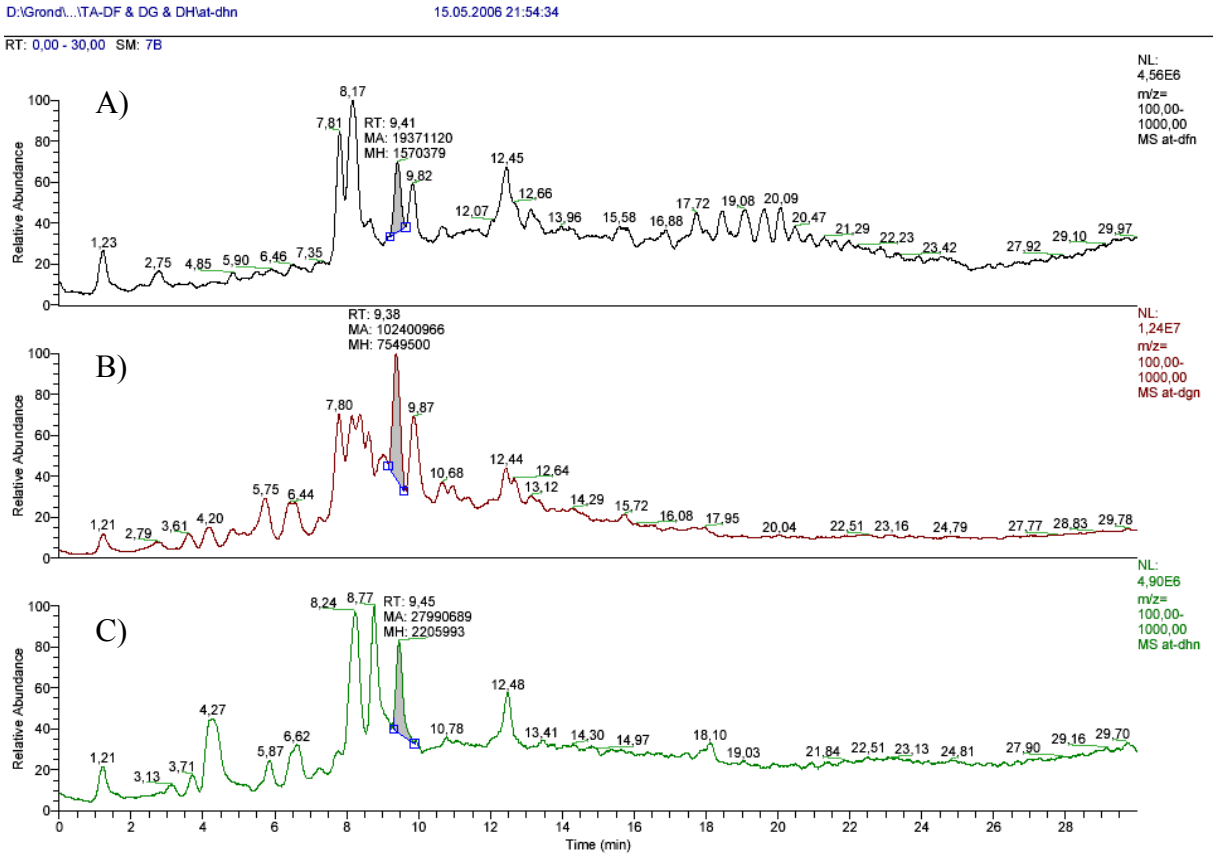


Abbildung 45: Zusammenfassung der HPLC-ESI-MS-Chromatogramme der Kultivierungsansätze mit Zufütterung von Niax, DMSO bzw. 6-Methyl-4-hydroxy-2-pyron (39). Graphischer Vergleich der relativen Produktion von Spirodionsäure über die Integrale der detektierten Signale (Einschränkung. *m/z* = 100-1000). A) Massenchromatogramm des Fütterungsexperiments mit Niax, B) Massenchromatogramm des Fütterungsexperiments mit DMSO, C) Massenchromatogramm des Fütterungsexperiments mit 6-Methyl-4-hydroxy-2-pyron (39).

Da das Fütterungsexperiment mit **39** zu keiner eindeutigen Produktion von **40** geführt hatte, sollte ein weiteres Fütterungsexperiment die Biosynthesehypothese überprüfen. Innerhalb der Kooperation mit dem Arbeitskreis von P. von ZEZSCHWITZ synthetisierte J. SIEWERT die 2-Methyl-3,5-dioxoheptansäure (**41**), die als offenkettige Variante des 2*H*-Pyrons **42** betrachtet werden kann. Diese Verbindung sollte dem Stamm zugefüttert und den Aufbau eines Spirodionsäure-Derivats **43** ermöglichen. Die zuzufütternde Substanz erwies sich als äußerst instabil und man konnte bei Raumtemperatur eine unerwünschte Cyclisierung feststellen. Dies erforderte beim Fütterungsexperiment eine besonders rasche Handhabung.

4.4.2 Fütterungsexperiment mit dem Vorläufer 2-Methyl-3,5-dioxoheptansäure (41)

Der Kultivierungsansatz mit Zufütterung des Vorläufers 2-Methyl-3,5-dioxoheptansäure (**41**) sollte in Anlehnung an die Biosynthesehypothese (siehe Abbildung 37) zur Produktion eines Spirodionsäure-Derivats **43** führen.

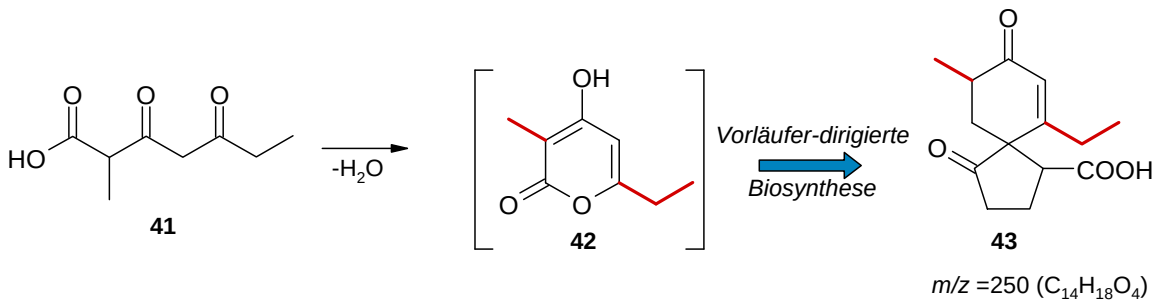
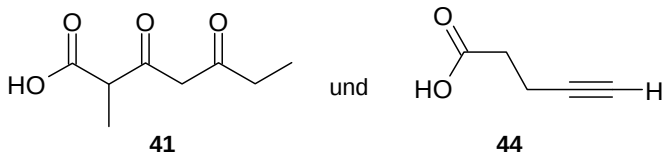


Abbildung 46: Spirodionsäure-Derivat 43 analog der Biosynthesehypothese.

Die Kultivierung des Stammes Tü 6077 erfolgte in 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikane. Jeder Kolben wurde mit 100 mL Medium S befüllt und nach Sterilisation mit 10 mL Vorkultur beimpft. Nach der 24. h der Kultivierung wurden der Fermentation in jeweils drei Kolben i) 2-Methyl-3,5-dioxoheptansäure (0.5 mL, 0.18 mmol/L, gelöst in 99%igen Ethanol) (**41**), ii) 4-Pentinsäure (0.5 mL, 0.18 mmol/L, gelöst in 99%igen Ethanol) (**44**), iii) Tween 40® (2.0 mL, 5 mL/L, Volumen Tween 40®/H_2O 1:3) und iv) ein Gemisch aus 2-Methyl-3,5-dioxoheptansäure (0.5 mL, 0.18 mmol/L, gelöst in 99%igen Ethanol) (**41**) und 4-Pentinsäure (0.5 mL, 0.18 mmol/L, gelöst in 99%igen Ethanol) (**44**) unter sterilen Bedingungen zugesetzt.



4-Pentinsäure (**44**) ist ein bekannter Inhibitor der β-Oxidation von Fettsäuren. [109] Der Zusatz von **44** sollte bei dem Fütterungsexperiment mit 2-Methyl-3,5-dioxoheptansäure (**41**) ihren möglichen Abbau durch die β-Oxidation verhindern.

Die Kultivierung erfolgte bei 28 °C und 120 rpm für 72 h in einem Längsschüttler. Es wurden drei Erlenmeyerkolben als Referenz ohne Zusätze unter den gleichen Bedingungen inkubiert (Variante E siehe 9.1.2.2). Die Kulturbrühen wurden nach pH-Einstellung mittels Celite-Zusatz filtriert und das Mycel wurde verworfen. Die erhaltenen Kulturfiltrate wurden lyophilisiert. Die Rohprodukte wurden in wenig demin. Wasser aufgenommen, dreimal mit Ethylacetat (Volumina Ethylacetat/Kulturfiltrat 1:1) extrahiert, und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Die Rohextrakte wurden mittels HPLC-MS analysiert (c = 4 mg/mL), da dies eine geeignete Methode zur Detektion von Spirodionsäure (**23**) war (Analytische HPLC mit MS-Kopplung, Säule 2, Programm 2; siehe Kapitel 8.2).

Die Analyse zeigte, dass in den vier verschiedenen Ansätzen Spirodionsäure (**23**) gebildet wurde. Die folgenden beiden Abbildungen zeigen die HPLC-ESI-MS-Chromatogramme der verschiedenen Kultivierungsansätze mit Zufütterung (siehe Abbildung 47 und Abbildung 48).

In allen Ansätzen konnte für Spirodionsäure (**23**) im negativen Modus ein Massenpeak mit *m/z* = 263 detektiert werden. Anhand der Analyse mittels HPLC-gekoppelter Massenspektrometrie konnte das erwartete Produkt aus der möglichen Vorläufer-dirigierten Biosynthese nicht beobachtet werden. Es wurden keine signifikanten Massenpeaks mit der Masse *m/z* = 249 $[M-H]^-$ im negativen Modus bzw. *m/z* = 251 $[M+H]^+$ im positiven Modus gefunden (siehe Abbildung 49). Normalerweise zeigt sich bei dieser Fragestellung die Leistungsfähigkeit der HPLC-ESI-MS-Analyse: Die Masse der gesuchten Substanz ist bekannt und somit kann gezielt nach möglichen Ionen ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+Na]^+$, $[M-H]^-$ etc.) gesucht werden. Im vorliegenden Experiment weist die erfolglose Suche nach Fragmentionen auf eine fehlende Produktion hin.

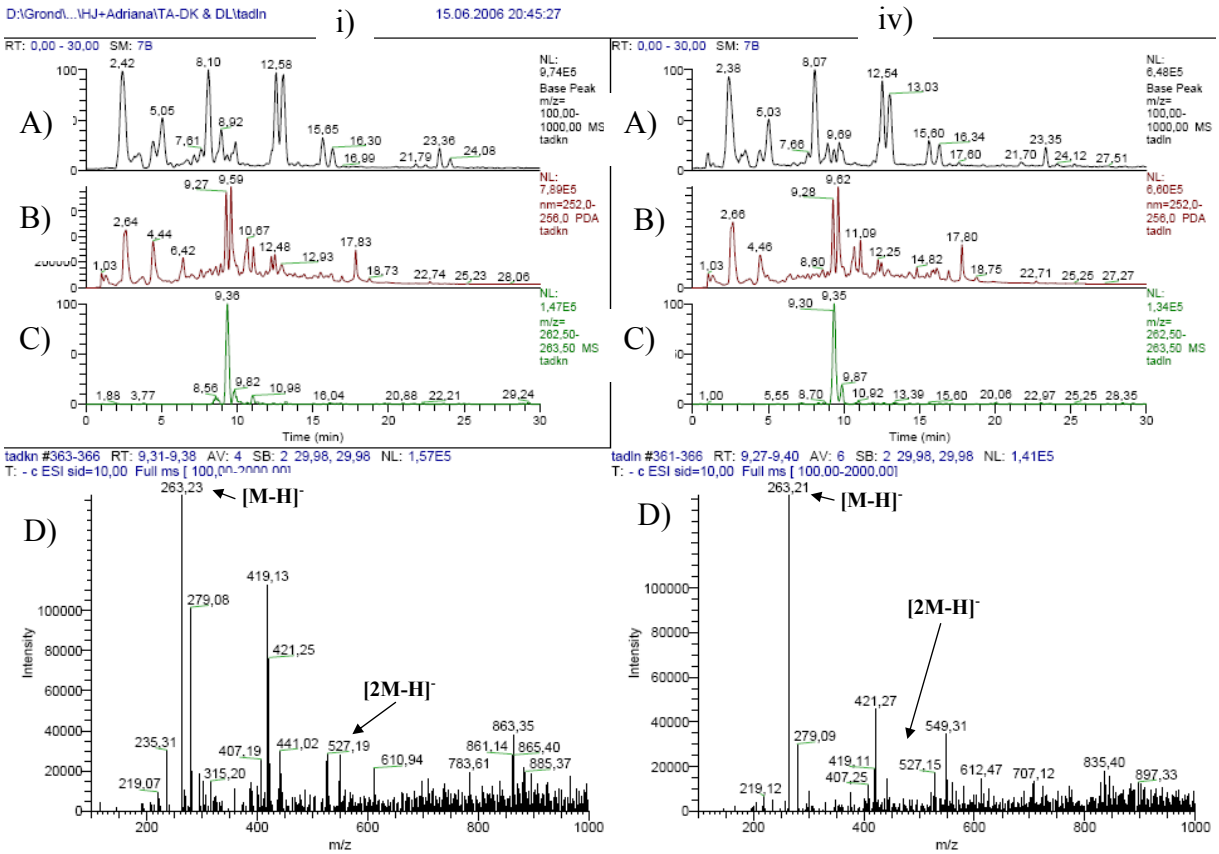


Abbildung 47: HPLC-ESI-MS-Chromatogramme der Kultivierungsansätze mit Zufütterung von i) 2-Methyl-3,5-dixoheptansäure (41) und iv) 2-Methyl-3,5-dixoheptansäure (41) und 4-Pentinsäure (44). Linke Seite: Negativer Modus des Rohextraktes aus i). Rechte Seite: Negativer Modus des Rohextraktes aus iv) A) Massenchromatogramm B) UV-Chromatogramm (254 nm), C) Massenchromatogramm mit eingeschränkter Massenpeaksuche von *m/z* = 263, D) ESI-MS-Spektrum von Spirodionsäure (23) im Rohprodukt.

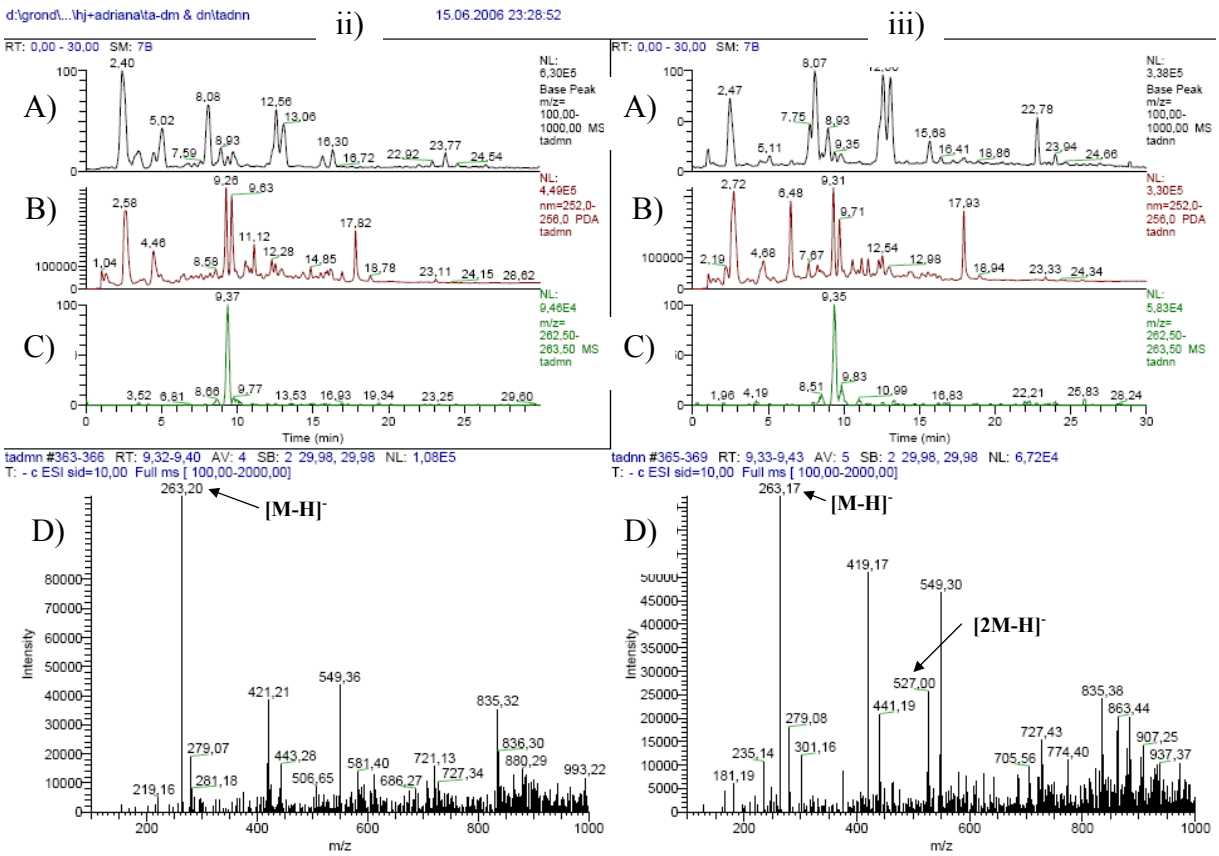


Abbildung 48: HPLC-ESI-MS-Chromatogramme der Fütterungsexperimente mit ii) 4-Pentinsäure (44) und iii) Tween 40®. Linke Seite: Negativer Modus des Rohextraktes aus ii). Rechte Seite: Negativer Modus des Rohextraktes aus iii) A) Massenchromatogramm B) UV-Chromatogramm (254 nm), C) Massenchromatogramm mit eingeschränkter Massenpeaksuche von *m/z* = 263, D) ESI-MS-Spektrum von Spirodionsäure (23) im Rohprodukt.

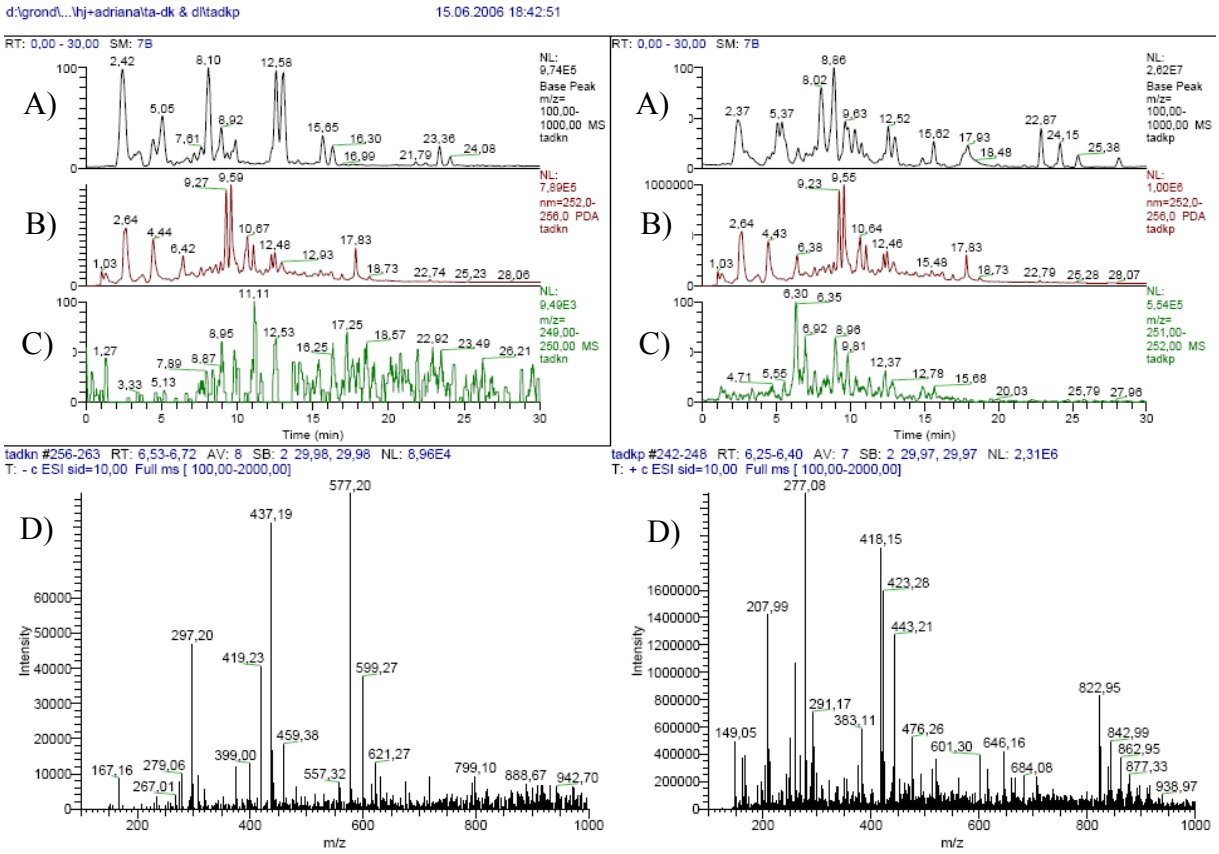


Abbildung 49: HPLC-ESI-MS-Chromatogramme des Fütterungsexperiments mit i) 2-Methyl-3,5-dioxoheptansäure (41). Linke Seite: Negativer Modus; Rechte Seite: Positiver Modus A) Massenchromatogramm, B) UV-Chromatogramm (254 nm), C) Massenchromatogramm mit eingeschränkter Massenpeaksuche von *m/z* = 249 bzw. *m/z* = 251, D) ESI-MS-Spektrum des Signals mit der Retentionszeit = 6.55 min bzw. 6.30 min im Rohprodukt.

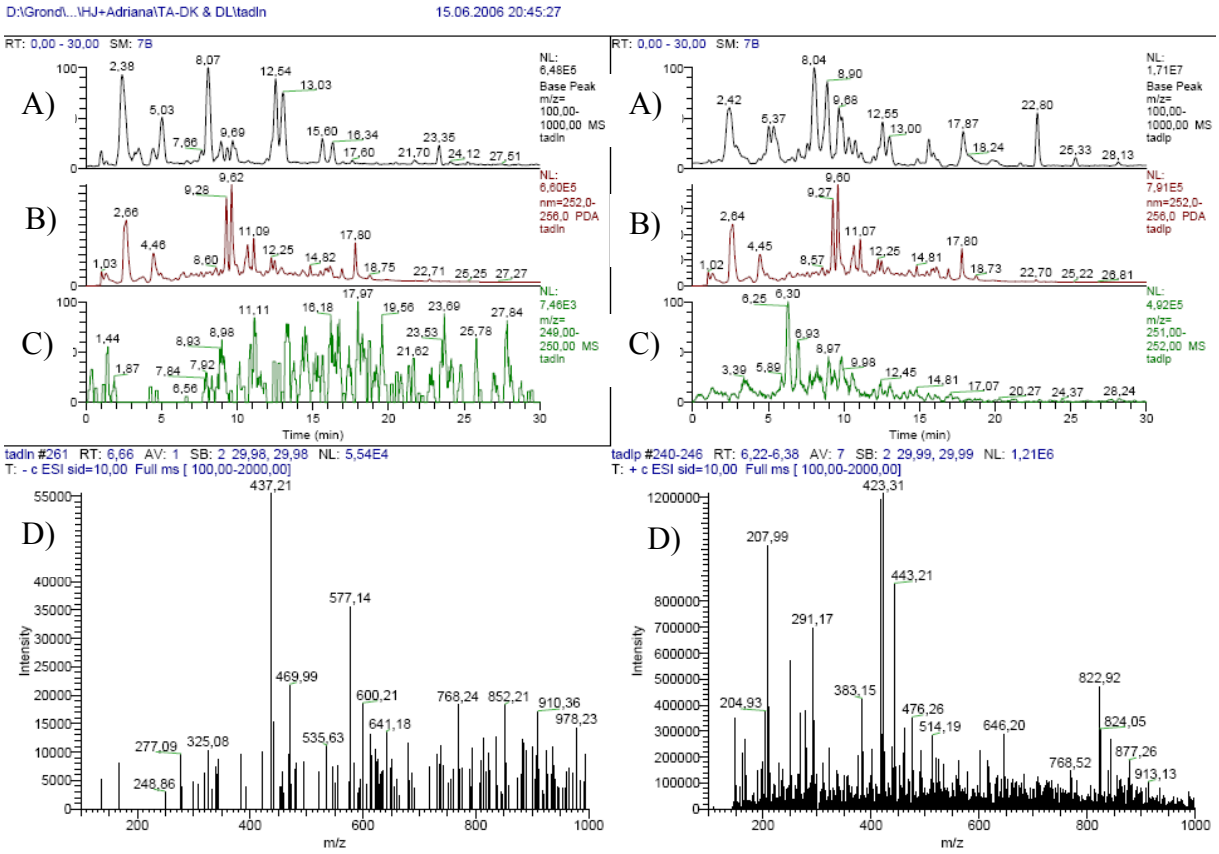


Abbildung 50: HPLC-ESI-MS-Chromatogramme der Kultivierungsansätze mit Zufütterung iv) des Gemisches aus 2-Methyl-3,5-dixoheptansäure (41) mit 4-Pentinsäure (44). Linke Seite: Negativer Modus; Rechte Seite: Positiver Modus A) Massenchromatogramm, B) UV-Chromatogramm (254 nm), C) Massenchromatogramm mit eingeschränkter Suche von *m/z* = 249 bzw. *m/z* = 251, D) ESI-MS-Spektrum des Signals mit der Retentionszeit = 6.66 min bzw. 6.30 min im Rohprodukt.

Im Kultivierungsansatz iv) sollte die Zugabe von 4-Pentinsäure (**44**), ein literaturbekannter Inhibitor der β-Oxidation von Fettsäuren, einen möglichen Abbau von **41** verhindern**.** CANE et al. erhielten durch Fütterungsexperimente mit markierten Intermediaten von Nargenicin in Kombination mit 4-Pentinsäure (**44**) neue Erkenntnisse über die Biosynthese des Nargenicins und konnten den putativen Schritt einer intramolekularen Diels-Alder-Cyclisierung in *Nocardia argentinensis* weiter untermauern.[110] Interessanterweise scheint 4-Pentinsäure (**44**) nicht direkt Enzyme der β-Oxidation zu inhibieren. Sie wird höchstwahrscheinlich *in vivo* zu einem Derivat von Propionsäure abgebaut, wobei 2-Alkinsäuren im Allgemeinen bekannte Hemmstoffe der Acyl-CoA-Dehydrogenase, des ersten Enzyms der β-Oxidation, sind.[109] Allerdings konnte auch durch die Zugabe von **44** keine signifikante Bildung des Derivats **43** ausgehend von **41**, in den HPLC-ESI-MS-Messungen detektiert werden (siehe Abbildung 50).

Somit konnten die beiden durchgeführten Fütterungsexperimente mit **39** und **42**, die ein cyclisches und offenkettiges Analogon des 2*H*-Pyrons darstellen, nicht die Bildung der Spirodionsäure-Derivate **40** und **43** auslösen. Gemäß der postulierten Biosynthesehypothese, in der die Bildung von Spirodionsäure (**23**) durch eine Diels-Alder-artige Cyclisierung des 2*H*-Pyrons **29** und Sarkomycin (**31)** unter Decarboxylierung ablaufen könnte**,** sollte **29** ein direkter Vorläufer von **23** sein. Die Ergebnisse der durchgeführten Fütterungsexperimente können diese Hypothese nicht unterstützen. Jedoch lässt sich vermuten, dass die zugefütterten Vorläufer **39** und **42** nicht ausreichend membranpermeabel sind und die entsprechenden Zellorte der Biosynthese nicht erreicht werden konnten. Es konnte jedoch sichergestellt werden, dass die gefütterten Substanzen von dem Stamm Tü 6077 toleriert wurden und auf Grund der beobachteten Produktion von **23** der Biosynthese-Apparat von Spirodionsäure (**23**) nicht ausgeschaltet wurde.

4.5 Diskussion und Ausblick

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse der biosynthetischen Arbeiten an dem Sekundärmetaboliten Spirodionsäure (**23**) zu einer schlüssigen und für Bakterien einzigartigen Biosynthesehypothese geführt haben.[64] Aus den Fütterungsexperimenten kann eine Diels-Alder-Typ Reaktion durch die Auswertung der erhaltenen Metabolitenmuster für die Biosynthese von **23** abgeleitet werden (siehe Abbildung 36 undAbbildung 37).

In der vorgeschlagenen Biosynthesehypothese findet die Diels-Alder-Typ Reaktion zwischen **29** und Sarkomycin (**31**) unter Decarboxylierung von C-2 des 2*H*-Pyrons **29** statt. Das Einbaumuster des Fütterungsexperiments mit [1-^{13}C]Propionat führt im 2*H*-Pyron (**29**) zu einer signifikanten Anreicherung dreier Kohlenstoffatome (C-2, C-4 und C-6). Spirodionsäure (**23**), das Produkt der Diels-Alder-Reaktion zeigt nur an zwei C-Atomen (C-6 und C-8) im Cyclohexenonring Anreicherungen aus dem Fütterungsexperiment mit [1-^{13}C]Propinat (siehe Abbildung 51). Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass **29** oder seine offenkettige Form der Vorläufer von Spirodionsäure (**23**) ist.[64]

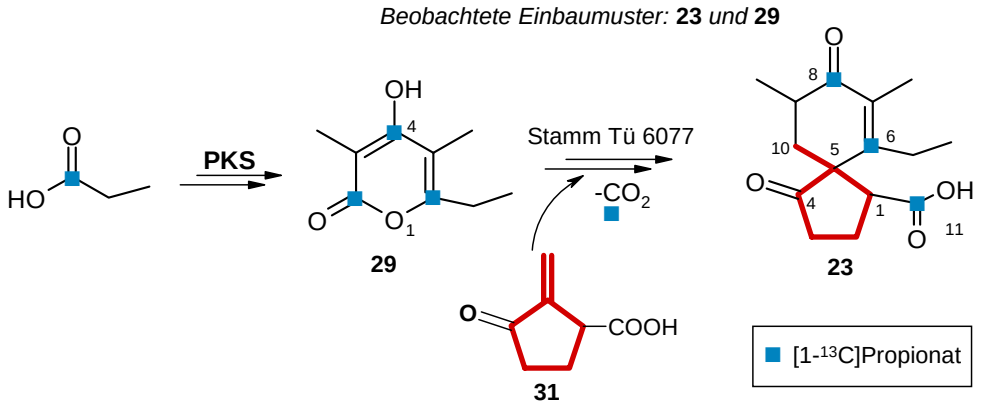


Abbildung 51: Experimentelle Hinweise aus dem Fütterungsexperiment mit [1-^{13}C]Propionat.

Der metabolische Ursprung des α-Ketoglutarates als Baustein der hier untersuchten Naturstoffe spiegelt sich in den fünfgliedrigen Ringen von Spirodionsäure (**23**) und Dihydrosarkomycin (**30**) wider. α-Ketoglutarat wird im Citratcyclus gebildet. Dieser wird durch zwei unterschiedliche metabolische Pfade gespeist, zum einen durch eine anaplerotische Reaktion von Pyruvat mit Biotion-CO_2, die zu Oxalacetat führt, zum anderen durch Acetyl-CoA. Der Citratcyclus wird hierbei im stärkeren Maße von Acetyl-CoA versorgt und genau dieses Verhältnis von 3:2 zeigt sich in der ^{13}C-Anreicherung in α-Ketoglutarat bzw. in den resultierenden Einbaumustern in **23** und **30** wider (siehe Abbildung 52).[64]

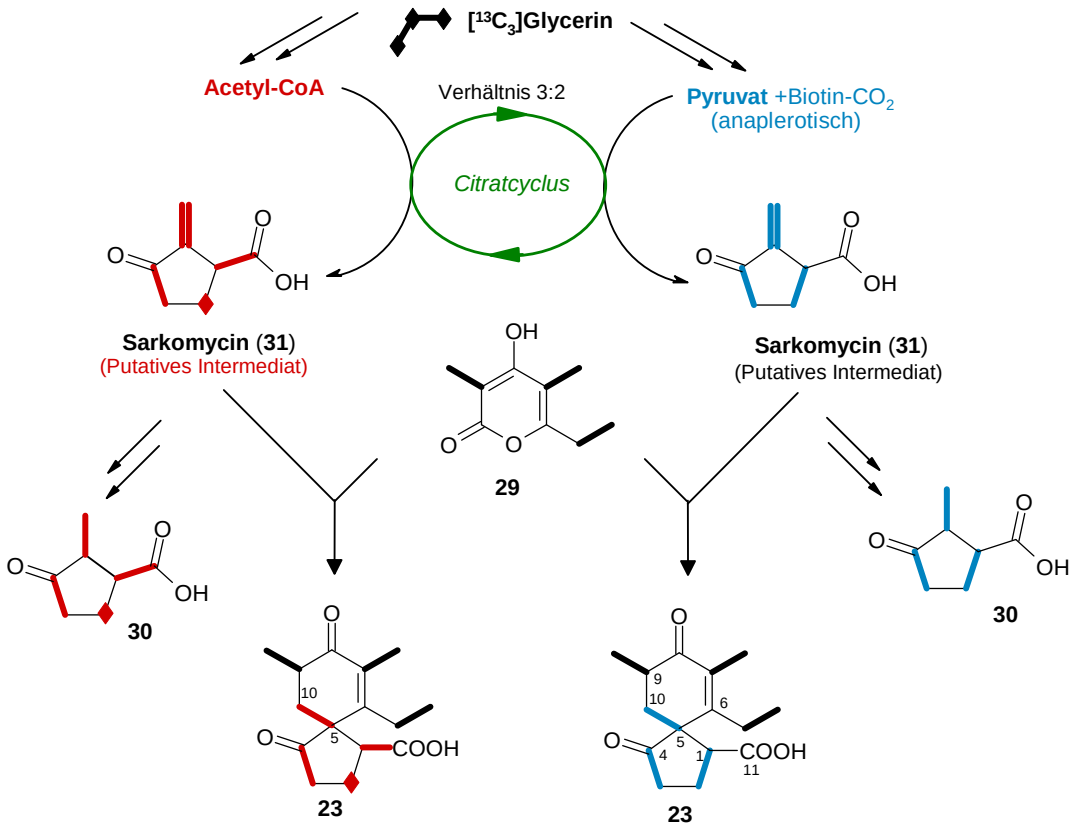


Abbildung 52: Graphischer Überblick der verschiedenen metabolischen Pfade, die zur Biosynthese von Spirodionsäure (23) führen.

Betrachtet man die Einbaumuster aus der Zufütterung mit [U-$^{13}C_3$]Glycerin, so zeigt sich, dass die intensive Anreicherung der C-Atome C-5/C-10 in **23** den Einbau einer intakten C_2-Einheit darstellen. Diese Einheit stammt aus der reaktiven, exocyclischen Doppelbindung in Sarkomycin (**31**). Das wird durch die intakte C_2-Einheit in der Methylgruppe von Dihydrosarkomycin widergespiegelt.

Jedoch führten die Fütterungsexperimente mit ^{13}C-markiertem Acetat zu keiner signifikanten Anreicherung der C_2-Einheit C-5/C-10 in Spirodionsäure (**23**), obwohl ein eindeutiger Einbau in das Kohlenstoffatom C-5 durch das Fütterungsexperiment mit [2-^{13}C]Malonsäure beobachtet werden konnte. Der Vorläufer der reaktiven, exocyclischen Doppelbindung in **31** bzw. der Methylgruppe in **30** stammen offensichtlich Biosynthesequellen, die zum Zeitpunkt der ^{13}C-Acetatfütterung nicht aus dem Acetat-Pool gespeist werden und daher nicht mit Isotopen markiert werden. Daher konnte der direkte Vorläufer noch nicht eindeutig identifiziert werden.[64] Ebenso konnte aus den Rohextrakten der im Rahmen der Diplomarbeit durchgeführten Fütterungsexperimente mit ^{13}C-markiertem Acetat bisher kein Dihydrosarkomycin (**30**) isoliert werden.

Ein weiteres Argument, welches die Hypothese einer Diels-Alder-Typ-Reaktion unterstützt, liegt in der relativen Stereokonfiguration der Kohlenstoffatome C-1 und C-5 von **23** (Details zur absoluten Stereokonfiguration von **23** sind Kapitel 5 zu entnehmen) und in der absoluten Konfiguration von C-1. Vergleicht man nämlich die absolute Stereokonfiguration der Säurefunktion an C-1 mit der entsprechenden Konfiguration der Säurefunktion in Dihydrosarkomycin (**30**), so erkennt man, dass es sich um dieselbe Konfiguration handelt.[64]

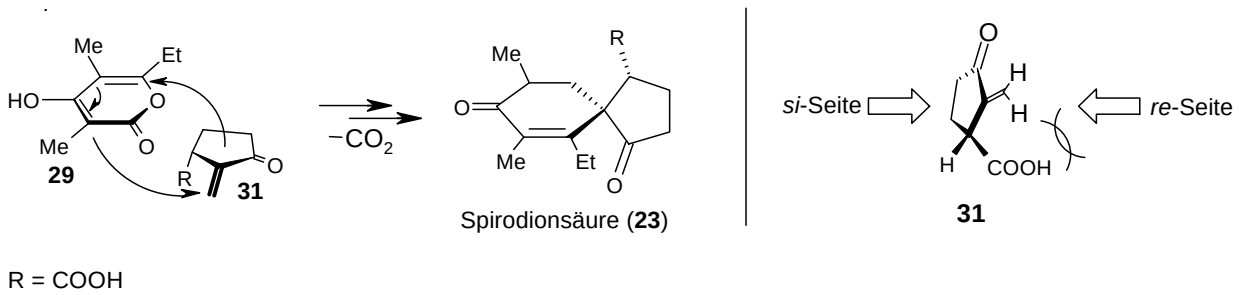


Abbildung 53: **Ausschnitt des hypothetische Biosynthesewegs einer intermolekularen Diels-Alder Reaktion für die Bildung von Spirodionsäure (23).**

Die relative Stereokonfiguration von C-1 und C-5 in **23** stehen im Einklang mit der postulierten Diels-Alder-Typ Biosynthesehypothese (siehe Abbildung 53). Hierbei entsteht das Diels-Alder-Addukt durch einen Angriff des Diens (**29**) auf der der Säurefunktion abgewandten Seite des Dienophils (**31**). Das heißt, dass die Reaktion auf der *si*-Seite der exocyclischen Doppelbindung von **31** stattfindet. Ebenso unterstützt die Orientierung des Dien-Systems, welches sich entgegengesetzt zur Carbonylfunktion in **31** anordnet, die Theorie einer Diels-Alder Reaktion für **23**.[64]

Die aufgestellte Biosynthesehypothese kann nicht die Möglichkeit einer doppelten ionischen Michael-Addition ausschließen (siehe Abbildung 39 in Kap. 4.3.1), d. h. nicht-streng konzertiert wie eine klassische Diels-Alder-Reaktion, sondern mit polarisierten, ionischen Substraten. Mit dieser Fragestellung diskutiert man gleichzeitig wie „tatsächlich konzertiert“ Diels-Alder-Reaktionen in der Synthese sind. Womöglich sind Diels-Alder-Reaktionen mit ihren aktivierten polaren Eddukten (z. B. „Danishefsky-Diene“) auch nicht streng konzertiert. Außerdem sind die Bildung eines einzigen Stereoisomers von **23**, physiologische Bedingungen und die Reaktivität der exoständigen Doppelbindung in **31** gute Argumente für die Annahme einer enzymatischen Reaktion.[64] Eine nicht-enzymatische Diels-Alder-Typ Reaktion gilt damit als äußerst unwahrscheinlich.

Um die vorgestellte Biosynthesehypothese von **23** näher zu analysieren und durch weitere Daten abzusichern, wurde der Ansatz der Vorläufer-dirigierten Biosynthese ausgewählt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde bisher die Variation des Vorläufers der Cyclohexenoneinheit in **23** verfolgt. Hierbei wurden Fütterungsexperimente mit 4-Hydroxy-6-methyl-2*H*-pyron (**39**), ein Derivat des putativen Vorläufers **29** und 2-Methyl-3,5-dioxoheptansäure (**41**) durchgeführt. Die Produktion der gewünschten Spirodionsäure-Derivate **40** und **43** konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise produzierte Tü 6077 im Rahmen dieser Fütterungsexperimente den Sekundärmetaboliten **23**, ein Hinweis dafür, dass die Zusätze vom Produzenten toleriert wurden. Eventuell konnten die zugesetzten potentiellen Vorläufer wegen mangelnder Permeabilität nicht aufgenommen werden.

Um sicher zu stellen, dass eine Penetration der Zellwand erfolgen kann, sollten zukünftig entsprechende *N*-Acetylcysteamin-thioester (SNAC-Ester) synthetisiert und in weiteren Fütterungsexperimenten getestet werden. Durch die Veresterung der entsprechenden Säure wird nämlich einerseits die Lipophilie der Verbindung gesteigert, ohne dass die Löslichkeit in wässrigen Nährmedien oder Puffersystemen zu stark herabgesetzt wird. Daraus resultiert eine Steigerung der Penetrationsrate durch die Zellmembran, die bei den entsprechenden freien Säuren oft durch ihre Hydrophilie nicht gegeben ist.

Das Konzept einer Diels-Alder Cycloadditon in der Natur ist bekannt, und ein aktuelles Forschungsgebiet.[18-26] Bis heute sind nur drei isolierte Enzyme aus pilzlichen Produzenten bekannt, die als natürliche Diels-Alderasen an der Biosynthese von Lovastatin (**7**),[18] Solanapyron A (**11**)[19] und Makrophomsäure (**19**) beteiligt sind. Besonders die putative intermolekulare Diels-Alder Reaktion (Abbildung 55; Pfad A) zur Ausbildung von **19** weist starke Parallelen zur postulierten Biosynthese von **23** auf.[64]

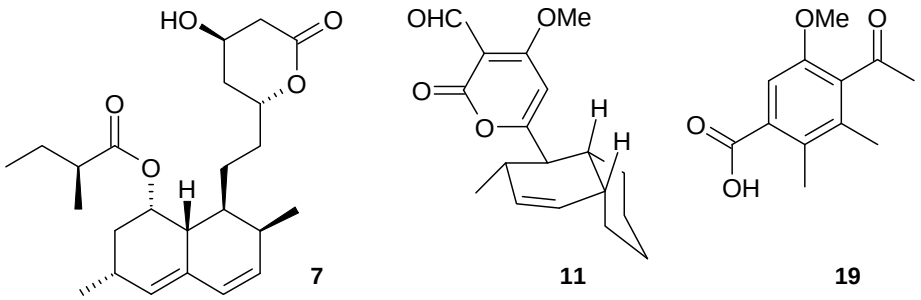


Abbildung 54: Bekannte pilzliche Sekundärmetaboliten, an deren Biosynthese eine Diels-Alder Reaktion beteiligt ist.

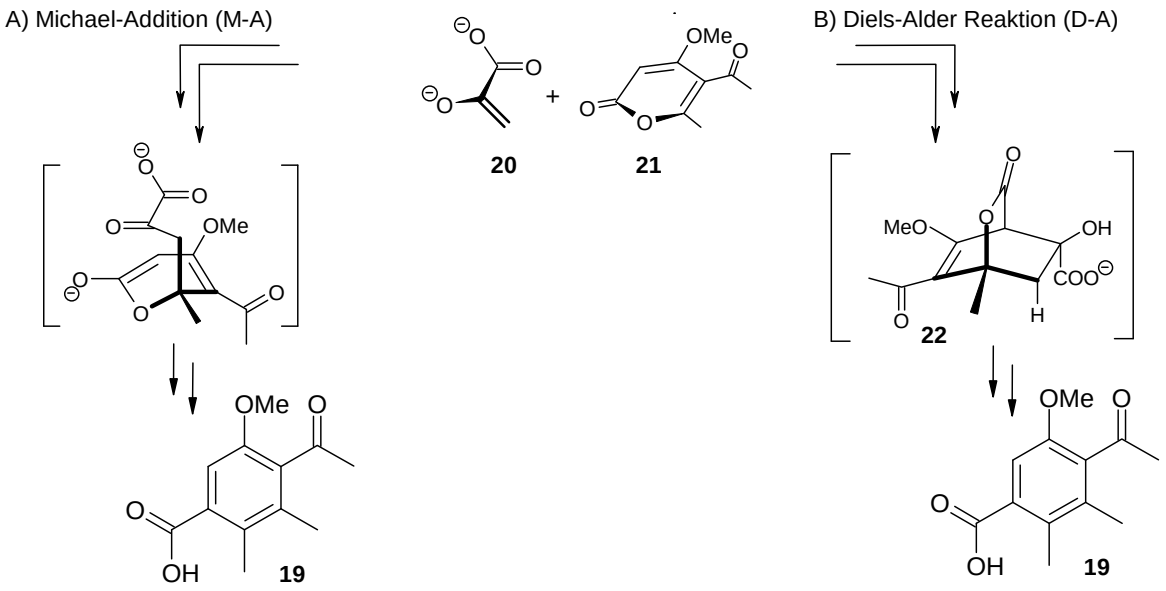


Abbildung 55: Hypothetische Biosynthesewege für Makrophomsäure (19): A) Tandem Michael-Aldol Reaktion (M-A) abgeleitet aus quantenmechanischen und molekular mechanistischen Simulationen (QM/MM).[44] B) Inverse Diels-Alder-Reaktion (D-A) abgeleitet aus Röntgenkristallstruktur-Anlaysen von Makrophomsäure (19).[18, 19, 26]

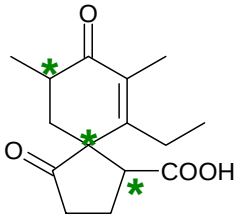
Untersuchungen an zellfreien Systemen und Kristallstrukturanalysen lieferten einige Argumente für die Aktivität einer Diels-Alderase bei der Biosynthese von Makrophomsäure (**19**). Im Gegensatz dazu zeigten die theoretischen Rechnungen an derselben Kristallstruktur der Makrophomat-Synthase, dass auf Grund eines wesentlich stabileren Übergangszustandes eine Tandem Michael-Aldol-Reaktion im Gegensatz zu einer konzertierten [4+2]Cycloaddition wahrscheinlicher ist. Bisher kann man immer noch nicht abschließend eine der beiden Möglichkeiten beweisen, obwohl die Kristallstruktur des Enzyms mit Substrat vorliegt und quantenchemische Analysen existieren.[21, 22, 44]

Zukünftige Arbeiten bezüglich der Biosynthese von **23** sollten einerseits den Ansatz der Vorläufer-dirigierten Biosynthese weiterverfolgen. Vor allem sollten auch genetische Arbeiten das Auffinden und Charakterisieren des Biosynthese-Genclusters mit den für die Biosynthese von **23** verantwortlichen Genen durchgeführt werden. Die äußerst ungewöhnliche und bisher einzige bakterielle Diels-Alder-artige Biosynthese am Beispiel der Spirodionsäure (**23**) soll somit zukünftig weiterverfolgt werden. Ihre detaillierte Aufklärung stellt ein lohnenswertes Ziel beim Lernen und Entdecken von Mechanismen in der Natur dar.

5 Die absolute Konfiguration der Spirodionsäure (23)

5.1 Derivatisierungen der Spirodionsäure (23)

Der aus dem Produzenten Tü 6077 isolierte Sekundärmetabolit Spirodionsäure (**23**) beinhaltet drei Stereozentren, deren absolute Konfiguration bisher nicht bestimmt werden konnte.[49] Somit wurden neben biosynthetischen Untersuchungen auch semisynthetische Arbeiten durchgeführt, um kristalline Derivate von **23** für eine Konfigurationsaufklärung mittels Röntgen-Strukturanalyse zu gewinnen.



23

Abbildung 56: Der Sekundärmetabolit Spirodionsäure (23) mit bisher unbekannten Stereozentren.

Dazu wurden in eigenen Vorarbeiten zunächst das *p*-Bromphenoxy- (**45**) und das *o*-Bromphenoxy-Derivat (**46**) (3 mg, **45** und 9 mg, **46**) dargestellt. Außerdem gelang mittels Umsetzung mit Diazomethan die Herstellung des Methylesters (**47**) von Spirodionsäure (2.4 mg, **47**). Alle Produkte wurden säulenchromatographisch und über semipräparative HPLC-Chromatographie zur Reinsubstanz gereinigt, dennoch gelang es bisher nicht, diese zur Kristallisation zu bringen.[50]

Derivate aus Vorarbeiten:

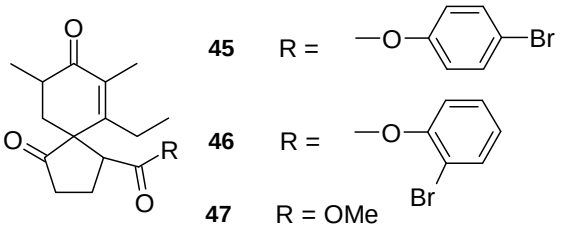


Abbildung 57: Spirodionsäure-Derivate (45, 46 und 47).[50]

Im Weiteren wurde die Herstellung eines Hydrazons versucht, allerdings erwies sich dieser Ansatz als eine ungeeignete Methode, da das ^{1}H-NMR-Spektrum des Rohprodukts ein Multikomponentengemisch anzeigte. Auch bei dem Versuch, Spirodionsäure (**23**) mit (−)-Brucin in ein Salz zu überführen, konnte kein kristallines Produkt erhalten werden.

Darstellung von 6-Ethyl-7,9-dimethyl-4,8-dioxo-spiro[4.5]deca-6-en-1-carbonsäure-*p*-bromophenacylester (49):

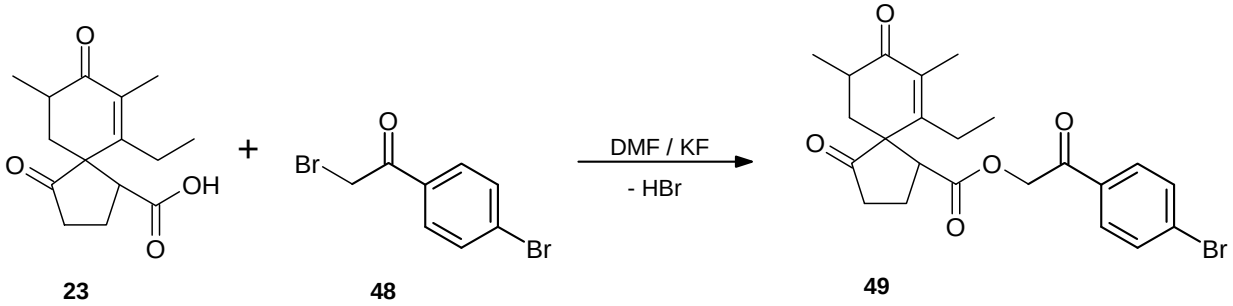


Abbildung 58: Darstellung von 49.

Die Veresterung von Spirodionsäure (**23**) mit Bromphenacylbromid (**48**) in einer Suspension von DMF und KF über 1.5 h mit anschließender Aufarbeitung und Isolierung ergab **49** in einer Ausbeute von 40%. DCI-MS-Messung (*m/z* 478 $[M+NH_4]^+$, 940 $[2M+NH_4]^+$) und ^{1}H-NMR-Messung bestätigten die Struktur des *p*-Bromphenacylesters (**49**).

Es wurden verschiedene Kristallisationstechniken wie langsame Verdampfung, langsames Abkühlen und Überschichtungen mit verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt.[111] Allerdings wurde auch in diesem Fall keine Kristallisation erreicht.

5.2 Native und synthetische Spirodionsäure (23, 50) und ihre Derivate (51a, 51b)

Im Rahmen der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von P. VON ZEZSCHWITZ, wurde von J. SIEWERT die Totalsynthese von racemischer Spirodionsäure (**50**) etabliert.[112, 113] Diese ermöglichte es, chemisch-analytische Vergleiche von nativer (**23**) und synthetischer Spirodionsäure (**50**) durchzuführen. Hierbei erfolgte zuerst eine NMR-spektroskopische

Tandem-Messung, bei der die Proben unter gleichen Bedingungen (Pyridin-d_5, 35 °C, 150.8 MHz, 11.5 h, Probenmenge ca. 1 mg) analysiert wurden (siehe Tabelle 4). Das nachfolgende Mischungsexperiment (Pyridin-d_5, 35 °C, 150.8 MHz, 11.5 h, Verhältnis **23**:**50** 1:4) ergab einen einfachen Signalsatz.

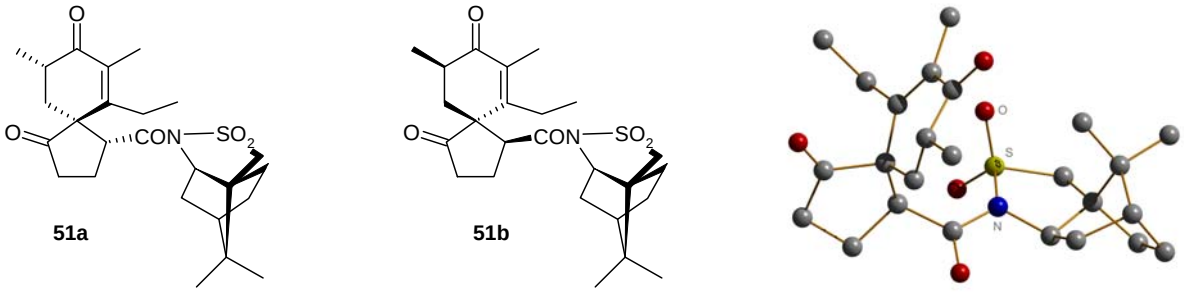
Ein Vergleich der NMR-spektroskopischen Daten der synthetischen Verbindung (**50**) mit denen des isolierten Naturstoffs (**23**) ermöglichte somit die eindeutige Bestätigung der Konstitution und relativen Konfiguration der Struktur von **23**; die äußerst geringen Abweichungen der chemischen Verschiebung bei den getrennten NMR-Experimenten können auf Konzentrationseffekte zurückgeführt werden.

C-Atom	23 δ_C [ppm]	50 δ_C [ppm]	Abweichung in %
1	49.03	48.67	**0.74**
2	23.33	23.16	**0.73**
3	37.82	37.73	0.24
4	218.48	218.19	0.13
5	59.83	59.82	0.02
6	155.86	155.64	0.14
7	135.80	135.80	0.00
8	200.11	199.95	0.08
9	36.13	36.11	0.06
10	34.48	34.40	0.23
11	175.83	175.40	0.24
12	26.35	26.33	0.08
13	12.92	12.92	0.00
14	12.30	12.31	0.08
15	15.95	15.93	0.13

Tabelle 4: Gegenüberstellung der aufgenommenen ^{13}C-NMR-Daten der Tandem-Messung (Pyridin-d_5, 35 °C, 150.8 MHz, 10 h, Probenmenge ca. 1 mg) von nativer Spirodionsäure (23) gegenüber der synthetisch hergestellten (50).

J. SIEWERT gelang es im Weiteren, die synthetisierte, racemische Spirodionsäure (**50**) unter Verwendung des von OPPOLZER et al. etablierten Verfahrens, in ein Camphersultamamid zu überführen.[114] Hierzu erfolgte die Umsetzung des racemischen Gemisches von **50** über eine Transformation in das racemische Säurechlorid und anschließende Substitution mit dem

Natriumsalz des Oppolzer-Auxiliars zum Gemisch der diasteromeren Sultamamide (**51a** und **b**) (Verhältnis 50:50) in einer Ausbeute von 67%.[112, 113]

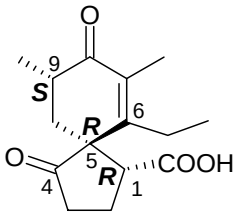


(ölig) *(kristallin)*

Abbildung 59: Die Camphersultamamide (51a und 51b) im Vergleich; aus Röntgenstrukturanalyse entwickelte räumliche Struktur von 51b.

Auf Grund des einerseit öligen und andererseits kristallinen Vorkommens der beiden Diastereomere **51a**, **51b** konnten diese vorgetrennt werden. Die Diastereomerenreinheit des kristallinen und des in öliger Form verbliebenen Produkts (**51a** und **51b**) wurde durch NMR-spektroskopische Analyse nachgewiesen. Durch langsame Umkristallisation aus einer Chloroformlösung konnte J. SIEWERT geeignete Kristalle von **51b** für eine Röntgenstrukturanalyse erhalten. Die Analyse erfolgte im Arbeitskreis von J. MAGULL und zeigte, dass **51b** die 1*S*,5*S*,9*R*-Konfiguration aufwies.

Die Überführung des Naturstoffs **23** in sein entsprechendes Camphersultamamid zeigte, dass es mit dem öligen Diastereomer **51a** identisch ist. Dies wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit mittels NMR- und HPLC-Analytik ermittelt. Dazu wurden Mischungen aus dem Camphersultamamid nativen Ursprungs („**nativ-51a**“) mit den synthetischen Verbindungen „**synth-51a**“ und „**synth-51b**“ NMR-spektroskopisch ($CDCl_3$, 150.8 MHz, 11.5 h, Verhältnis **nativ-51a**/**synth-51b** 1:5; **nativ-51a**/**synth-51b** 1:5)[112] untersucht. Die NMR-Spektren der Mischung mit **nativ-51a** und **synth-51a** zeigten einen einfachen Signalsatz, wohingegen bei der Mischung **nativ-51a** und **synth-51b** eine Verdopplung auftrat. Außerdem wurden die Verbindungen chromatographisch charakterisiert, und zwar nutzte man für die Diastereomere ungewöhnlicherweise eine chirale Säule vom Typ Daicel Chiralpak IB. Die herkömmlichen HPLC-Kieselgelsäulen führten nicht zu einer optimalen Auftrennung der Diastereomere. In der HPLC-Analytik (Daicel Chiralpak IB-Säule, Hexan/Isopropanol Laufmittelsystem: Isopropanol (A) / *n*-Hexan (B), Gradient: 30 min bei 95% B, in 20 min auf 100% B, Flussrate: 0.8 mL/min, Verhältnis **nativ-51a**/**synth-51b** 1:5) hatten das Camphersultam nativen Ursprungs und synthetisches **51a** gleiche Retentionszeiten, **synth-51b** hingegen nicht (siehe Abbildung 61).



23

Abbildung 60: Native Spirodionsäure (23) in der absoluter 1*R*,5*R*,9*S*-Konfiguration.

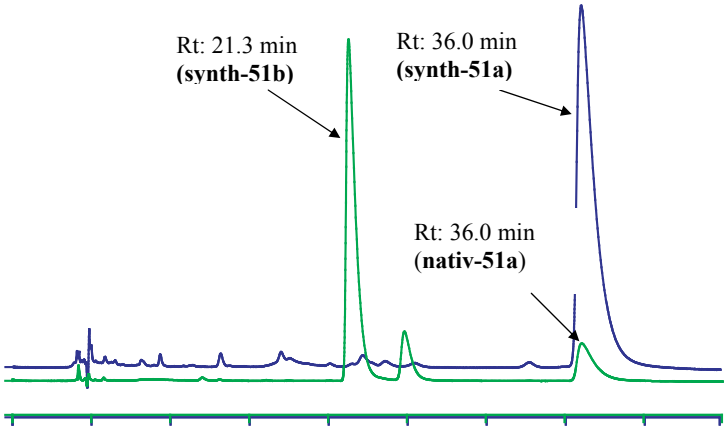


Abbildung 61: Überlagerung zweier HPLC-Chromatogramme der Camphersultamamide (51a und 51b). HPLC-Chromatogramm (grün): Mischung von synth-51b mit nativem Camphersultamamid (nativ-51a), Verhältnis nativ-51a/synth-51b 1:5. HPLC-Chromatogramm (blau): Camphersultamamid synth-51a.

Somit wurde die natürliche Spirodionsäure (**23**) als (1*R*,5*R*,9*S*)-6-Ethyl-7,9-dimethyl-4,8-dioxospiro[4.5]deca-6-en-1-carbonsäure bestimmt.[64, 112, 113] Beachtenswert ist hierbei, dass nur das nicht-natürliche Enantiomer der Spirodionsäure (**23**) einen kristallinen Zustand aufwies, während das Camphersultam des Naturstoffs öligen Charakter zeigte. Allein vom Naturstoff ausgehend, hätte also auch die Camphersultam-Strategie nicht zum Erfolg geführt. Nur die gemeinsamen Anregungen von Synthese und Naturstoffisolierung führten hier schließlich zur Zuordnung der absoluten Konfiguration des neuartigen und ungewöhnlichen Naturstoffes Spirodionsäure (**23**).

6 Der Kirromycin-Produzent *Streptomyces collinus* Tü 365 und ausgewählte Mutanten

6.1 Die Elfamycine

Bei den Angehörigen dieser Gruppe handelt es sich um Naturstoffe, die ein einheitliches Grundgerüst aufweisen, das als wichtige Strukturelemente drei intramolekulare Ringsysteme, einen Pyridonring, ein Tetrahydrofuran-System und eine hochsubstituierte Tetrahydropyraneinheit (Goldinonsäure) beinhaltet. Diese Ringe sind über zwei Systeme von konjugierten Doppelbindungen miteinander verbunden. In den folgenden Ausführungen wird aus Gründen der Übersichtlichkeit, die von BARBER et al. etablierte Nummerierung von Kirromycin (**24**)[115] auf die anderen Vertreter der Elfamycine übertragen.

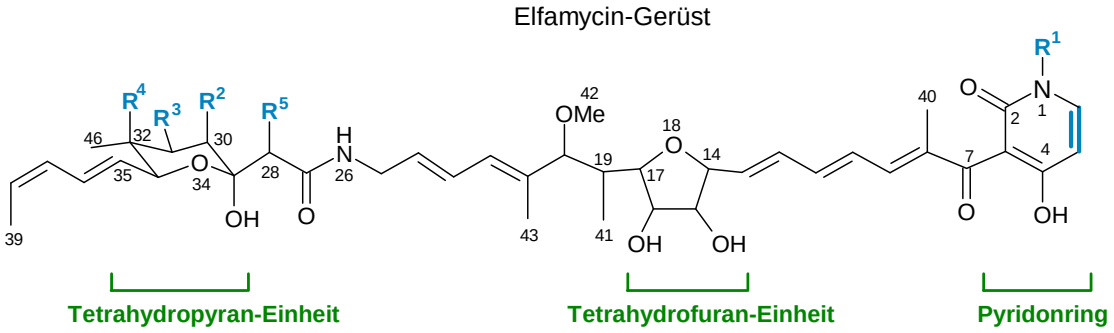


Abbildung 62: Grundgerüst der Elfamycine (Substituenten R^1 bis R^5 siehe Tabelle 5: Elfamycine mit unterschiedlichen Substitutionsmuster, aber gleichen Grundgerüst.

).

Elfamycine sind Inhibitoren des Elongationsfaktor Tu, und damit ist ihre Bioaktivität namensgebend.[116] Kirromycin (**24**), welches auch in der Literatur unter dem Namen Mocimycin zu finden ist, wurde unabhängig aus verschiedenen Produzenten – *Streptomyces collinus* und *S. ramocissimum* – isoliert.[117, 118] ZÄHNER et al. erkannten 1972 seine biologische Wirkung als Inhibitor der Proteinbiosynthese.[119] Aurodox (**53**), welches von BERGER et al. aus *Streptomyces goldiniensis* isoliert wurde, konnte als erster Vertreter dieser Klasse vollständig in seiner Struktur aufgeklärt werden.[120-122]

In Tabelle 5 ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Vertreter der Elfamycine zu finden, die sich allein in ihrem Substitutionsmuster von Kirromycin (**24**) unterscheiden. Die Strukturdiversität wird in Form von Variationen der Substituenten an N-1 des Pyridonringes, der Kohlenstoffatome C-30, C-31 und C-32 der Goldinonsäureeinheit, sowie unterschiedliche Formen von Aklylierungen an C-28 beobachtet. Efrotomycin (**55**) ist beispielsweise ein glykosidisches Elfamycin bestehend aus einem Disaccharid (α-D-Mannopyranose und β-L-Allopyranose) und Aurodox (**53**) als Aglykon.[123, 124]

Name	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5
Kirromycin **(24)**	H	OH	OH	CH_3	C_2H_5
5,6-Dihydrokirromycin **(52)**[125]	H	OH	OH	CH_3	C_2H_5
Aurodox **(53)**	CH_3	OH	OH	CH_3	C_2H_5
Heneicomycin **(54)**[126, 127]	CH_3	H	OH	CH_3	C_2H_5
Efrotomycin **(55)**	CH_3	OH	Disaccharid	CH_3	C_2H_5
SB 22484 **(56)**[128, 129]	H	H	OH	CH_3	CH_3
	H	H	OH	CH_3	C_2H_5

Tabelle 5: Elfamycine mit unterschiedlichen Substitutionsmuster, aber gleichen Grundgerüst.

Factumycin (**57**) weist keine Tetrahydrofuran-Einheit auf und zeigt im Vergleich zu den anderen Elfamycinen eine 14*Z*-Doppelbindung in der Polyenkette. [130] Kirrothricin A (**58**) ist sein entsprechendes 5,6-Dihydroderivat, welches eine 14*E*-Doppelbindung trägt.[116, 131, 132]
Das Antibiotikum UK 69753 (**59**), das 1989 von JEFSON et al. isoliert wurde, ist ebenfalls ein Glykosid. Seine Aglykon-Einheit zeigt die Struktur von Factumycin (**57**) und sein Disaccharid unterscheidet sich von der Glykosideinheit aus Efrotomycin (**55**) um die Substitution von C-4'', an dem Efrotomycin (**55**) eine Methoxy- und UK 69753 (**59**) eine Hydroxyfunktion trägt.[133, 134]

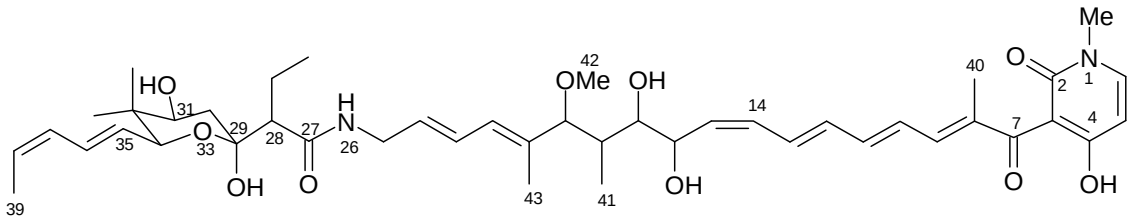


Abbildung 63: Factumycin (57), ein Elfamycin ohne Tetrahydrofuraneinheit.

Bei manchen Vertretern dieser Gruppe fehlt auch die Pyridoneinheit, wie z.B. bei Ganefromycin (**60**)[135, 136] oder dem Phenelfamycin (**61**).[137, 138]

6.2 Kirromycin (24) aus *S. collinus* Tü 365

Innerhalb des BMBF-Projektes „MetabolitGenomik-*Actinomycetes*“ sollte im Rahmen dieser Arbeit ein weiterführender Beweis für die Biosynthese des Pyridonringes erbracht werden. Von der Arbeitsgruppe T. WEBER/W. WOHLLEBEN wurde der Produzentenstamm Tü 365 zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung des Naturstoffes Kirromycin (**24**) wurden von der Arbeitsgruppe H. ZÄHNER und anderen Forschungsgruppen verschiedene Protokolle für die Kultivierung und Aufarbeitung von Kirromycin (**24**) aus Tü 365 entwickelt, die im Folgenden kurz dargestellt werden.

6.2.1 Stammhaltung und Kultivierung von Tü 365

Stammhaltung: Der Stamm *S. collinus* Tü 365 wurde von ZÄHNER et al. aus einer bei Kuroussa (Guinea) am Nigerufer gesammelten Erdprobe isoliert und taxonomisch bestimmt.[118] Die Stammhaltung erfolgte auf SM-Agarplatten (Soja/Mannit), die für fünf Tage bei 28 °C inkubiert wurden.

Kultivierung: Für die Vorkulturen wurden 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen mit 150 mL KP-Medium beschickt und autoklaviert. Nach Sterilisation wurde jeder Kolben mit einem 1 cm^2 großen Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C, 180 rpm für 48 h.

Hauptkulturen in Schüttelkolben: 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen wurden mit 150 mL KP-Medium befüllt, autoklaviert und mit 7.5 mL Vorkulturlösung inokuliert. Die Inkubation fand bei 30° C, 180 rpm für 72 h statt.

Hauptkultur in Schüttelkolben mit XAD-Zusatz: GASTALDO et al. zeigten, dass bei Fermentationen unter Zusatz eines bromierten Polystyrenharzes (SP-205) die Produktion von Kirromycin (**24**) auf ca. 1000 mg/L erhöht werden kann. Diesen ausbeutesteigernden Effekt der Harz-Zugabe führten sie darauf zurück, dass durch die kontinuierliche Adsorption von

Kirromycin (**24**) an SP-205 während der Kultivierung die minimale Hemmkonzentration gegenüber dem Produzentenstamm selbst nicht überschritten wurde.[139]
In Anlehnung an diese Ergebnisse erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Variation der Kultivierungsbedingungen. 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, die mit 150 mL KP-Medium befüllt waren, wurden nach Sterilisation mit 7.5 mL einer 48 h alten Vorkultur beimpft. Nach 12 Stunden Inkubation wurden jedem Kolben ca. 2-4 g XAD-16 (feucht) unter sterilen Bedingungen hinzugefügt. Die Fermentation der Hauptkultur erfolgte für 72 h bei 30 °C und 180 rpm auf einem Rundschüttler.

Hauptkultur im Fermenter: Für die geplanten Biogenesestudien (siehe Kapitel 6.4) wurden Probefermentationen im Biostat-B Fermenter durchgeführt, damit sichergestellt werden konnte, dass der Stamm Tü 365 unter diesen Bedingungen ausreichend Kirromycin (**24**) produziert. Das Fermentationsgefäß wurde mit 900 mL KP-Medium beschickt, autoklaviert und mit 150 mL Vorkulturlösung inokuliert. Die Inkubation fand für 72 h bei 30 C, 400 rpm und einer Luftzufuhr von 4 vvm statt, wobei keine pH-Regulation verwendet wurde.

6.2.2 Aufarbeitung und Isolierung von Kirromycin (24)

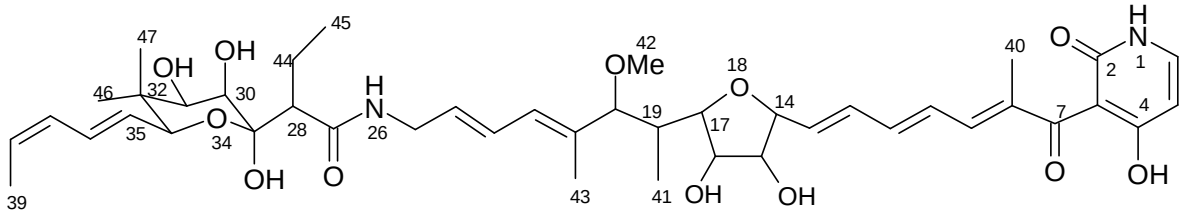
Aufarbeitung: Fermenter und Schüttelkulturen wurden gleichartig aufgearbeitet. Die Kulturbrühe wurde mit 0.5 bzw. 1 M HCl auf pH = 5 eingestellt und unter Celite-Zusatz filtriert. Das Mycel wurde verworfen, da es nach DC-Kontrolle nur Spuren von Kirromycin (**24**) enthielt. Das Kulturfiltrat wurde mit Ethylacetat extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Aufarbeitung von Kultivierungen mit XAD-Zusatz: Nachdem der pH-Wert der Kulturbrühe auf pH = 5 eingestellt wurde, filtrierte man über Celite. Das Kulturfiltrat wurde mit Ethylacetat extrahiert, beinhaltete kein Kirromycin (**24**) und konnte somit verworfen werden. Die Mycel/XAD-Mischung wurde zweimal mit Methanol für 30 min unter Rühren eluiert und die organische Phase im Vakuum von dem Lösungsmittel befreit.

Isolierung: Bei der Isolierung wurde im Rahmen dieser Arbeit das von M. BRÜNNING für die schonende Isolierung von **24** entwickelte Verfahren weiterverfolgt.[140] Dabei wurde das erhaltene Rohprodukt in wenig Ethylacetat aufgenommen und mit Petrolether umgefällt. Nach dem Abdekantieren wurde der Niederschlag im Vakuum getrocknet und an Sephadex LH-20 (Methanol) gelchromatographisch getrennt. Die Kirromycin (**24**) enthaltende Fraktion

wurde an Kieselgel ($CHCl_3$/MeOH/25%ige NH_3 8:2:0.5) chromatographiert, wodurch man 6-7 mg/L Kirromycin (**24**) als blassgelbes Pulver erhielt.

6.2.3 Charakterisierung von Kirromycin (24)



(**24**)

Der blassgelbe Feststoff löscht UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 366 nm und zeigt mit dem Anfärbereagenz Anisaldeyd/H_2SO_4 nach Erwärmung eine blaue Farbe. Der Metabolit ist sowohl in Methanol als auch DMSO gut löslich, lässt sich aber mit Aceton nur schlecht in Lösung bringen. Das ESI-Massenspektrum von **24** zeigt im positiven Modus Massenpeaks bei *m/z* = 797 $[M+H]^+$ und 819 $[M+Na]^+$. Im negativen Modus sind die Massenpeaks bei *m/z* = 795 $[M-H]^-$ und 1591 $[2M-H]^-$ gut zu detektieren. Die ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR-Daten stimmen mit den Literaturdaten gut überein und werden daher nicht weiter erörtert.[115, 140]

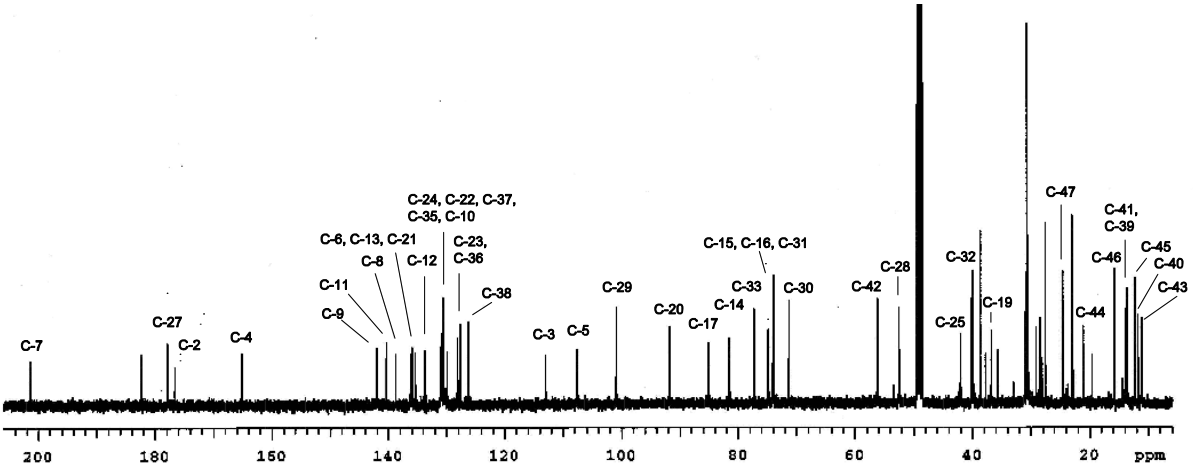


Abbildung 64: ^{13}C-NMR-Spektrum von Kirromycin (24); 150 MHz, CD_3OD.

6.3 Bioaktivität von Kirromycin (24)

Die Gruppe der Elfamycin-Antibiotika weist sich durch ihren nutritiven Effekt aus, der bei Kirrothricin A (**58**) und Dihydrokirromycin (**52**) hingegen fehlt.[125] Auf Grund dieser Tatsache wurden diese Elfamycine in der Landwirtschaft zur effizienteren Tierhaltung verwendet. Interessanterweise zeichnen sich Aurodox (**53**) und Efrotomycin (**55**) durch eine sehr geringe Toxizität aus. Der LD_{50}-Wert für Mäuse beträgt über 4000 mg/kg bei oraler Gabe und über 1000 mg/kg bei intraperitonaler Verabreichung.[141, 142]

Kirromycin (**24**) ist ein Engspektrum-Antibiotikum, das nur auf einige Gram-positive und Gram-negative Bakterien, insbesondere aber Clostridien wachstumshemmend wirkt. Ebenso inhibiert Kirromycin (**24**) das Wachstum von Blutkulturen des Malariaparasiten *Plasmodium falciparum*.[143] Die antibiotische Wirkung der Elfamycine beruht auf der Hemmung der Proteinbiosynthese von Prokaryonten. Um die genaue Wirkungsweise zu erklären, wird im Folgenden die Proteinbiosynthese kurz erörtert.

Bakterielle Proteinbiosynthese

Bei der Proteinbiosynthese wird das Präprotein durch fortlaufendes Anfügen von Aminosäuren vom Amino- in Richtung Carboxylende an die Carboxylgruppe der sich entwickelnden Peptidkette aufgebaut. Bei diesem Prozess sind Aminoacyl-tRNAs die aktivierten Vorstufen, deren Bildung durch die jeweils spezifischen Aminoacyl-tRNA-Synthasen katalysiert wird. Die Ribosomen sind der Ort der Proteinbiosynthese. Sie verfügen über zwei Bereiche, die Aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) binden, den A-Bereich (Aminoacyl-Bereich) und den P-Bereich (Peptidyl-Bereich), zu deren Charakteristika sowohl die 50S- als auch die 30S-Einheit der Ribosomen beitragen.

Die Proteinbiosynthese kann dabei in fünf Phasen untergliedert werden:

In der ersten Phase erfolgt eine kovalente Bindung der Aminosäuren an spezifische tRNAs unter Aufwendung von Energie in Form von ATP. In der folgenden Initiationsphase bindet die mRNA, die den Bauplan für die herzustellende Primärsequenz verkörpert, an die 30S-Untereinheit des Ribosoms. Anschließend bindet die erste Aminoacyl-tRNA unter Ausbildung des Initiationskomplexes und unter Energieaufwendung in Form von GTP an die 50S Untereinheit des Ribosoms. In der dritten Phase setzt die Elongation der Polypetidkette ein, indem sie durch kovalente Bindung aufeinander folgender Aminosäuren verlängert wird. Cytosolische Proteine und Elongationsfaktoren unterstützen diesen Prozess. Die Elongationsphase findet unter Aufwendung von zwei Molekülen GTP statt. Anschließend

wird die fertig gestellte Polypeptidkette durch Freisetzungsfaktoren vom Ribosom abgelöst und es beginnt die Phase der Faltung in die biologisch aktive Konformation sowie die Prozessierung des Proteins.[144]

Hemmung der Proteinbiosynthese

Neben den Ribosomen ist der Elongationsfaktor Tu einer der interessanten Hauptangriffspunkte für Antibiotika, welche die Proteinbiosynthese inhibieren. Bisher gibt es nur sehr wenige Antibiotika, die hier ansetzen. Der Elongationsfaktor Tu (EF-Tu), mit 43 kDa das größte Protein in bakteriellen Zellen, spielt eine Schlüsselrolle in der Proteinbiosynthese, da er die Elongationsphase katalysiert. Während er mit GTP einen Komplex ausbildet, geht er in seine aktive Konformation über und transportiert die Aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) zu dem A-Bereich des Ribosoms. Die Konformationsänderung zurück zur inaktiven Form (EF-Tu-GDP-Komplex) wird durch die GTP-Hydrolyse während der Codon/Anticodon-Interaktion initiiert. Dieser EF-Tu-GDP-Komplex zeigt keine weitere Affinität zum Ribosom und dissoziiert ab. Anschließend regeneriert sich der inaktive Komplex mittels des Nukleotid-Austausch-Faktors EF-Ts zu dem aktiven EF-Tu-GTP-Komplex. Nach Abdissoziation des EF-Tu-GDP-Komplexes vom Ribosom wird eine neue Peptidbindung zwischen der aa-tRNA und der Polypeptidkette geknüpft. Bis dato existieren vier strukturell unterschiedliche Antibiotika-Klassen, deren Target der Elongationsfaktor Tu ist. Ihre wichtigsten Vertreter sind Kirromycin (**24**), ein Mitglied der Elfamycine, Enacyloxin IIa (**62**), ein lineares Polyenantibiotikum, Pulvomycin (**63**), ein glykosidisches Makrolid und das Thiazolpeptid-Antibiotikum GE2270 A (**64**).[145]

Enacyloxin IIa (**62**) ist der jüngste Vertreter dieser EF-Tu-Hemmstoffe, wurde erstmals aus *Frateuria* W-315 isoliert und inhibiert sowohl Gram-positive und Gram-negative Bakterien in ihrem Wachstum.[146-151] Pulvomycin (**63**), welches auch unter dem Namen Labilomycin bekannt ist, wurde erstmals 1957 aus *Streptomyces albosporeus* isoliert, seine korrekte Struktur, konnte erst 1985 durch R. J. SMITH et al. vollständig aufgeklärt werden.[152] Antibiotikum GE2270 A (**64**) ist ein cyclisches Thiazol-Peptid, welches 1991 aus *Planobispora rosea* isoliert werden konnte.[153, 154] Interessanterweise inhibieren verwandte Antibiotika wie Thiostrepton, die ebenfalls ein Thiazol-Peptidgerüst aufweisen auch die Proteinbiosynthese, wobei ihr Target jedoch die Ribosomen sind.[155]

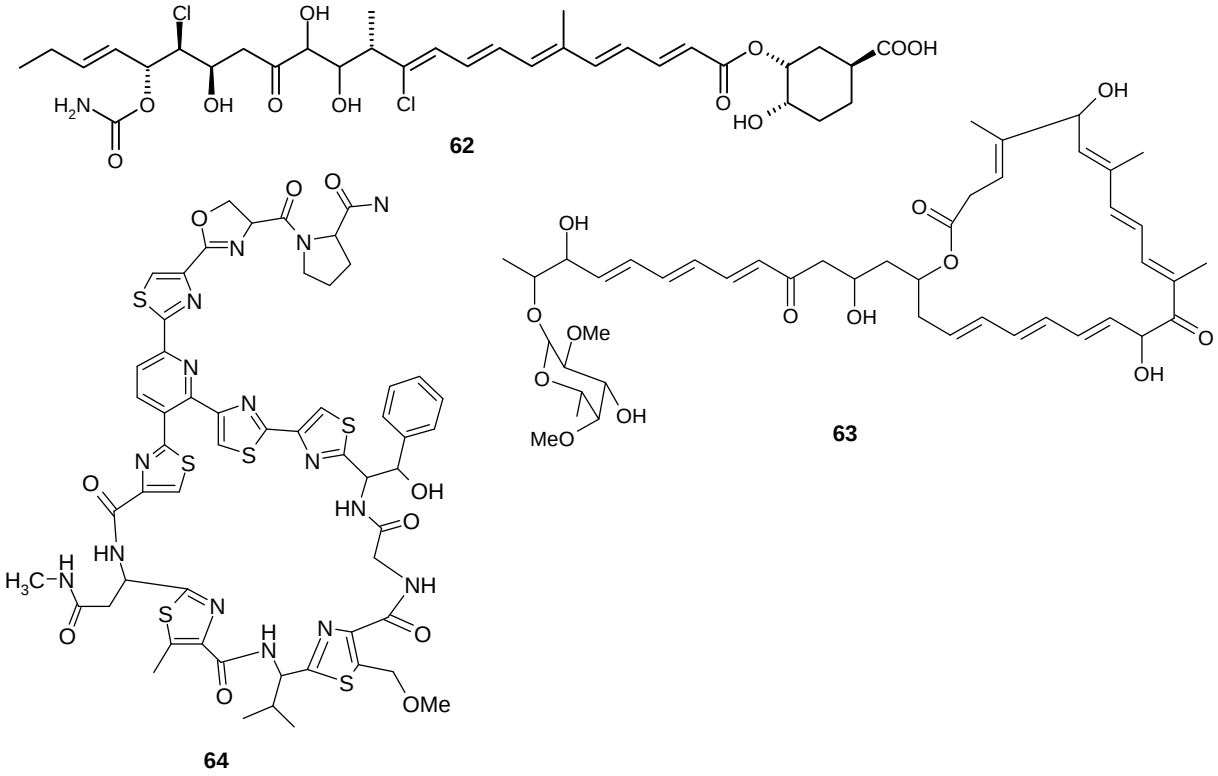


Abbildung 65: Strukturen von Enacyloxin IIa (62), Pulvomycin (63) und GE2270 A (64).

Diese vier strukturell unterschiedlichen Antibiotika-Familien zeigen zwei verschiedene Mechanismen der Hemmung von EF-Tu.[145]

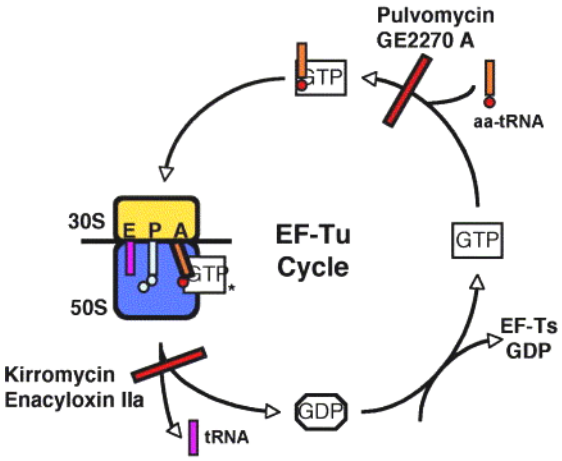


Abbildung 66: Der EF-Tu Cyclus mit Angriffspunkten verschiedener Antibiotika. GTP-Hydrolyse vom Ribosom ist mit einem Stern markiert. Links unten: 24 und 62 hemmen die Abdissoziation des EF-Tu-Komplexes vom Ribosom. Rechts oben: 63 und 64 stören Komplexbildung von EF-Tu•GTP mit Aminoacyl-tRNA. [aus A. PARMEGGIANI et al.[145]]

Elfamycine, wie z.B Kirromycin (**24**) und lineare Polyenantibiotika wie Enacyloxin IIa (**62**) induzieren eine konstitutive Aktivierung des EF-Tu-GDP-Komplexes. Dabei veranlassen sie diesen dazu, dass er nach Bindung von tRNA und GTP-Hydrolyse weiter am Ribosom haften bleibt, was die Synthese neuer Peptidbindungen unterbindet.[145, 156, 157] Pulvomycin (**63**) und Antibiotikum GE2270 A (**64**) wiederum unterbinden die Ausbildung eines stabilen ternären Komplexes zwischen dem EF-Tu•GTP und einer aa-tRNA, womit sie die Aktivierung des EF-Tu-Komplexes stören.[145, 157, 158] Ein struktureller Zusammenhang zwischen dem Angriffspunkt der EF-Tu-Inhibierung und den verschiedenen Wirkstoffen konnte bisher nicht erschlossen werden.

6.4 Biosynthese von Kirromycin (24)

6.4.1 Klassisch biosynthetische Vorarbeiten

Es wurden bis dato keine klassischen Biosynthesestudien an Kirromycin (**24**) durchgeführt.
Die Biosynthese von Aurodox (**53**), ein *N*-Methyl-Derivat von Kirromycin (**24**) wurde von LIU et al. über Fütterungsstudien untersucht, wobei sie sowohl Kultivierungsansätze unter Zufütterung von ^{14}C-angereichten als auch ^{13}C-markierten Vorläufern durchgeführt hatten.[159, 160] Ebenso unterstützten MAEHR et al. mit Biosynthesestudien mittels Fütterungsexperimenten von isotopenmarkierten Bausteinen die gewonnenen Daten.[116] Im Folgenden werden die Ergebnisse der Biosynthesestudie mit ^{13}C-markierten Vorläufern näher beschrieben.[116, 160] Sowohl LIU et al. als auch MAEHR et al. konnten von Fütterungsexperimenten mit [1-^{13}C]Acetat, [2-^{13}C]Acetat, [1-^{13}C]Propionat, [3-^{13}C]Propionat, [1-^{13}C]Butyrat, [1,4-$^{13}C_2$]Butyrat bzw. [Methyl-^{13}C]Methionin (1.0 g/L), die in Abbildung 67 zusammengefassten Einbaumuster ableiten.[116, 160]

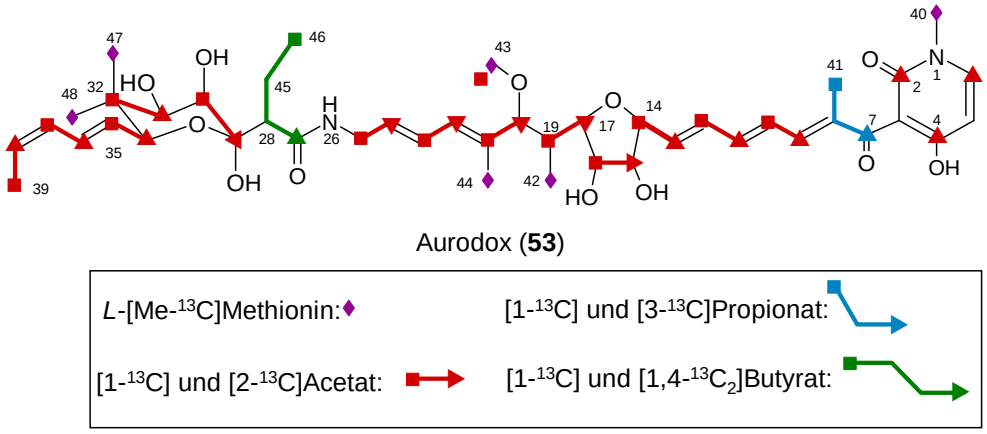


Abbildung 67: Hypothetischer biosynthetischer Ursprung des Aurodox-Grundgerüstes nach LIU et al.[160]

Es zeigte sich, dass im ^{13}C-NMR-Spektrum die Kohlenstoffatome C-2, C-4, C-6, C-9, C-11, C-13, C-15, C-17, C-20, C-22, C-24, C-29, C-31, C-33, C-36 und C-38 aus dem Kultivierungsansatz unter Zugabe von [1-^{13}C]Acetat eine Anreicherung zeigten. Die NMR-Analyse des Fütterungsexperiments mit [2-^{13}C]Acetat vervollständigte das Einbaumuster um 14 angereicherte Signale (C-10, C-12, C-14, C-16, C-19, C-21, C-23, C-25, C-30, C-32, C-35, C-37, C-39, and C-43). Zufütterung von [1,4-^{13}C]Butyrat ergab eine eindeutige Anreicherung (acht bis zehnfache Anreicherung) der Kohlenstoffatome C-27 und C-46. Ein ebenso eindeutiges Ergebnis lieferten die Kultivierungsansätze unter Zugabe von [1-^{13}C] und [3-^{13}C]Propionat. Das Kohlenstoffatom C-7 erfuhr eine starke Anreicherung bei der Zufütterung von [1-^{13}C]Propionat, und C-41 zeigte eine fünffache Anreicherung bei Zugabe von [3-^{13}C]Propionat. Der Kultivierungsansatz mit Zufütterung von [Methyl-^{13}C]Methionin führte zur Anreicherung von sechs Kohlenstoffatomen (C-40, C-42, C-43, C-44, C-47, und C-48). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein eindeutiger Einbau von 13 Acetat-, einer Propionat- und einer Butyrateinheit nachgewiesen werden konnte. Jedoch blieb durch diese Experimente der biosynthetische Ursprung der Pyridoneinheit verschlossen.[116, 160]

Bei einem weiteren Elfamycin, dem glykosidischen Aurodox-Derivat Efrotomycin (**55**), zeigten DARLAND et al. durch Fütterungsexperimente mit isotopenmarkierten Glycin, dass dieses der unmittelbare Vorläufer der Kohlenstoffatome C-24 und C-25 sowie von N-26 sein sollte. Ebenso fanden sie durch Kultivierungsansätze unter Zugabe von z.B. [4,5-$^{13}C_2$]Uracil heraus, dass die Kohlenstoffatome C-4 und C-5 einen intakten Einbau einer C_2-Einheit zeigten ($J_{C,C}$ = 57 Hz). Infolgedessen postulierten sie, dass der direkte Vorläufer höchstwahrscheinlich nicht Uracil, aber ein Abbauprodukt von β-Alanin sein könnte.[161, 162]

6.4.2 Genetisch-biosynthetische Vorarbeiten

Der Biosynthese-Gencluster von Kirromycin (**24**) wurde von T. WEBER im Rahmen seiner Dissertation identifiziert und sequenziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Cluster auf vier überlappenden Cosmiden lokalisiert ist.[51] Durch weitere Arbeiten wurden die Grenzen des Clusters aufgeklärt.[52, 54] K. J. LAIPLE konnte im Rahmen ihrer Dissertation durch Arbeiten mit verschiedenen Gen-Austausch-Mutanten die essentielle Bedeutung der kodierten Proteine für die Biosynthese von Kirromycins (**24**) nachweisen. Ebenso konnte sie durch Kultivierungsansätze mit Zufütterung von β-Alanin beweisen, dass dieser Vorläufer ausschlaggebend für die Biosynthese von Kirromycin (**24**) sein sollte, da die Produktion von **24** unter Zufütterung von β-Alanin stark anstieg.[53]

Der Biosynthesegencluster von Kirromycin (**24**) besteht aus einem PKS/NRPS-Hybridsystem (PKS: Polyketidsynthase, NRPS: nicht ribosomale Peptidsynthase), welches von den Genen kirAI bis kirAVI kodiert wird (siehe Abbildung 68). Die Genprodukte von *KirAI* bis *KirAV* tragen keine internen Acyltransferasen (AT), was ein ungewöhnliches Merkmal darstellt. Das Gen kirAVI hingegen ist das einzige PKS-Gen, welches die Kodierung für interne AT-Domänen beinhaltet. Die Kirromycin-Biosynthese scheint somit eine Mischung aus der klassischen „*cis*-AT-PKS“ vom Typ I, die interne AT-Domänen trägt, und aus der nicht-klassischen „*trans*-AT-PKS“ vom Typ I, der interne AT-Domänen fehlen, zu sein.

Die Biosynthesehypothese geht davon aus, dass die Synthese von Kirromycin (**24**) mit der Startereinheit Acetyl-CoA an der ersten Domäne von KirAI beginnt. Dieses Lademodul trägt zwei ungewöhnliche Domänen. Die Domäne X_L zeigt keine Sequenzähnlichkeiten zu bisher bekannten Proteinen. Die Domäne X_1 scheint einen neuen Prototyp einer Dehydratase-Domäne zu repräsentieren, [163, 164] die für die Katalyse der *Z*-ständigen Doppelbindung zwischen dem Kohlenstoffatomen C-37 und C-38 zuständig ist. Die Module 1 bis 4, die auf dem Gen kirAII kodiert sind, katalysieren die Verlängerung der Polyketidkette. Der Ursprung der Amidbindung (N-26 und C-27) in Kirromycin (**24**) liegt in der Kondensationsreaktion mit einer Glycineinheit, die durch das NRPS/PKS-Hybridsystem KirAIII katalysiert wird. Die von den Genen kirAIV bis kirAVI kodierten Polyketidsynthasen-Module verlängern das Kirromycingerüst. Innerhalb des PKS-Systems und im gesamten Cluster konnten keine Gene, die Homologien zu Thioesterasen zeigen, nachgewiesen werden. Daher scheint eine

Kondensationsreaktion mit β-Alanin, die durch die NRPS KirB katalysiert wird, der finale Schritt des Kettenaufbaus zu sein. Nach oder während der Freisetzung des primären PKS/NRPS-Produkts folgen einige Cyclisierungs- und Oxidationsreaktionen (siehe Abbildung 68). Die hierfür notwendigen Enzyme konnten jedoch bisher nicht zweifelsfrei zugordnet werden.[51, 165]

Auf Grund der Aminosäuresequenz in den zentralen Regionen der Ketoreduktasen, können hypothetische Annahmen bezüglich der Konfiguration der entstehenden Hydroxylgruppen und der Doppelbindungen getroffen werden. Die Bildung von Hydroxylgruppen mit einer D-Konfiguration wird meist durch Ketoreduktasen katalysiert, die einen charakteristischen Aspartatrest tragen.[166] Zusätzliche Katalysereaktionen durch Dehydratasen könnten bevorzugt zu *E*-ständigen Doppelbindungen führen.[165] Ebenso werden neue Stereozentren innerhalb der späten Biosynthese durch Oxygenierungsreaktionen an den C-Atomen C-16 und C-30, durch Ausbildung des Furanringes (C-14 bis C-17) und durch eine Reduktions- und Methylierungsreaktion an Kohlenstoffatom C-20 gebildet.

Höchstwahrscheinlich erfolgt die Ausbildung der zuckerartigen Goldinonsäure-Einheit über eine Acetalisierungsreaktion des Kohlenstoffatoms C-33 mit der Hydroxylgruppe O-34 und der Ketofunktion an C-29. Diese Reaktion könnte bereits während der Ausbildung der Polyketidkette stattfinden, z.B. katalysiert durch Modul 5 auf *KirAII*. Die Hydroxylierungsreaktion des Kohlenstoffatoms C-30 wiederum wird höchstwahrscheinlich eine Post-PKS Oxygenierungsreaktion sein. Der Aufbau des Furanringes könnte durch Dehydratisierung der Hydroxylgruppe an C-15, was die Ausbildung einer Doppelbindung zur Folge hat, initiiert werden und nachfolgen über eine Epoxidbildung ablaufen. Jedoch weisen die gewonnenen Sequenzdaten nicht auf das Vorhandensein der notwendigen Enzymaktivitäten wie Dehydratasasen, Epoxidasen oder Hydrolasen hin.[165]

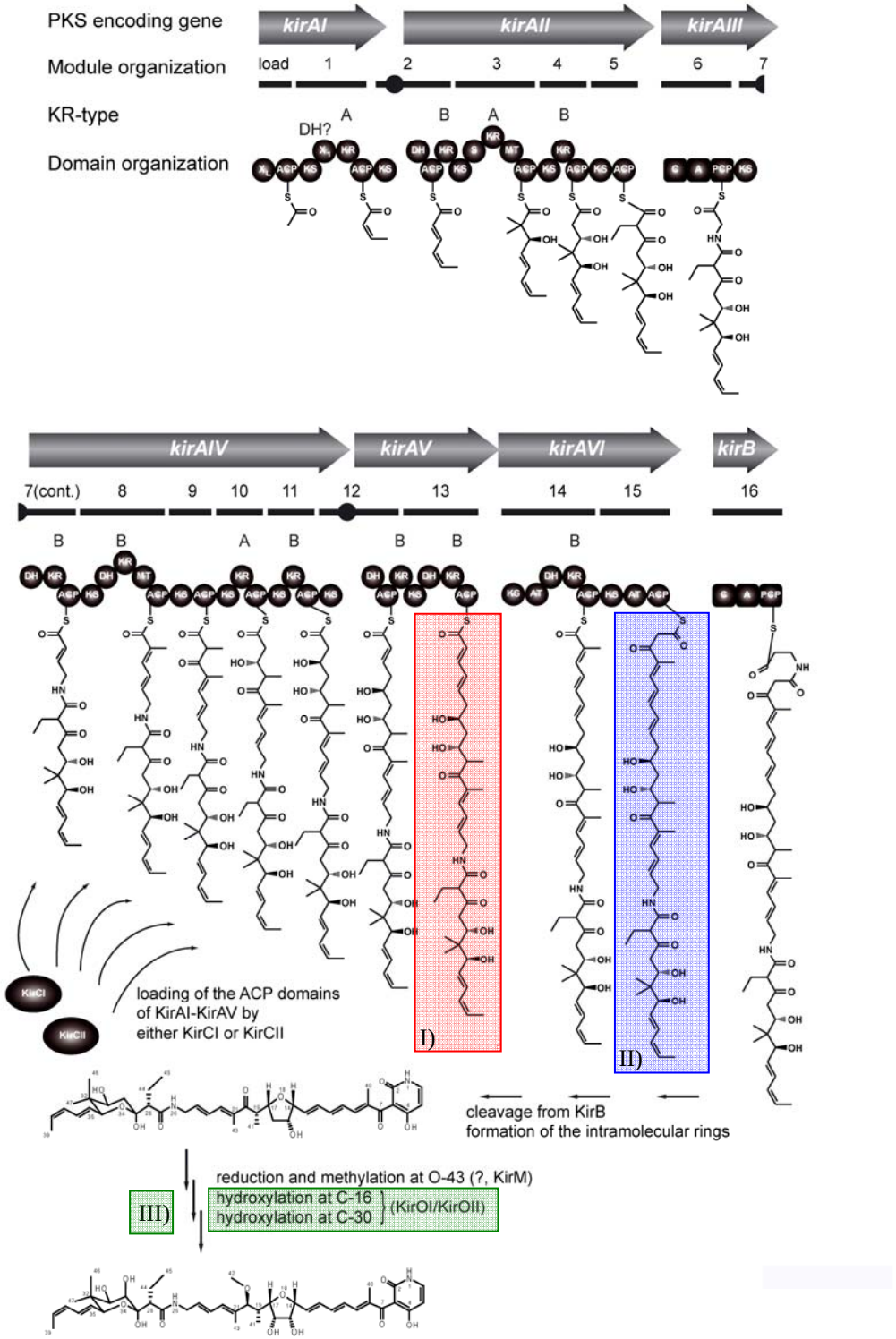


Abbildung 68: Abbildung des hypothetischen Biosyntheseweges von Kirromycin (24) nach T. WEBER.[51, 165] Load: Ladedomäne, 1-16: Module; X_L und X_1: Domänen mit noch nicht geklärten Funktionen; (●): Module, die auf zwei Genen lokalisiert sind. ACP: Acyl-Carrier-Protein, AT: Acyltransferase-Domäne; KS: Ketosynthase-Domäne; KR: Ketoreduktase-Domäne; DH: Dehydratase-Domäne; MT: Methyltransferase-Domäne; C: Kondensationsdomäne; A: Adenylierungsdomäne; PCP: Petidyl-Carrier-Protein. Die farbig markierten Bereiche dienen zur besseren Übersichtlichkeit der inaktivierten Genabschnitte bearbeiteter Deletionsmutanten (I, II, III; siehe 6.5.2).[aus T. WEBER et al. [165]]

Auf *in silico* Daten basierend, wurde β-Alanin als Vorläufer für den Aufbau der Pyridoneinheit in Kirromycin (**24**) postuliert, was durch Fütterungsexperimente mit markierten Vorläufern zu beweisen war.[51, 165]

6.4.3 Fütterungsexperimente mit markierten Vorläufern

Die bisher nur auf genetischen Analysen beruhende Biosynthesehypothese (siehe Abbildung 68) sollte durch den Einbau verschiedener isotopenmarkierter Vorläufer überprüft werden. Um das Verhalten des Produzenten Tü 365 im Fermenter zu testen, wurden Probefermentationen im Biostat-B Fermenter durchgeführt (siehe Kapitel 6.2.1). Da der Stamm Kirromycin (**24**) in ausreichenden Mengen für analytische Untersuchungen produzierte, wurden die gewählten Fermentationsbedingungen für die kommenden Fütterungsexperimente beibehalten.

6.4.3.1 Produktionskurve

Im nächsten Schritt wurde eine Fermentationskurve für die Produktion von Kirromycin (**24**) erstellt, mit deren Hilfe man den geeigneten Zeitpunkt und die optimale Dauer der Zugabe von isotopenmarkierten Vorläufern zum Kultivierungsansatz ermitteln kann.

Die Fermentationskurve wurde mittels der Kultivierung im Biostat-B Fermenter aufgenommen. Die Kultivierung des Stammes Tü 365 erfolgte nach den Parametern die unter Kap. 6.2.1 bzw. Kap. 12.1 beschrieben sind, wobei der Füllstand der Kulturbrühe durch Zugabe von autoklaviertem Leitungswasser arretiert wurde. Zur Bestimmung der zeitabhängigen Gehaltes von Kirromycin (**24**), wurden über ein Probenentnahmerohr alle sechs Stunden 10 mL Kulturbrühe entnommen, erstmals nach Animpfen bis hin zur 72. Inkubationsstunde. Ebenso wurde während der Fermentation der pH-Verlauf mittels einer pH-Elektrode aufgenommen. Jede Probe wurde mit 10 mL Ethylacetat extrahiert. Von der organischen Phase wurden 5 mL entnommen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Rohextrakte wurden in 500 µL Methanol aufgenommen und zentrifugiert. Von dieser Extraktlösung wurden 150 µL entnommen und einer HPLC-Analyse zugeführt (Analytische HPLC, Säule 1, Programm 1, siehe Kapitel 8.2). Mit Hilfe der Kalibrierungsgeraden, die zuvor mit Konzentrationen von 2.0 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.5 mg/mL und 0.25 mg/mL erstellt wurde, konnte der Produktionsverlauf des Kirromycins (**24**) durch HPLC-Chromatographie quantitativ verfolgt werden (siehe Abbildung 69).

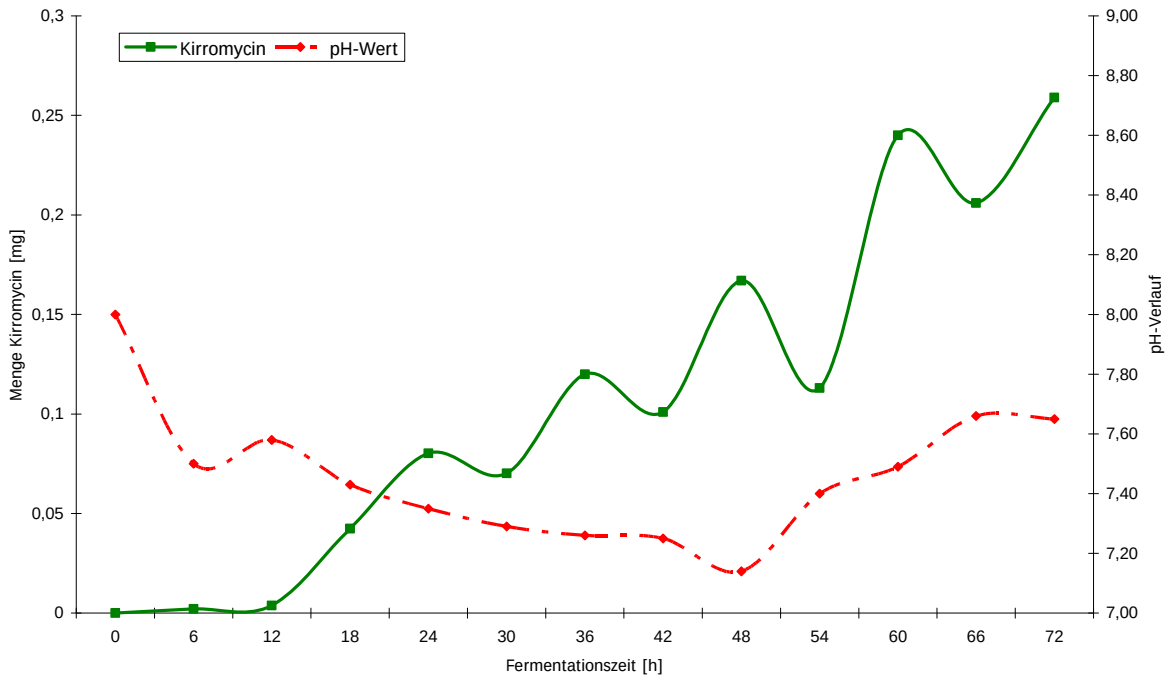


Abbildung 69: Gehalt an Kirromycin (24) aus Stamm *S. collinus* Tü 365. Menge an produzierten Kirromycin (24) ist grün (Quadrate), der pH-Verlauf ist rot (Rauten) dargestellt. Die Kurven wurden mit EXCEL-Programm geglättet.

Die Fermentationskurve (siehe Abbildung 69) zeigt innerhalb der ersten 48 h einen Abfall des pH-Wertes auf 7.1, wobei während der zwölften Stunde ein kurzzeitiger Anstieg auf 7.6 zu beobachten war. Ab der 48. h steigt der pH-Wert kontinuierlich bis zur 66. h, wo er sein Maximum mit pH = 7.7 erreicht. Die Produktion von **24** setzt mit der zwölften Stunde ein und die Konzentration von Kirromycin (**24**) erreicht ihr erstes Maximum nach 24 h Inkubationszeit. Ab der 24. h steigt die Menge von Kirromycin (**24**) stetig an und erreicht ihr Maximum mit der 72. Stunde und dem Ende der Fermentation. Auf Grund dieser Daten wurde ein optimaler Fütterungszeitraum von der zwölften Stunde bis zur 24. Stunde der Inkubation bestimmt. Der Start der Fütterung sollte mit dem Anfang der Produktion von **24** beginnen, damit den Produzenten kontinuierlich über einen, dem natürlichen Stoffwechsel entsprechenden Zeitraum mit markierten Vorläufer versorgen, und zum ersten Produktionsmaximum beendet sein, was eine hohe Anreicherung im Molekül zur Folge haben sollte.

6.4.3.2 Fütterungsexperiment mit [1-^{13}C]Acetat

Mit einem Kultivierungsansatz mit Zugabe von [1-^{13}C]Acetat sollten die gewählten Parameter und der Fütterungszeitraum überprüft werden. Das Ziel war es dabei, durch Zufütterung von ^{13}C-markierten Acetat eine Gesamtanreicherung von Kirromycin (**24**) zu erreichen und das erhaltene Einbaumuster mit den literaturbekannten Daten von Aurodox (**53**), dem *N*-Methyl-Derivat von Kirromycin (**24**), abzugleichen.[122, 160]

Der Stamm *S. collinus* Tü 365 wurde im Biostat-B Fermenter mit 900 mL KP-Medium bei 30 °C, 400 rpm und einer Luftzufuhr von 4 vvm kultiviert. Der Kultivierungsansatz wurde mit 150 mL einer 48 h alten Vorkulturlösung beimpft. Die Lösung von [1-^{13}C]Acetat wurde der Kulturbrühe ab der zwölften Stunde kontinuierlich mittels einer Schlauchpumpe bis zur 24. h der Fermentation unter sterilen Bedingungen zugefügt. Es wurden dabei 700 mg/L (8.4 mmol/L) [1-^{13}C]Acetat in 40 mL wässriger Lösung (pH = 7.0) zugefüttert. Nach der 48. h wurde die Fermentation beendet, um mögliche Abbau- und Umbaureaktionen zu vermeiden. Die Kulturbrühe wurde nach pH-Einstellung (pH = 5) über Filtration (Celite-Zusatz) vom Mycel abgetrennt. Das Kulturfiltrat wurde mit Ethylacetat dreimal extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Zur Isolierung von Kirromycin (**24**) erfolgte eine Petrolether-vermittelte Ausfällung des Rohextraktes (effektive Abtrennung von Fetten). Der erhaltene Niederschlag wurde über Gelchromatographie (Sephadex LH-20; MeOH) und anschließende Säulenchromatographie an Kieselgel ($CHCl_3$/MeOH/25%ige NH_3 8:2:0.5) aufgereinigt. Es konnten 6.7 mg/L angereichertes **24** isoliert werden. In Tabelle 6 ist der spezifische Einbau von [1-^{13}C]Acetat in Kirromycin (**24**) aufgelistet. Die Berechnung erfolgte wie in Kapitel 8.3.6 beschrieben, nach Formel 3.[98] Die Abbildung 70 veranschaulicht graphisch das erhaltene Einbaumuster.

Das Fütterungsexperiment mit [1-^{13}C]Acetat führte zu starken Einbauraten in die aus den genetischen Vorarbeiten bereits vermuteten Kohlenstoffatome. Interessanterweise zeigte das Kohlenstoffatom C-24 keine Anreicherung, was die Hypothese, dass Glycin der direkte Vorläufer der Einheit C-24/C-25/N-26 ist, untermauert.[167] Im Gegensatz zu den Ergebnissen von LIU et al. zeigen die Kohlenstoffatome C-27 und C-44, die aus Butyrat stammen sollen und C-7, welches Propionat als Vorläufer haben soll, eine starke Einzelanreicherung durch Zufütterung von [1-^{13}C]Acetat. Dieses Einbaumuster legt die Vermutung nahe, dass die Biosynthese von Aurodox (**53**) und Kirromycin (**24**) stärkere Unterschiede aufweist, als bisher vermutet worden ist. Ebenso lässt sich eine starke Anreicherung des Kohlenstoffatoms

C-4, welches vermutlich aus β-Alanin stammt, beobachten. Konform zu den Literaturdaten war der nicht-vorhandene Einbau in die aus Methionin abgeleiteten C-Atome.[116, 160]

Atomnummer von **24**	Chem. Verschiebung [ppm]	Spez. Einbau [%]	Atomnummer von **24**	Chem. Verschiebung [ppm]	Spez. Einbau [%]
1-NH	-	-	25	42.0	0.07
2	164.6	**2.81**	26-NH	-	-
3	112.6	0.21	27	177.9	**1.78**
4	169.9	**1.37**	28	52.4	0.16
5	102.6	0.11	29	101.0	**3.05**
6	137.6	0.33	30	71.3	0.19
7	199.0	**2.56**	31	74.0	**4.38**
8	138.1	0.02	32	39.9	0.11
9	142.7	**5.46**	33	77.3	**3.98**
10	129.4	0.07	34-O	-	-
11	141.3	**5.04**	35	130.5	0.25
12	133.6	0.02	36	127.7	**4.48**
13	136.9	**4.05**	37	130.5	0.17
14	81.5	0.10	38	126.4	**4.63**
15	74.9	**5.59**	39	13.7	0.21
16	74.0	0.37	40	11.7	0.29
17	84.9	**3.61**	41	13.9	0.11
18-O	-	-	42	56.2	0.02
19	36.7	0.06	43	11.2	0.12
20	91.8	**3.65**	44	21.1	**2.31**
21	136.0	0.05	45	12.3	0.18
22	130.9	**3.97**	46	15.9	0.06
23	128.1	0.09	47	24.6	0.12
24	131.0	0.28	-	-	-

Tabelle 6: Spezifische Anreicherung der Kohlenstoffatome in 24 nach dem Fütterungsexperiment mit [1-^{13}C]Acetat (150.8 MHz, CD_3OD). Referenz-Atome: Ø der Methylgruppen C-40, C-41, C-42, C-43, C-46 und C-47. Einzelanreicherungen sind hervorgehoben.[98, 165]

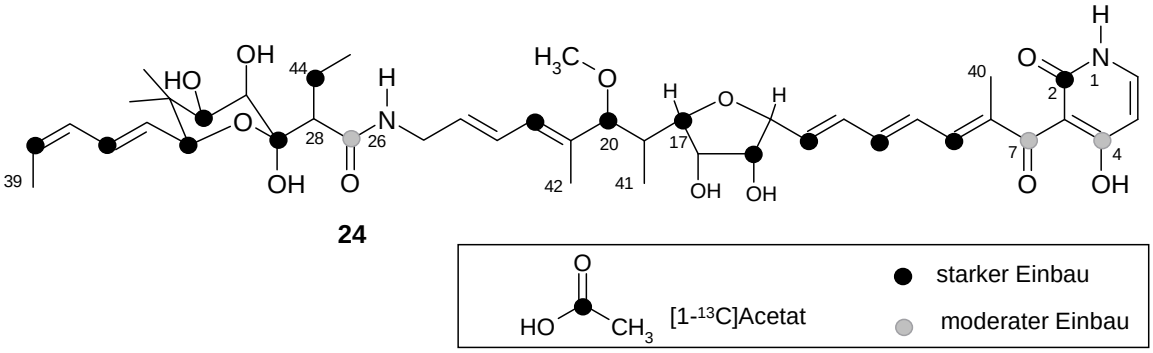


Abbildung 70: Einbaumuster von [1-^{13}C]Acetat in Kirromycin (24).

6.4.3.3 Fütterungsexperiment mit [U-$^{13}C_3{}^{15}N$]β-Alanin

Der erfolgreiche Einbau von [1-^{13}C]Acetat bestätigte die gewählten Parameter der Kultivierungs- und Zufütterungsbedingungen. Die genetischen Vorarbeiten deuten darauf hin, dass β-Alanin der direkte Vorläufer der Pyridoneinheit ist.[51, 165] Das Fütterungsexperiment mit [U-$^{13}C_3{}^{15}N$]β-Alanin sollte diese Theorie bestätigen.

Der Kultivierungsansatz mit Zugabe von [U-$^{13}C_3{}^{15}N$]β-Alanin erfolgte analog zu dem Fütterungsexperiment mit [1-^{13}C]Acetat (siehe 12.3.2). Dem Produzenten Tü 365 wurden 250 mg/L (2.7 mmol/L) [U-$^{13}C_3{}^{15}N$]β-Alanin in 40 mL wässriger Lösung (pH = 7.5) über einen Zeitraum von zwölf Stunden kontinuierlich über eine Schlauchpumpe zugefüttert. Die Aufarbeitung und Aufreinigung führte man analog der Methode, die zuvor für das Fütterungsexperiment mit [1-^{13}C]Acetat beschriebenen wurde, durch. Es konnten 6.0 mg angereichertes **24** isoliert werden. Die Ergebnisse des Fütterungsexperiments mit [U-$^{13}C_3{}^{15}N$]β-Alanin sind in Abbildung 71 graphisch und in den Tabellen 7 und 8 als Auflistung zusammengefasst.[165]

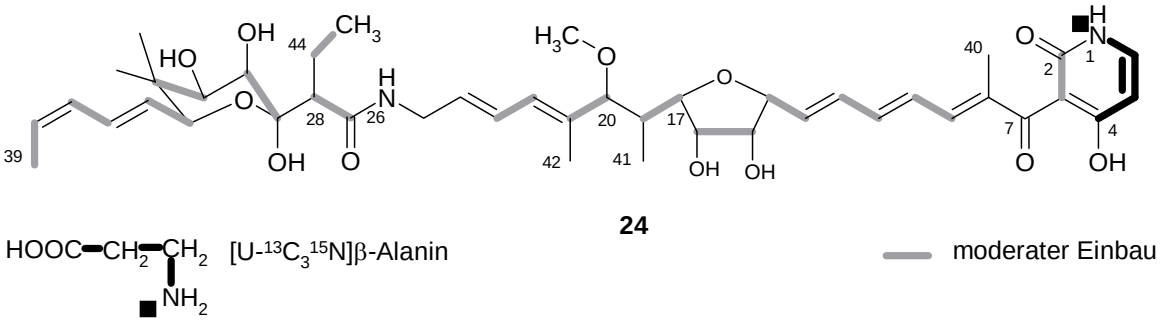


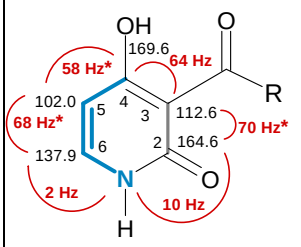
Abbildung 71: Einbaumuster von [U-$^{13}C_3{}^{15}N$]β-Alanin in Kirromycin (24).

Atom-nummer von **24**	Chem. Versch. [ppm]	Dublett Spez. Einbau [%]	J_{CC} [Hz]	Atom-nummer von **24**	Chem. Versch. [ppm]	Dublett Spez. Einbau [%]	J_{CC} [Hz]
1-NH	-	-	-	25	42.0	-	-
2	164.6	0.85	70	26-NH	-	-	-
3	112.6	0.41	70, 64	27	177.9	0.70	49
4	169.9	18.06	58	28	52.4	0.71	49
5	102.6	20.33	68, 58	29	101.0	1.10	52
6	137.6	18.85	68	30	71.3	1.79	52
7	199.0	-	-	31	74.0	1.75	36
8	138.1	-	-	32	39.9	1.15	36
9	142.7	2.14	56	33	77.3	1.35	52
10	129.4	1.51	56	34-O	-	-	-
11	141.3	1.75	56	35	130.5	1.25	52
12	133.6	1.47	56	36	127.7	1.39	56
13	136.9	1.60	50	37	130.5	1.52	56
14	81.5	1.51	50	38	126.4	1.52	42
15	74.9	1.71	38	39	13.7	1.38	42
16	74.0	2.34	38	40	11.7	-	-
17	84.9	1.64	42	41	13.9	-	-
18-O	-	-	-	42	56.2	-	-
19	36.7	1.54	42	43	11.2	-	-
20	91.8	1.46	48	44	21.1	0.95	34
21	136.0	1.30	48	45	12.3	0.77	34
22	130.9	1.34	56	46	15.9	-	-
23	128.1	1.57	56	47	24.6	-	-
24	131.0	-	-	-	-	-	

Tabelle 7: ^{13}C-NMR Kopplungskonstanten und spez. Anreicherung aus dem ^{13}C-NMR-Spektrums von Kirromycin (24) (150.8 MHz, CD_3OD) nach dem Fütterungsexperimenten mit [U-$^{13}C_3{}^{15}N$]β-Alanin. Referenz-Atome: Ø der Methylgruppen C-40, C-41, C-42, C-43, C-46 und C-47. Sehr hohe Anreicherungen sind grün unterlegt.[98, 165]

Das ^{13}C-NMR-Spektrum des aus dem Fütterungsexperiment mit [U-$^{13}C_3{}^{15}$N]β-Alanin erhaltenen **24** präsentierte ein komplexes Kopplungsmuster, was auf starke ^{13}C-^{13}C- und ^{13}C-^{15}N-Kopplungen zurückzuführen ist.

Alle C_2-Einheiten, die von Acetat abgeleitet werden können, zeigten Aufspaltungen zum Dublett. Auf Propionat, Glycin oder Methionin zurückzuführende Einheiten waren zu keinem Dublett aufgespalten. Zwei aus Butyrat resultierende Kohlenstoffatome waren als C_2-Einheit deutlich zu erkennen. Diese Beobachtungen lassen auf einen starken Metabolismus von β-Alanin im Primärstoffwechsel schließen. Ein sehr hoher Einbau von [U-$^{13}C_3{}^{15}$N]β-Alanin konnte in der Pyridoneinheit (C-4/C-5/C-6/N-1) mithilfe des ^{13}C-NMR-Spektrums erkannt werden. Ein zusätzliches HR-ESI-Experiment des angereicherten **24** erlaubte in Gegenwart der ^{13}C-angereicherten Isotopomere eine Aussage über die Höhe der ^{15}N-Anreicherung zu treffen, die auf 20% bestimmt wurde.



C-Atom.	Chem. Verschiebung [ppm]	Spez. Einbau im Dublett [%]	$J_{(C,C)}$ [Hz]	$J_{(C,N)}$ [Hz]
2	164.6	0.85	70,	(10)
3	112.6	0.41	70, (64)	-
4	169.6	18.06	58*, (schwach: 64)	-
5	102.0	20.33	58*, 68*	-
6	137.9	18.85	68*	2

Tabelle 8: ^{13}C-NMR-Analyse der Pyridoneinheit von Kirromycin (24) aus dem Fütterungsexperiments mit [U-$^{13}C_3{}^{15}$N]β-Alanin.*: Sehr starke Kopplungen.

Neben den intensiven Einbauraten der Kohlenstoffatome C-4, C-5 und C-6 konnte im ^{13}C-NMR-Spektrum eine signifikante Anreicherung der angenommenen Acetateinheit (C-2/C-3) im Pyridonring beobachtet werden. Diese Ergebnisse konnten die Annahme, das β-Alanin der unmittelbare Vorläufer der Pyridoneinheit ist, deutlich bestätigen.[51, 53, 165]

6.4.4 Derivatisierung von Kirromycin (24)

Im Rahmen der biosynthetischen Untersuchungen an dem Sekundärmetaboliten Kirromycin (**24**) wurden einige Derivatisierungsarbeiten durchgeführt, um durch Schaffung eines *N*-Methylderivates tautomere Effekte während der ^{13}C-NMR-Analyse zu unterbinden, die durch starke Linienverbreitung die Analyse der ^{13}C-NMR-Spektren erschwerte. Dabei wurden zwei verschiedene Methylierungsverfahren untersucht.

a) Methylierung mit Methyliodid[168]

Die Umsetzung von Kirromycin (**24**) mit Methyliodid in einer Suspension von Aceton und Dikaliumcarbonat über 18 h unter Rückfluss (56 °C) mit anschließender Aufarbeitung ergab ein Multikomponentengemisch, das nach HPLC-ESI-MS-Analyse (c = 5 mg/mL, Säule 2, Programm 2) kein Methylderivat von Kirromycin (**24**) enthielt.

b) Methylierung mit Diazomethan

Bei diesem Verfahren wurden insgesamt vier verschiedene Ansätze getestet, die sich in der Wahl des Lösungsmittels, der Menge an zugegebenen Diazomethan und in der Reaktionszeit unterscheiden.

Die LC-MS-Analyse der Rohprodukte (c = 5 mg/mL, Säule 2, Programm 2) zeigt, dass die optimalen Reaktionsbedingungen bei 0 °C und einer Reaktionszeit von fünf Stunden erreicht sind, wobei Ethanol als Lösungsmittel verwendet werden sollte.

Im Gegensatz zu den anderen Bedingungen konnte hier eine selektive Bildung von zwei Produkten beobachtet werden, die wie in Abbildung 72 gezeigt, anhand ihrer ESI-MS-Spektren eindeutig als Methyl- bzw. Dimethylderivat von Kirromycin (**24**) identifiziert werden konnten

In Tabelle 9 ist die Auswertung der HPLC-ESI-MS-Analyse zusammengefasst.

Substanz	Retentionszeit [min]	Massen (*m/z*)
Kirromycin (24) **(*m/z* = 796)**	16.80	779 $[M-H_2O+H]^+$, 797 $[M+H]^+$ 819 $[M+Na]^+$, 1593 $[2M+H]^+$
Methylderivat (65) **(*m/z* = 810)**	17.70	793 $[M-H_2O+H]^+$, 811 $[M+H]^+$ 833 $[M+Na]^+$, 1643 $[2M+Na]^+$
Dimethylderivat (66) **(*m/z* = 824)**	18.21	807 $[M-H_2O+H]^+$, 825 $[M+H]^+$, 847 $[M+Na]^+$, 1671$[2M+Na]^+$

Tabelle 9: Zusammenfassung der gewonnenen HPLC-ESI-MS-Daten der Derivatisierung von Kirromycin (24) mit Diazomethan.

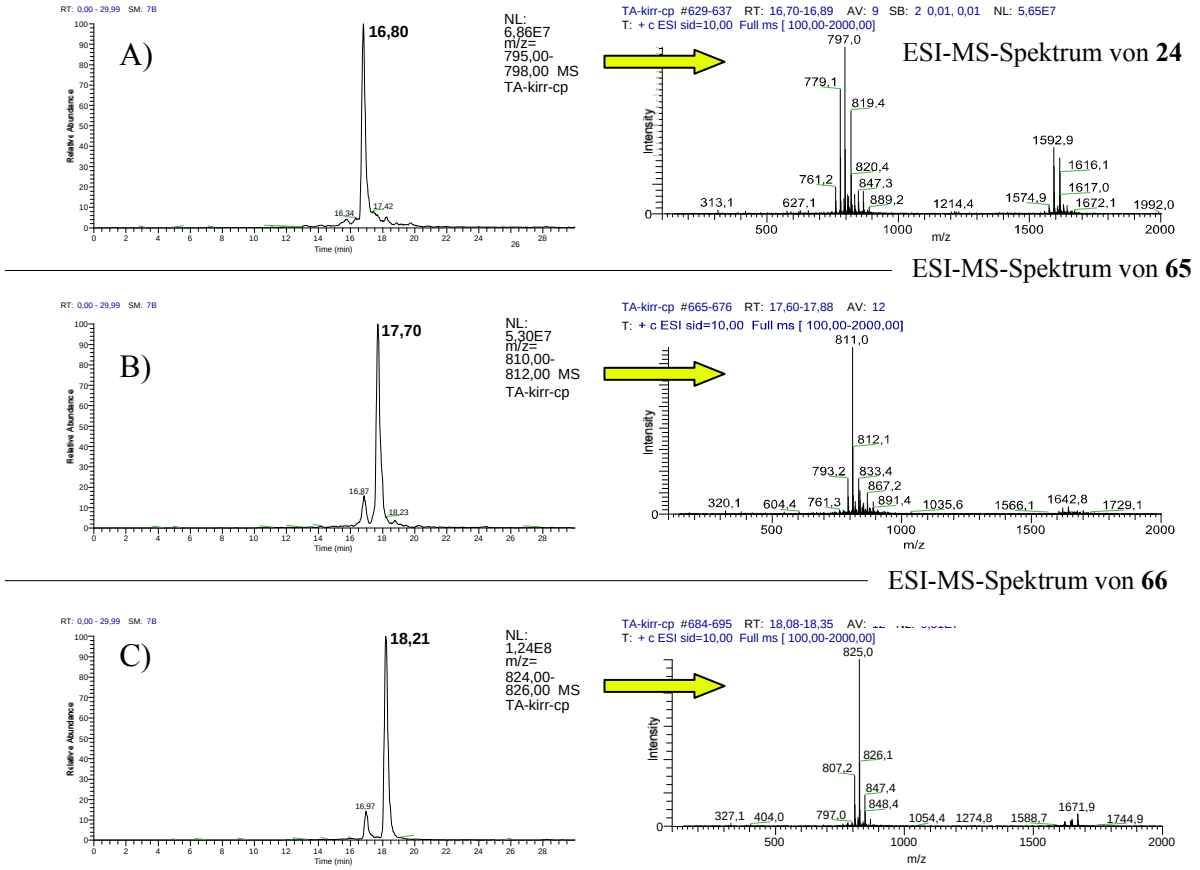


Abbildung 72: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm der Derivatisierung von Kirromycin (24) im positiven Modus. Linke Hälfte: A) bis C) Massenchromatogramme mit gezielter Suche von *m/z* = 797, *m/z* = 811, *m/z* = 825 und den dazu detektierten Signalen. Rechte Hälfte: ESI-MS-Spektren von Kirromycin (24) bzw. seinen Methyl- und Dimethylderivaten (65 bzw. 66).

In Bezug auf dieses viel versprechende Ergebnis der Derivatisierungsarbeiten, wurde angereichertes Kirromycin (**24**), isoliert aus dem Kultivierungsansatz mit Zugabe von [U-$^{13}C_3{}^{15}N$]β-Alanin, mit Diazomethan nach den beschriebenen Bedingungen methyliert. Das entstandene Reaktionsprodukt wurde über HPLC-gekoppelte Massenspektrometrie (c = 4 mg/mL, Säule 2, Programm 2) analysiert. Wie in den Vorversuchen bestand das Reaktionsprodukt aus drei Komponenten: Kirromycin (**24**), seinem Methyl- und Dimethylderivaten (**65** und **66**).

Das Gemisch wurde mittels präparativer HPLC (Säule 8, Programm 4) in seine Einzelkomponenten aufgetrennt. Man erhielt 0.4 mg Kirromycin (**24**), 0.5 mg des Methylderivats (**65**) und 0.7 mg des Dimethylderivats (**66**). Die ^{1}H-NMR-Spektren der aufgereinigten Substanzen zeigten auf Grund der geringen Mengen eine sehr schwaches Signal-Rausch-Verhältnis, die zu weiteren Analysen nicht geeignet waren. Damit war es leider nicht möglich die ^{15}N-^{13}C-Kopplungskonstanten für den Pyridonring in Kirromycin (**24**) experimentell zu bestimmen.

6.5 Screening der genetisch veränderten Stämme

Innerhalb des BMBF-Kooperationsprojekts „MetabolitGenomik-*Actinomycetes*“ mit dem Arbeitskreis von W.WOHLLEBEN und T. WEBER bezüglich der Biosynthese von Kirromycin (**24**) wurden Mutanten-Stämme des Produzenten bzw. ihre Kultivierungsextrakte aus Tübingen zugesandt. Diese Proben sollten sowohl auf die Produktion von **24** als auch auf die Bildung potentieller Vorläufer dieses Sekundärstoffes überprüft werden.

6.5.1 Reproduktion der Ergebnisse aus genetischen Vorarbeiten

Im Rahmen dieser Kooperation wurden die Mutanten 1C24u, TL-kirB-1, orf(+1)::pA18 (Resistenz gegen: Apramycin), kirAVI::thio und orf(-1)::thio (Resistenz gegen: Thiostrepton) in Göttingen unter Zugabe geeigneter Antibiotika kultiviert und aufgearbeitet. Die resultierenden Extrakte wurden mittels HPLC-gekoppelter Massenspektrometrie analysiert.

Mutanten-Bezeichnung	Genotyp der Mutante
1C24u	Apramycin-resistente Insertions-Mutante mit internem Fragment der Kirromycin-PKS
TL-kirB-1	Apramycin-resistente Insertions-Mutante im kirB-Gen
orf(+1)::pA18	Apramycin-resistente Insertions-Mutante mit dem Inaktivierungsplasmid pA18 (außerhalb der Grenzen des Kirromycin-Biosynthese-Genclusters)
kirAVI::thio	Thiostrepton-resistente Genaustauschmutante im kirAVI-Gen
orf(-1)::thio	Thiostrepton-resistente Austausch-Mutante mit Thiostrepton-Resistenzkassette (außerhalb der Grenzen des Kirromycin-Biosynthese-Genclusters)
TL-kirOI::thio	Thiostrepton-resistente Genaustausch-Mutante im kirOI-Gen

Tabelle 10: Zusammenfassung der bearbeiteten Mutanten.

Vorkulturen: Die Vorkulturen erfolgten in 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, die mit 150 mL KP-Medium befüllt und nach Sterilisation mit 150 µL Antibiotika-Stammlösung (thio^{50}-DMSO bzw. apra^{50}-H_2O) unter sterilen Bedingungen versehen waren. Je zwei Kolben

wurden mit einer Mutante angeimpft. Die Fermentation erfolgte für 48 h bei 30 °C und 180 rpm. Als Referenz wurde der Produzent *S. collinus* Tü 365 ohne Antibiotikum-Zusatz unter sonst gleichen Bedingungen kultiviert.

Hauptkulturen: Für die Hauptkulturen wurden 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen mit 150 mL KP-Medium befüllt. Nach Sterilisation wurden bei einer Temperatur von ca. 40 °C je drei Kolben mit 7.5 mL der Vorkulturlösung eines Mutanten-Stammes beimpft und 150µL des jeweiligen Antibiotikums unter sterilen Bedingungen hinzugegeben. Erneut wurde der Wildtyp ohne Antibiotikum-Zugabe als Referenz verwendet. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte für 72 h bei 30 °C und 180 rpm.

Aufarbeitung: Die Kulturbrühen wurden mit 0.5 M HCl auf pH = 5 eingestellt und unter Celite-Zusatz filtriert. Die Mycelien wurde verworfen, da sie nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle nur Spuren von Kirromycin (**24**) enthielten bzw. keine interessanten Metaboliten zeigten. Die Kulturfiltrate wurden mit Ethylacetat extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Chemische Analytik: Die erhaltenen Rohprodukte wurden mittels Dünnschicht-chromatographie an Kieselgel (c = 4 mg/mL, $CHCl_3$/MeOH 85:15) und über HPLC-gekoppelte Massenspektrometrie (c = 4mg/mL, Säule 2, Programm 2) mit den aus Tübingen zugesandten Rohextrakten verglichen.

Die Extrakte der Kultivierungen der Mutanten-Stämme 1C24u, TL-kirB-1 und kirAVI::thio zeigten einen Ausfall der Produktion von Kirromycin (**24**). Die Rohprodukte der Kultivierungen des Wildtypstammes S. collinus Tü 365 und der Mutanten orf(+1)::pA18 und orf(-1)::thio zeigten eine signifikante Produktion von **24**.

Die signifikante Produktion von **24** der Mutanten-Stämme orf(+1)::pA18 und orf(-1)::thio bestätigte eindeutig, dass bei diesen Genaustauschmutanten Genabschnitte deaktiviert wurden, die für die Biosynthese von **24** nicht essentiell sind und sich daher nicht im Biosynthese-Gencluster von Kirromycin (**24**) befinden.[165] Der Ausfall der Produktion von **24** bei Kultivierungen mit den Mutanten-Stämmen 1C24u, TL-kirB-1 und TL-kirAVI::thio war ein eindeutiges Indiz dafür, dass bei diesen Mutationen, die Biosynthese von **24** blockiert worden ist.[51, 53]

Die LC-MS-Analyse der genetisch veränderten Stämme 1C24u, TL-kirB-1 und kirAVI::thio zeigte keine signifikante Produktion neuer Metaboliten. Das Fehlen des Nachweises der gewünschten Metaboliten könnte seine Ursache in der Größe des Ansatzes haben, d.h. die Produktion der neuen Metaboliten ist äußerst gering und daher nicht detektierbar.
Auf Grund dieser Ergebnisse wurden weitere Kultivierungen der Mutanten TL-kirB-1, kirAVI::thio durchgeführt. Zusätzlich wurde ein weiterer genetisch veränderter Stamm, TL-kirOI::thio mit in diese Untersuchungen integriert.

6.5.2 Screening ausgewählter Mutanten

6.5.2.1 Der Mutanten-Stamm kirAVI::thio

Im hypothetischen Biosyntheseweg von Kirromycin (**24**) wird postuliert, dass die von kirAVI kodierte „*cis*-AT-PKS“ vom Typ I die letzten Elongationsreaktionen, den Einbau von Propionat und Acetat katalysiert (siehe Abbildung 68). Anschließend erfolgt der Aufbau des Pyridonringes durch Kondensation mit β-Alanin, was zu einer Abspaltung des Kirromycin-Vorläufers vom gemischten PKS/NRPS-System führt (siehe Abbildung 68).[51, 165] E. PROß stellte im Arbeitskreis von T. WEBER eine Knock-out-Mutante von kirAVI her, indem sie diesen Genabschnitt durch eine Thiostrepton-Resistenzkassette austauschte.[165] Die ersten Screening-Untersuchungen dieses genetisch veränderten Stammes bestätigten die Biosynthesehypothese, da diese Mutation nicht mehr zur Produktion von Kirromycin (**24**) fähig war.

Theoretischen Überlegungen

Entsprechend der Biosynthesehypothese von Kirromycin (**24**), müsste der Aufbau des Kirromycin-Grundgerüstes über die Enzymaktivitäten *KirAI* bis *KirAV* erfolgen, wenn kirAVI ausgeschaltet wurde. Somit müsste sich ein Präkirromycin bilden, welches um eine Acetat-, eine Propinat- und die β-Alanin-Einheit kürzer als **24** ist (siehe Abbildung 68, I)). Ebenso sollte diese Vorstufe von **24** keinen Pyridonring in sich tragen, da diese Kondensation erst durch den Genabschnitt kirB katalysiert wird, der „downstream“ hinter dem deletierten kirAVI-Gen auf dem PKS/NRPS-System zu finden ist. Unsicher ist, ob der putative Vorläufer **67** am PKS-Multienzym-Komplex gebunden bleibt oder abgelöst werden kann. Seine Struktur kann leider nicht völlig eindeutig vorhergesagt werden, da diese durch mögliche Tailoring-

Reaktionen variiert werden kann. Nach Ablösung vom PKS/NRPS-System könnte **67** Reduktions-, Methylierungs- und Oxygenierungsreaktionen unterworfen werden, die durch die putativen Enzyme KirM, KirOI, KirOII oder noch nicht spezifizierte Enzyme katalysiert werden.

Folgende Abbildung zeigt einen kleinen Ausschnitt der möglichen Kirromycin-Vorläufer, die aufbauend auf der Struktur von **24** und den postulierten Post-PKS-Reaktionen abgeleitet werden können. Die Graphik zeigt als erstes das Präkirromycin **67**, welches durch wässrige Thiolyse von PKS/NRPS-System entstehen könnte. Ausgehend von den genannten Tailoring-Reaktionen ist es jedoch, möglich Strukturvorschläge aufzustellen, in denen die putativen Post-PKS-Reaktionen in unterschiedlichem Umfang angewendet werden. Diese Variationen seien im Folgenden erläutert.

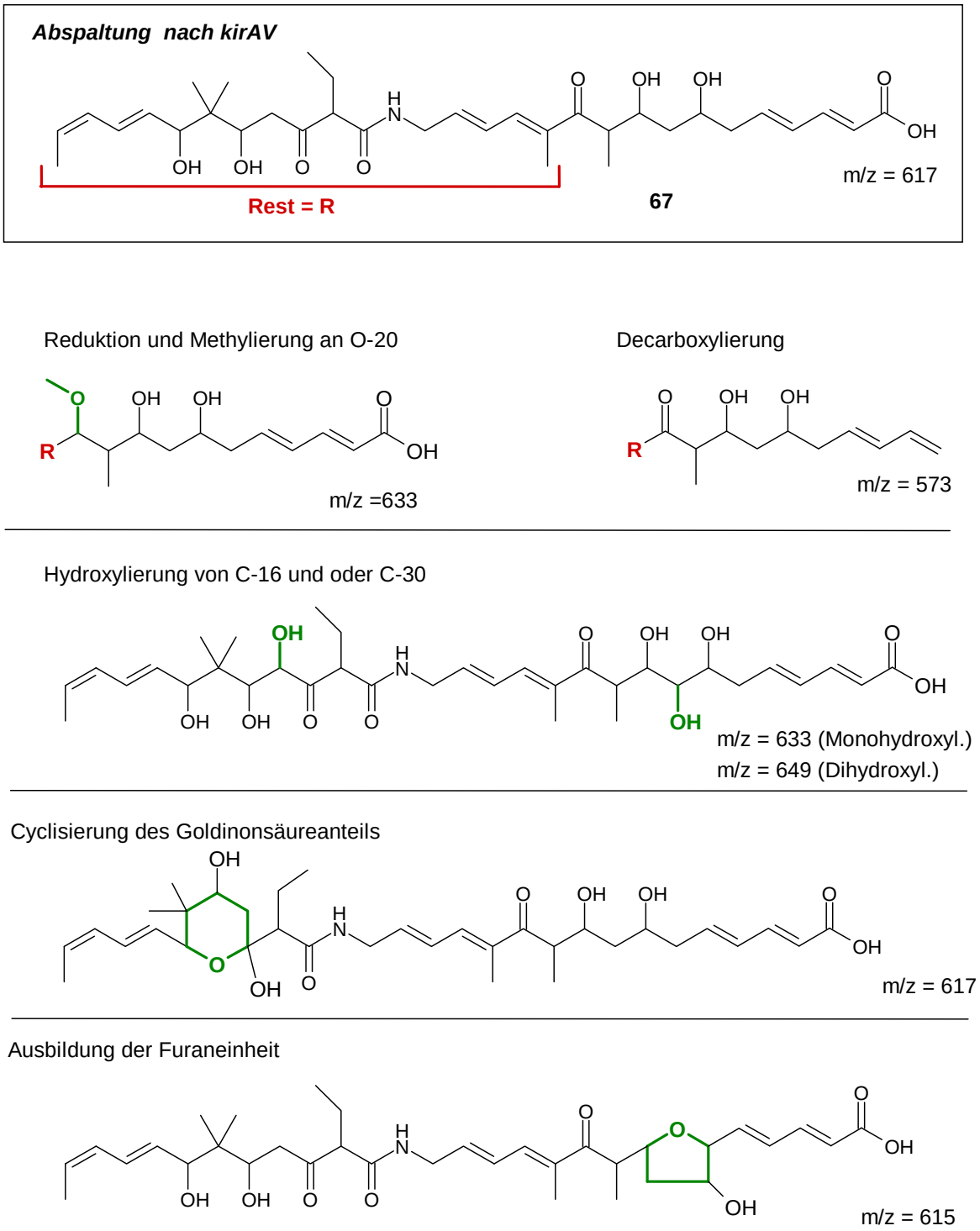


Abbildung 73: Auswahl möglicher Strukturen des Kirromycin-Vorläufers 67 aus der Mutante kirAVI::thio.

Eine wahrscheinliche Struktur von **67** ist jene, die durch wässrige Thiolyse von dem PKS/NRPS-Systems nach dem Genabschnitt kirAV entstehen könnte. Dieses Präkirromycin **67** kann spontan decarboxylieren oder aber noch weiteren Tailoring-Reaktionen unterliegen, die höchstwahrscheinlich nach der Freisetzung des Präkirromycins stattfinden. Im Rahmen

der Biosynthesehypothese wird davon ausgegangen, dass der freigesetzte Vorläufer von Kirromycin eine Reduktion und anschließende Methylierung der Carbonylfunktion an C-20 erfährt, die durch eine noch nicht identifizierte Reduktase und die putative Methyltransferase KirM katalysiert werden könnte. Ebenso werden Oxygenierungsreaktionen an den Kohlenstoffatomen C-16 und C-30 postuliert, die durch die von kirOI und kirOII kodierten Cytochrom-P450-Oxygenasen katalysiert werden.[165] Die Ausbildung der Goldinonsäure und die Cyclisierung zum Tetrahydropyranring könnten entweder bereits gebunden am PKS/NRPS-System spontan ablaufen oder durch eine der eben erwähnten Tailoring-Reaktionen vermittelt werden. Abbildung 73 stellt die hier beschriebenen möglichen Reaktionen als Strukturvorschläge dar, dabei kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass die potentielle Struktur von **67** mehrere dieser Reaktionen durchlaufen hat und somit eine Kombination aus den oben abgebildeten Strukturen darstellt.

Das Metabolitenspektrum des ersten Screening-Experiments gab keine eindeutigen Hinweise auf neue Sekundärstoffe, die Ähnlichkeit zu dem postulierten Strukturen von **67** zeigen. Auf Grund des im Gegensatz zum Wildtyp-Stamm eher geringen Wachstums, sollte diese Mutante unter Verwendung verschiedener Nährmedien kultiviert und auf ihr Metabolitenspektrum untersucht werden.

Nährmedienvariationen:

Die Vorkulturen wurden in 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen angesetzt, die mit 150 mL KP-Medium befüllt und nach Sterilisation mit 75 µL thio^{50}-DMSO-Antibiotikum-Stammlösung und einem 1 cm^2 großen Stück einer gut bewachsenen Agarplatte versehen wurden. Die Fermentation erfolgte für 48 h bei 30 °C und 180 rpm.

Für die Hauptkulturen wurden sechs 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen mit 150 mL Nährmedium (KP-Medium, Medium S und M2Ca-Medium, zwei Kolben pro Nährmedium) befüllt. Nach Sterilisation wurde mit 7.5 mL der Vorkultur angeimpft, und 75µL der Thiostrepton-Stammlösung wurden unter sterilen Bedingungen hinzugegeben. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte für 72 h bei 30 °C und 180 rpm.

Die Kulturbrühe wurden mit 0.5 M HCl auf pH = 5 gebracht und unter Celite-Zusatz filtriert.

Die Mycelien wurde verworfen, da ihre Methanol-Extrakte nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle keine neuen interessanten Metaboliten zeigten. Die Kulturfiltrate wurden mit Ethylacetat extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die erhaltenen Rohprodukte wurden über Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (c = 4 mg/mL, $CHCl_3$/MeOH 85:15) und über HPLC-gekoppelte Massenspektrometrie (c = 4 mg/mL, Säule 2, Programm 2) analysiert.

Das beste Wachstum des genetisch veränderten Stammes zeigte sich im KP-Medium gefolgt vom M2Ca-Medium und Medium S, in denen die Mutante ungefähr gleich gut wuchs. Die DC- und HPLC-Analyse aller Kulturen zeigte immer noch eine sehr geringe Metabolitenproduktion, die die Identifikation eines putativen Vorläufers von **24** nicht erlaubte.

Als weitere Variationen wurden die Vorkulturen in S-Medium und die Hauptkulturen in 1 L Erlenmeyerkolben mit 200 mL Medium S fermentiert. Auch dieses führte in Bezug auf das Metabolitenspektrum zu keinen neuen Erkenntnissen. Ein „scale-up"-Experiment mit einer Hauptkultur von 2 L unter den gleichen Bedingungen führte in der DC-Kontrolle ebenfalls zu keinem klar erkennbaren neuen Metaboliten. Die HPLC-Analyse lieferte Hinweise darauf, dass neue Metaboliten produziert wurden, die jedoch in äußerst geringer Menge vorlagen und nicht reproduzierbar den möglichen Kirromycin-Analoga zugeordnet werden konnten. Diese Mutante wurde aus weiteren chemischen Arbeiten ausgeschlossen, da bei ihr die Wahrscheinlichkeit, das das gebildete Präkirromycin **67** am PKS/NRPS-Multienzym-Komplex gebunden bleibt. Zukünftige genetische Arbeiten könnten durch den Einbau einer Thioesterase am Ende kirAV-Genabschnittes dieses Problem lösen.

6.5.2.2 Der Mutanten-Stamm TL-kirB-1

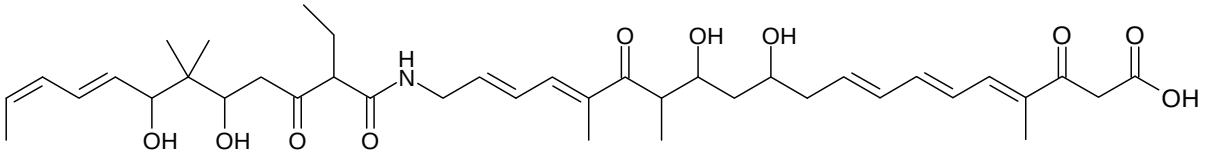
Entsprechend der hypothetischen Biosynthese von Kirromycin (**24**) kodiert das *Gen kirB* für eine nicht-ribosomale Peptidsynthase, welche die Kondensationsreaktion der Polyketidkette mit β-Alanin katalysiert. Die Freisetzung des Präkirromycins könnte anschließend durch eine intramolekulare Cyclisierung erfolgen (siehe Abbildung 68).[165] Im Arbeitskreis von T. WEBER gelang es T. LAIPLE eine Deletionsmutante TL-kirB-1 durch Austausch des kirB-Genabschnittes mit einer Resistenzkassette zu erzeugen, die bei ersten Untersuchungen keine Produktion von Kirromycin (**24**) zeigte (siehe 6.5.1).[53]

Theoretischen Überlegungen

Betrachtet man die vorgeschlagene Biosynthese von Kirromycin (**24**), so müsste die *kirB*-Knock-out-Mutante von *S. collinus* Tü 365 dazu befähigt sein, ein Kirromycin-Derivat ohne Alanin-Baustein zu produzieren. Das Kirromycin-Grundgerüst müsste durch die Enzyme KirAI bis KirAVI entsprechend der Biosynthesehypothese aufgebaut werden. Der letzte Schritt, die Kondensation von β-Alanin dürfte jedoch nicht stattfinden (siehe Abbildung 68, II)).[165]. Somit kann man ein Präkirromycin erwarten, welches um die entsprechende C_3-Einheit kürzer ist und nur ein Stickstoffatom enthält. Auch bei dieser Inaktivierungsmutation

kann die Struktur des Vorläufers **68** nicht eindeutig vorhergesagt werden, da dieser ebenso möglichen Oxidations-, Reduktions- oder Methylierungsschritten unterliegen könnte. Die putative Struktur müsste im Vergleich zu der kirAVI-Deletionsmutante um eine Propionat- und eine Acetateinheit erweitert sein (siehe Abbildung 73), aber auch bei dieser Mutante sind die bereits für kirAVI::thio beschriebenen Post-PKS-Modifikationen denkbar.

Abspaltung nach kirAVI



68 m/z = 699

Abbildung 74: Putative Struktur des Kirromycin-Vorläufers 68 nach Hydrolyse vom PKS-System aus der Mutante TL-kirB-1.

Die Knock-out-Mutante TL-kirB-1 zeigte nur ein mäßiges Wachstum sowie eine nur schwach ausgebildete Sekundärstoffproduktion. Dem entsprechend wurden analog zur kirAVI-Deletionsmutante (siehe 6.5.2.1) Nährmedienvariationen und „scale-up"-Versuche durchgeführt, um die Produktion des putativen Vorläufers **68** anzuregen und somit eine Isolierung und Strukturaufklärung von **68** zu ermöglichen.
Bei diesem genetisch veränderten Stamm konnten bisher keine neuen Metaboliten identifiziert oder isoliert werden. Auch bei dieser Mutante sollte die Einführung einer Thioesterase am Ende des kirAVI-Genabschnittes das Problem, dass der Kirromycin-Vorläufer höchstwahrscheinlich am PKS/NRPS-Multienzym-Komplex gebunden bleibt, lösen können.

6.5.2.3 Der Mutanten-Stamm TL-kirOI::thio

Im Rahmen der Biosynthesehypothese von Kirromycin (**24**) wird davon ausgegangen, dass die von dem Genababschnitt kirOI kodierte, putative Cytochrom-P450-Oxygenase die Hydroxylierung der Kohlenstoffatome C-16 und/oder C-30 katalysiert. Um die Beteiligung von KirOI an der Biosynthese von **24** aufzuklären, wurde das entsprechende Gen durch den Austausch mit einer Thiostrepton-Resistenzkassette von T. LAIPLE im Arbeitskreis von T. WEBER inaktiviert.[53] HPLC-ESI-MS-Analysen der aus Tübingen und durch eigene

Kultivierungen erhaltenen Extrakte dieser Deletionsmutante (TL-kirOI::thio) wiesen eindeutig nach, dass kein Kirromycin (**24**) erzeugt wurde. Ebenso konnte T. LAIPLE die Komplementation der TL-kirOI::thio-Mutante durch das Einbringen des nativen kirOI-Gens erfolgreich erreichen.[53] Die Analyse der aus eigenen Kultivierungen erhaltenen Extrakte zeigte eindeutig, dass nach der Komplementation wieder eine Produktion von **24** stattfand. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der Ausfall der Kirromycin-Produktion in der TL-kirOI::thio-Mutante eindeutig auf die Inaktivierung von kirOI zurückzuführen ist.

Theoretische Überlegungen

Die Mutante TL-kirOI::thio sollte in der Lage sein, alle PKS- und NRPS-vermittelten Elongationsreaktionen durchzuführen, da hier nur der Genabschnitt kirOI, der ein Post-PKS-Enzym kodiert, deletiert wurde. Da bisher über die genaue Beteiligung der von kirOI kodierten Oxygenase nur Vermutungen angestellt werden können, ist auch hier die direkte Vorhersage eines potentiellen Kirromycin-Vorläufers (**69**) nicht möglich. Zu beachten ist, dass die noch vorhandene KirOII-Oxygenase Oxygenierungen durchführen könnte.

Die KirOI-Deletionsmutante könnte folgende Oxygenierungsreaktionen nicht mehr ausführen:

a) Die Oxygenierung des Kohlenstoffatoms C-30. b) Die Reduktion durch eine putative Reduktase und anschließende Methylierungsreaktion der Carbonylfunktion durch KirM an Kohlenstoffatom C-20 könnte nicht mehr stattfinden. c) Es kann nicht vorhergesagt werden, ob die Cyclisierungsreaktionen zur Goldinonsäure- und Tetrahydropyraneinheit in dieser Mutante spontan oder mittels Enzymaktivität stattfinden (siehe Abbildung 68).[165] d) Der vorletzte Strukturvorschlag (siehe Abbildung 75) bezieht sich auf die hypothetische Ausbildung des Furanringes, wobei davon ausgegangen wird, dass sie über Dehydratisierung und anschließende Epoxidierung stattfindet. e) Als letzte Möglichkeit ist die Oxidation des zum Pyridonring zu nennen, die bei dieser Mutante nicht durchgeführt werden könnte.

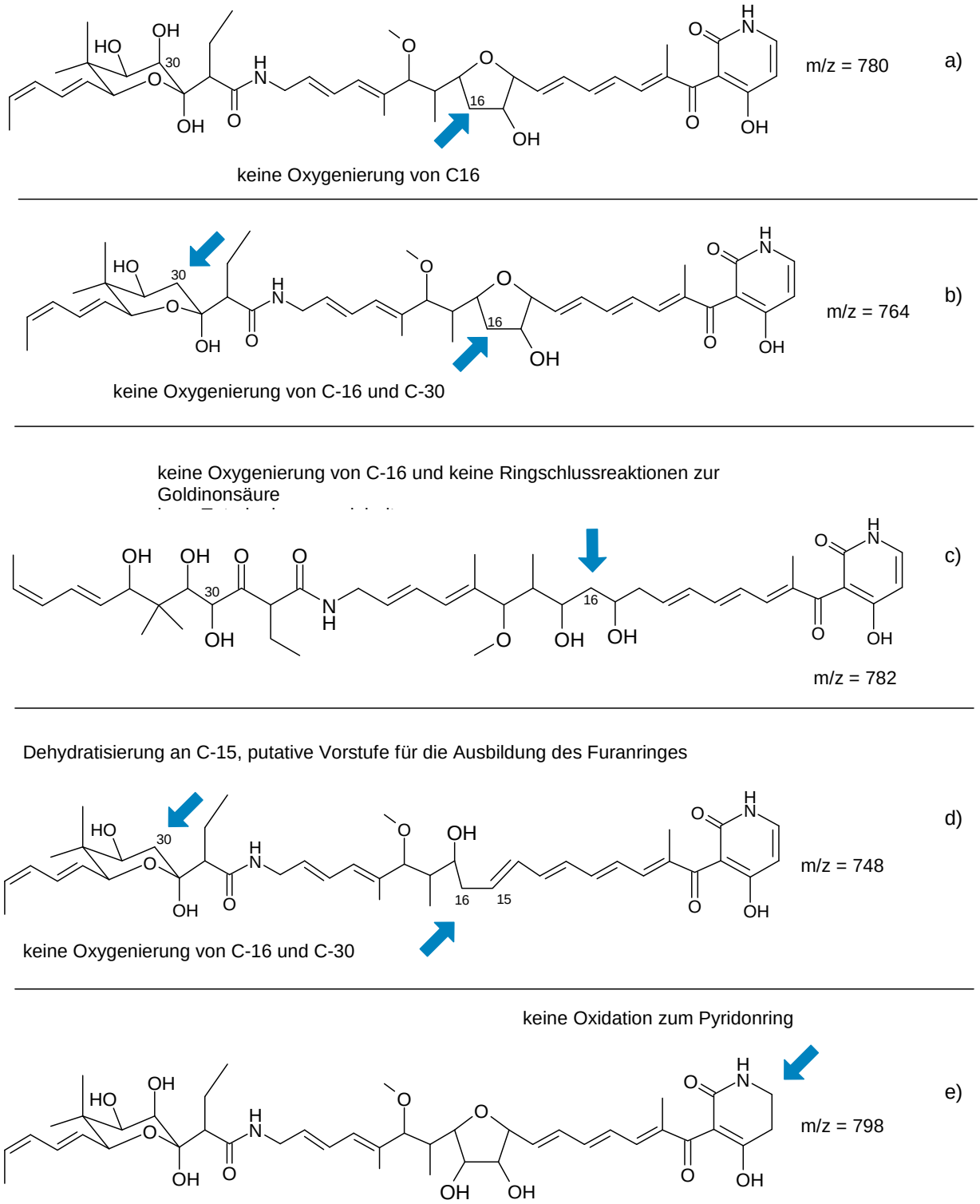


Abbildung 75: Auswahl möglicher Strukturen des Kirromycin-Vorläufers 69 aus der Mutante TL-kirOI::thio.

Auch bei diesem genetisch modifizierten Stamm wurde die bereits bei 6.5.2.1 beschriebene Variationen der Fermentationbedingungen durchgeführt. Auf Grund der Tatsache, dass die Extrakte dieser Deletionsmutante in der HPLC-ESI-MS-Analyse interessante Metaboliten in

äußerst geringen Mengen zeigte, wurde eine weitere Kultivierungsvariation im größeren Maßstab durchgeführt. Ziel war es, die Produktion eines möglichen Vorläufers von Kirromycin **69** zu stimulieren. Im Rahmen ihrer Dissertation fand T. LAIPLE nämlich heraus, dass die Produktion von Kirromycin (**24**) nach Zugabe von β-Alanin stark anstieg.[53] Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen des Kultivierungsansatzes mit Zugabe von [U-$^{13}C_3{}^{15}N$]β-Alanin, die bestätigten, dass β-Alanin ein wichtiger Vorläufer innerhalb der Biosynthese von Kirromycin (**24**) ist.

Fütterungsexperiment mit möglichen Promotoren

Ziel dieser Kultivierungsvariation war die Steigerung der Metabolitenproduktion der Deletionsmutante TL-kirOI::thio. Dazu wurden β-Alanin, Malonsäure und DMSO den Kultivierungen des Mutanten-Stammes beigefügt. Die Zugabe von DMSO sollte hierbei eine Stressreaktion auslösen, da es die Zellwände perforiert und somit eine Produktionssteigerung induzieren könnte und die entprechenden Vorläufer besser in die Zellen gelangen könnten. Die Metabolitenproduktion sollte durch Zugabe des direkten Vorläufers β-Alanin gefördert werden.[53] Malonsäure, eine Alternative zum Vorläufer Acetat, [99] sollte auch einen stimulierenden Effekt auf die Produktion neuer Sekundärstoffe ausüben.

1 L Erlenmeyerkolben wurden mit 150 mL KP-Medium befüllt, sterilisiert, mit 150 µL thio^{50}-DMSO-Stammlösung versetzt und mit 1 mL einer Glycerin-Einlagerung des genetisch veränderten Stammes beimpft. Die Vorkulturen fermentierten für 72 h bei 30 °C und 180 rpm. Für die Hauptkulturen wurden 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen und Metallspiralen (für eine bessere Luftzufuhr) mit 150 mL KP-Medium befüllt und nach Sterilisation mit 7.5 mL der Vorkulturlösung beimpft. Zu je vier Kolben wurde die gleiche Substanz zugefüttert. Die Zusätze β-Alanin (6 mmol/L; Endkonz. in Kolben), Malonsäure (pH =6.8-7.1; 6 mmol/L; Endkonz. in Kolben) und DMSO (6 mmol/L; Endkonz. in Kolben) wurden mittels des „pulse-feeding“-Verfahren in drei Schritten nach der Inkubation (12 h, 24 h und 48 h) steril beigefügt. Die Fermentation der Hauptkultur erfolgte für 72 h bei 30 °C und 180 rpm.

Zur Aufarbeitung wurden die Kulturbrühen auf pH = 5 eingestellt und über Celite filtriert. Die Mycelien wurden, nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle verworfen, da sie keine neuen Metaboliten zeigten. Die Kulturfiltrate wurden dreimal mit 600 mL Ethylacetat extrahiert und die organische Phase im Vakuum eingeengt. Die erhaltenen Rohprodukte wurden über Dünnschichtchromatographie an Kieselgel (c = 4 mg/mL, $CHCl_3$/MeOH 85:15) und über HPLC-gekoppelte Massenspektrometrie (c = 4mg/mL, Säule 2, Programm 2)

analysiert.

Die Analyse der LC-MS-Chromatogramme zeigte eindeutig die Produktion neuer Metaboliten bei den Fütterungsexperimenten mit β-Alanin und Malonsäure. Die Auswertung des Fütterungsexperiments mit DMSO zeigte keine Veränderung des Metabolitenspektrums.

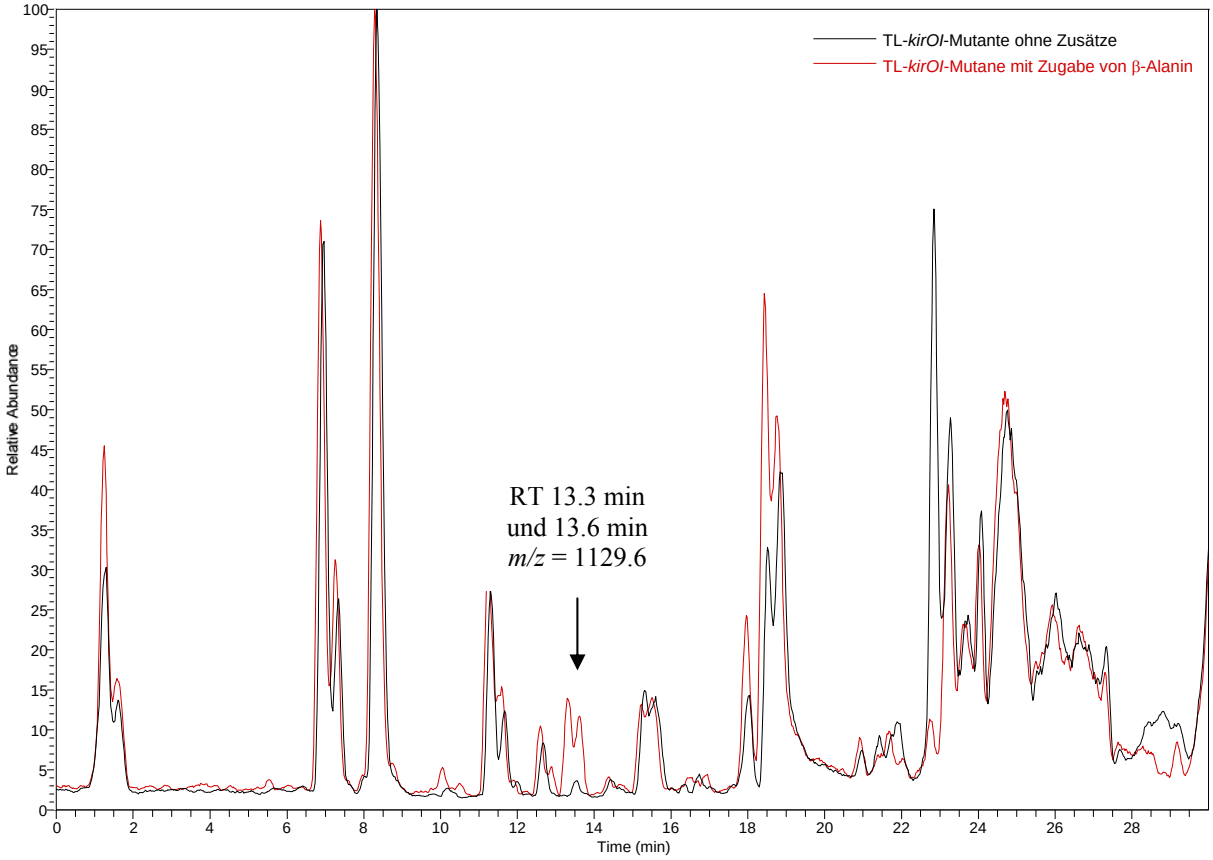


Abbildung 76: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm der Rohextrakte der Kultivierung von TL-kirOI::thio mit (rot) und ohne (schwarz) Zugabe von β-Alanin. Überlagerung der Massenchromatogramme aller detektierbaren Massen. Für die durch β-Alanin-Zugabe induzierten Sekundärstoffe ist der *m/z*-Wert aus dem ESI-Spektrum (positiver Modus) bei den entsprechenden Retentionszeiten angegeben.

Der Kultivierungsansatz der Deletionsmutante unter Zugabe von β-Alanin hatte eindeutig die Produktion neuer Sekundärmetaboliten angeregt (siehe Abbildung 76). Die über LC-MS-Analyse detektierten Massensignale mit den Retentionszeiten von 13.3 min und 13.6 min zeigten annährend identische ESI-Spektren (positiver Modus). Beide Substanzen zeigen in den dazugehörigen UV-Spektren keine unterschiedlich charakteristischen Absorptionsmaxima, wodurch es nicht möglich ist vorherzusagen, ob es sich um tautomere Formen oder um andere Regioisomere handelt. Die detektierten Massenpeaks stimmen mit keiner der in Abbildung 75 angegebenen hypothetischen Präkirromycin-Strukturen überein,

so dass es bisher nicht möglich ist einen Vorschlag zur Identität dieser Sekundärstoffe zu machen.

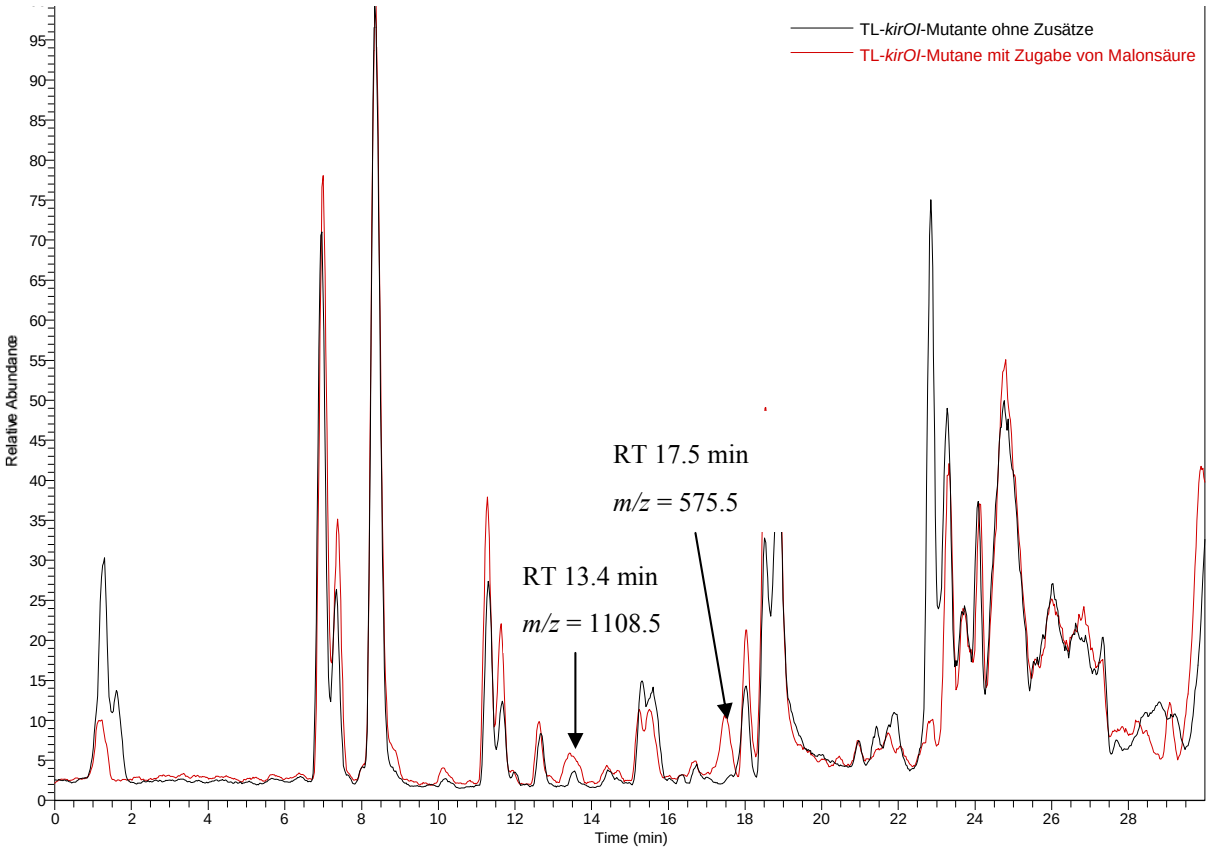


Abbildung 77: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm der Rohextrakte der Kultivierung von TL-kirOI::thio mit (rot) und ohne (schwarz) Zugabe von Malonsäure. Überlagerung der Massenchromatogramme aller detektierbaren Massen. Für die durch Malonsäure-Zugabe induzierten Sekundärstoffe ist der *m/z*-Wert aus dem ESI-Spektrum (positiver Modus) bei den entsprechenden Retentionszeiten angegeben.

Das Fütterungsexperiment mit der Mutante TL-kirOI und Malonsäure induzierte ebenfalls eine eindeutige Produktion neuer Sekundärmetaboliten (siehe Abbildung 77). Das mittels LC-MS-Analyse detektierte Massensignal mit der Retentionszeit von 13.4 min zeigte im ESI-MS-Spektrum im positiven Modus einen Massenpeak bei *m/z* = 1108.5. Bei 17.5 min konnte ein Massenpeak mit *m/z* = 575.5 detektiert werden. Auch zu diesen beiden Signalen konnten bisher weder UV-Spektren noch eine Übereinstimmung mit den postulierten Strukturen gefunden werden.

Wie in Abbildung 78 gezeigt, konnte durch Zugabe von DMSO während der Kultivierung von TL-kirOI::thio kaum eine Veränderung des Metabolitenspektrums induziert werden. Es ist lediglich eine leichte Variation der relativen Konzentrationen einzelner Sekundärstoffe zu

verzeichnen. Somit scheint es, dass die Zugabe von DMSO keinen Einfluss auf die Metabolitenproduktion der TL-kirOI-Deletionsmutante hat. Trotzdem sollten weitere Kultivierungsansätze mit höheren Konzentrationen an DMSO durchgeführt werden, um das bisherige Ergebnis zu überprüfen.

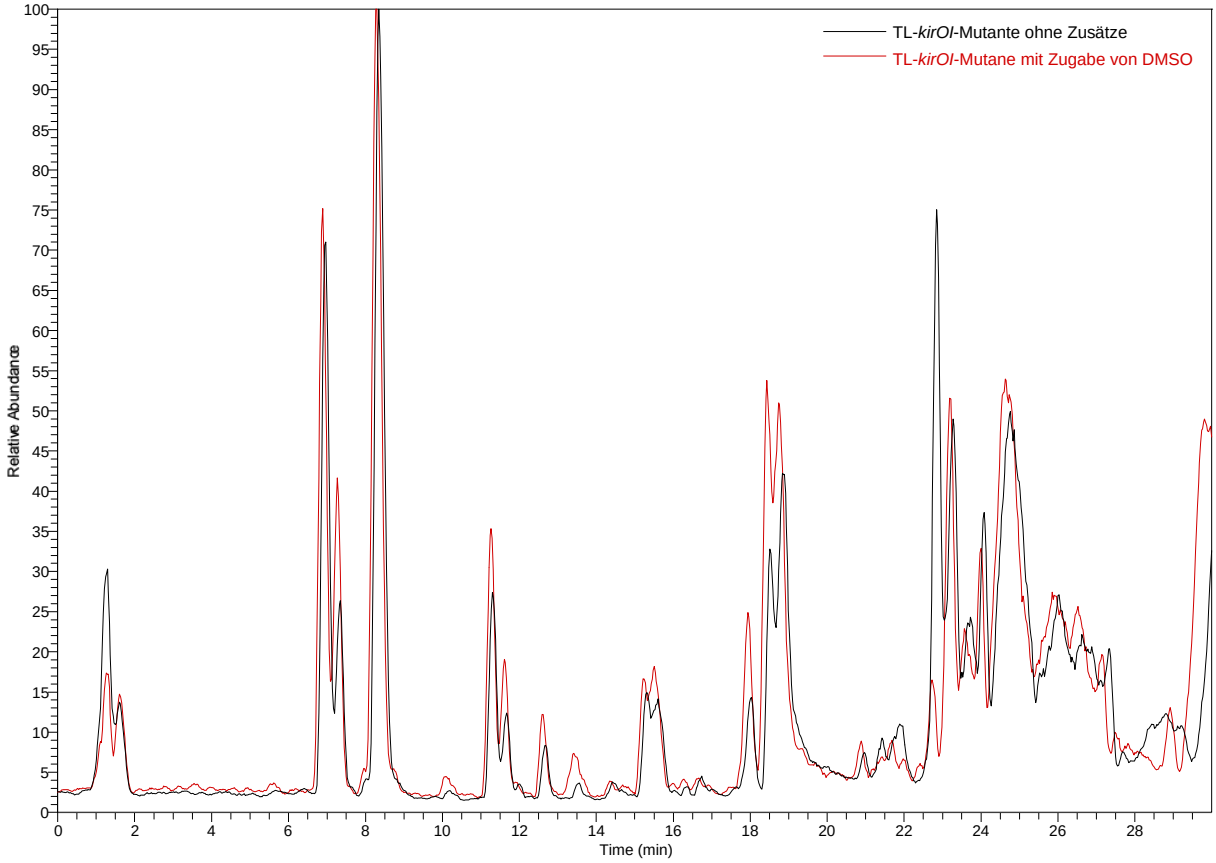


Abbildung 78: HPLC-ESI-MS-Chromatogramm der Rohextrakte der Kultivierung von TL-kirOI::thio mit (rot) und ohne (schwarz) Zugabe von DMSO. Überlagerung der Massenchromatogramme aller detektierbaren Massen.

6.6 Ausblick und Diskussion

Kirromycin (**24**), ein wichtiger Vertreter der Gruppe der Elfamycine, ist auf Grund seines bemerkenswerten Wirkmechanismus bezüglich der Inhibition der Proteinbiosynthese und wegen seiner interessanten strukturellen Merkmale ein viel versprechendes Forschungsobjekt. Seine einzigartige Struktur weist auf die Beteiligung komplexer biosynthetischer Wege hin. Die Analyse des Kirromycin-Biosynthese-Genclusters deutet auf ein exklusives, hybrides PKS/NRPS-System hin, welches sowohl „*cis*"- als auch „*trans*"-AT-Polyketidsynthasen in sich vereint. Der Cluster weist zusätzlich auf weitere Variationen klassischer PKS-Domänen und auf das Vorhandensein interner Methyltransferasen hin, die durch weitere genetische Arbeiten noch zu analysieren sind.

Das auf Grund genetischer Vorarbeiten durchgeführte Fütterungsexperiment mit [U-$^{13}C_3{}^{15}N$]β-Alanin konnte eindeutig zeigen, dass β-Alanin ein essentieller Vorläufer von **24** ist. Dieser direkte Nachweis einer Beteiligung von β-Alanin an der Biosynthese ist für die Elfamycine bisher einzigartig. Ebenso zeigte das Fütterungsexperiment mit [1-^{13}C]Acetat, dass die Biosynthese von **24** und Aurodox (**53**) bedeutende Abweichungen aufweisen, die auf unterschiedliche Biosynthesewege zurückzuführen sind. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Fütterungsexperimente an Aurodox (**53**) von LIU et al., konnte ein signifikanter Einbau von [1-^{13}C]Acetat in die Kohlenstoffatome C-7, C-27 und C-44 und C-2 erhalten werden.[116, 160] Weitere Fütterungsexperimente mit ^{13}C-markierten Butyrat und Propionat konnten wichtige zusätzliche Informationen liefern, um dieses bisherige Ergebnis zu bestätigen. Es wurde eine erfolgreiche Methylierungsreaktion von **24** durchgeführt, die durch HPLC-ESI-MS-Analyse eindeutig auf die Bildung eines Methyl- und Dimethylderivats (**65** und **66**), hindeutete. Um eine Erleichterung der ^{13}C-NMR-Analyse zu ereichen, die augrund starker Linienverbreiterung durch tautomere Effekte erschwert wird, sollten weitere Derivatisierungsreaktionen durchgeführt werden, die eine selektive Herstellung des *N*-Methylderivates von **24** zum Ziel haben.

Eigene Kultivierungsansätze und chemische Analysen konnten eindeutig beweisen, dass die von T. LAIPLE hergestellten Deletionsmutanten kein Kirromycin (**24**) produzieren. Ein zusätzlicher Kultivierungsansatz der von T. LAIPLE erzeugten Komplementationsmutante von TL-kirOI::thio sowie die Analyse der erhaltenen Extrakte mittels LC-MS konnte die Produktion von Kirromycin (**24**) eindeutig belegen, was eine essentielle Beteiligung von

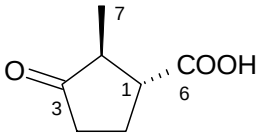
KirOI an der Kirromycin-Biosynthese bestätigt.[165] Die bisherigen Analysen der Extrakte von den aus der Kooperation mit W. WOHLLEBEN und T. WEBER stammenden Deletionsmutanten führten bisher zu keinen eindeutigen Vorläufern von Kirromycin (**24**). Auf Grund des allgemein mäßigen Wachstums und damit einhergehender schwacher Produktion von Sekundärmetaboliten in den beschriebenen Medien, sollten weitere Kultivierungsvariationen durchgeführt werden. Dabei versprechen kommende Arbeiten mit der Mutante TL-kirOI::thio den meisten Erfolg, da bei dieser Mutante auf Grund der genetischen Vorarbeiten nicht die Gefahr besteht, dass der potentielle Kirromycin-Vorläufer an PKS/NRPS-System gebunden bleibt. Erste Fütterungsversuche mit möglichen Promotoren oder Stressinduktoren weisen auf Möglichkeiten für eine Steigerung der Sekundärstoffproduktion hin. Somit sollten weitere Fütterungsexperimente durchgeführt und der Kultivierungsansatz unter Zugabe von DMSO mit höheren Konzentrationen durchgeführt werden. Laufende Arbeiten zeigen hierbei viel versprechende Ansätze. Ein Kultivierungsexperiment mit dem Wildtyp Tü 365 unter Zufütterung des Oxidationshemmers Ancymidol (**17**) soll neue Erkenntnisse bezüglich der Struktur des putativen Präkirromycins (**71**) liefern. Die Rohextrakte aus den jüngsten Kultivierungsansätzen mit der Deletionsmutante TL-*kirOI*::thio zeigen in der LC-MS-Analyse ein interessantes Metabolitenmuster, das noch vollständig interpretiert werden muss, aber viel versprechend scheint.

Die mit molekularbiologischen Methoden gezielt hergestellten Mutanten haben die Erwartungen nicht erfüllt. Sie zeigten sich nicht als Produzenten von reizvollen Kirromycin-Analoga. Die putativen offenkettigen, kürzeren Präkirromycine und nicht-oxidierte Kirromycin-Derivate konnten nicht mit den heutigen „state-of-the-art“ chemisch-analytischen Methoden nachgewiesen werden. Im interdisziplinären Forschungsverbund müssen hier zukünftig Lösungen gefunden werden, die höhere Produktionsraten oder bessere Expression, bessere Ausschleusung der Metaboliten und das Problem des Transports über die Zellmembran adressieren und letztendlich lösen.

7 Zusammenfassung der Ergebnisse

7.1 *Streptomyces* sp. Tü 6077 − Spirodionsäure (23)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte das bestehende Metabolitenspektrum des Stammes *Streptomyces* Tü 6077 um einen weiteren, für die Aufklärung der Biosynthese von **23** entscheidenden Sekundärstoffes erweitert werden. Dihydrosarkomycin (**30**) konnte erstmalig aus dem Stamm Tü 6077 in Ausbeuten von 10-14 mg/L isoliert werden.



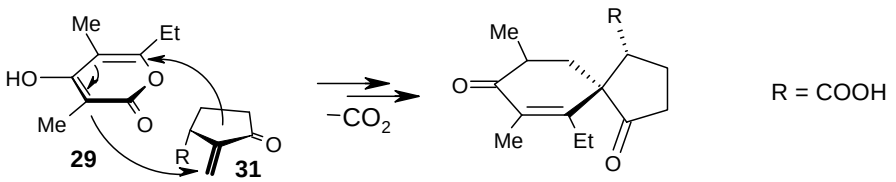
Dihydrosarkomycin (**30**)

Dieser Metabolit sowie sein instabiles Analogon Sarkomycin (**31**), welches als Antitumormittel Verwendung fand, wurden bereits aus *Streptomyces erythrochromogenes* isoliert.[70, 71] Es konnte gezeigt werden, dass Sarkomycin (**31**) unverzichtbare Informationen für die Biosynthese von Spirodionsäure (**23**) lieferte.

Im Rahmen der Biosynthesestudien an Spirodionsäure (**23**) konnte durch Variationen der Nährmedienzusammensetzung, des Kulturvolumens, der Kultivierungsgefäße, der Durchmischungsart, der Fermentationslänge und der Kultivierungsdauer die optimalen Fermentationsbedingungen für eine ausreichend hohe Produktion von **23** durch den Stamm Tü 6077 ermittelt werden. Für die Vorkulturen erwiesen sich 100 mL Medium S in 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikane, die für 48 h bei 120 spm auf einen Längsschüttler inkubiert wurden als optimal für die Produktion von **23**. Die beste Ausbeute an **23** zeigte sich im Biostat-B Fermenter, wobei hier zu 2 L Medium S zwischen der neunten und zehnten Fermentationsstunde α-Ketoglutarat (1 g/L) zur Förderung der Spirodionsäure-Biosynthese zugegeben wurde. Eine optimale Produktion im Fermenter wird erreicht, wenn die Kultivierung über einen Zeitraum von 96 Stunden bei 28 °C, 500 rpm und einer Luftzufuhr von 4 vvm durchgeführt wird. Diese detaillierten, mikrobiologischen Arbeiten machten die folgenden Biosynthesestudien überhaupt erst möglich.

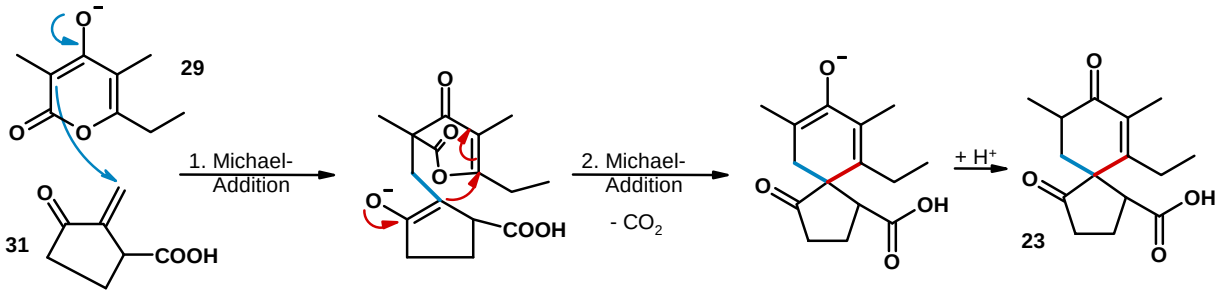
Auf Grund dieser Variationen konnte die maximale Ausbeute von Spirodionsäure von ca. 1 mg/L auf 15 mg/L erhöht werden. Innerhalb dieser Studien konnte auch die essentielle Bedeutung des Nährmedienbestandteils Glycerin für die Produktion von **23** durch verschiedene Kultivierungsansätze nachgewiesen werden. Ebenso konnten Analysen des pH-Verlaufs relevante Hinweise bezüglich der Produktion von **23** liefern. Dieser Parameter konnte nun als entscheidendes Werkzeug für die Abschätzung der Produktion von **23** bereits während der Kultivierung des Stammes Tü 6077genutzt werden.

Im Rahmen der Biosynthesestudien an Spirodionsäure (**23**) konnten hier Fütterungsexperimente mit markierten Vorläufern erfolgreich durchgeführt werden. Die Zufütterung von [2-^{13}C]Malonat führte zu signifikanten Anreicherungen in **23**. Der Kultivierungsansatz mit Zufütterung von [U-$^{13}C_3$]Glycerin in Form eines „separated-cell"-Experimentes führte zu einem erfolgreichen Einbau in **23**, **29** und außerdem auch **30**, und lieferte bedeutende Hinweise bezüglich ihrer Biosynthese. Es wurde eine schlüssige Biosynthesehypothese von **23** aufgestellt, die durch diese Fütterungsexperimente belegt werden konnte. [64] Man konnte auf Grund der durchgeführten Fütterungsexperimente von markierten Vorläufern erstmalig für einen bakteriellen Produzenten eine intermolekulare Diels-Alder-Typ-Reaktion für die Biosynthese von **23** ableiten. Nach dieser Hypothese kommt es zu einer Cycloaddition des Dienophils **31** mit dem 2*H*-Pyron (**29**). Die Triebkraft dieser Reaktion ist Decarboxylierung des Diens **31** an dem Kohlenstoffatom C-2.



Spirodionsäure (**23**)

Die aufgestellte Biosynthesehypothese schließt außerdem die genaue Betrachtung des biosynthetischen Mechanismus ein. Neben einer eher konzertiert ablaufenden Diels-Alder-Typ-Reaktion, könnte die Addition von **29** und **31** auch als zweistufige Reaktion formuliert werden. Das umfasst die Möglichkeit einer ionischen, doppelten Michael-Addition, die zum gleichen Addukt wie eine Diels-Alder-Reaktion führt. Die letztendlich detaillierte Feststellung, ob eher konzertierte Diels-Alder-Reaktion oder ionische, zweistufige Michael-Addition stattfindet, konnte auch jüngst bei dem pilzlichen Metaboliten Makrophomsäure (**19**) nicht geklärt werden, obwohl die Röntgenstruktur des Enzyms und quantenmechanische Berechnungen vorlagen.[22, 44]



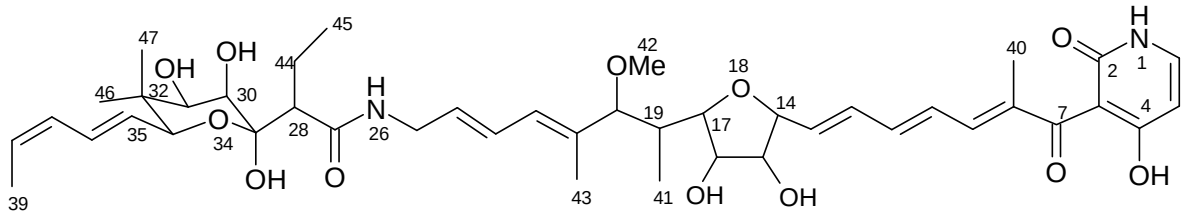
Feststeht, dass die Bildung eines einzigen Stereoisomers von **23** unter physiologischen Bedingungen und die hohe, ungezielte Reaktivität der exoständigen Doppelbindung in **31** gute Argumente für die Annahme einer enzymatischen Reaktion sind.[64] Damit wurde erstmalig ein Spiro[4.5]decan bakteriellen Ursprungs gefunden und in seiner Biosynthese untersucht. Und erstmals wurde für einen bakteriellen Naturstoff überhaupt eine intermolekulare Diels-Alder-Reaktion experimentell fundiert belegt.

Die durchgeführten Fütterungexperimente mit der Methode der Vorläufer-dirigierten Biosynthese erbrachten bisher keine biologischen Derivate von Spirodionsäure (**23**).

In Bezug auf die Klärung der absoluten Konfiguration wurde erfolgreich der *p*-Bromphenacylester (**49**) von Spirodionsäure (**23**) hergestellt, der jedoch in verschiedenen Kristallisationsansätzen keine Kristallbildung zur Folge hatte. Im Rahmen eines Kooperationsprojekt mit dem Arbeitskreis von P. von ZEZSCHWITZ konnte durch den Vergleich der spektroskopischen Daten der synthetischen, racemischen Spirodionsäure (**50**) mit denen des isolierten Naturstoffs **23** die eindeutige Bestätigung der Konstitution von **23** erhalten werden. Ebenso war es möglich die absolute Konfiguration von Spirodionsäure (**23**) zu ermitteln, indem die diastereomeren Camphersultam-Derivate **51a** und **51b** der synthetischen Spirodionsäure (**50**) mit dem Camphersultamamid nativen Ursprungs über NMR-Spektroskopie und HPLC-Analytik untersucht wurden. Dieser Vergleich führte abschließend zur Bestimmung der absoluten Stereokonfiguration von **23**, die als (1*R*,5*R*,9*S*)-6-Ethyl-7,9-dimethyl-4,8-dioxospiro[4.5]deca-6-en-1-carbonsäure zugeordnet werden konnte.[64]

7.2 Biosynthesestudien an Kirromycin (24)

Molekularbiologische Arbeiten des Arbeitskreises von T. WEBER im Rahmen des BMBF-Projektes „MetabolitGenomik-*Actinomycetes*“ identifizierten den Biosynthese-Gencluster Kirromycin (**24**).



(**24**)

Innerhalb dieser BMBF-Korporation wurden zwei Fütterungsexperimente mit markierten Vorläufern an den Produzentenstamm Tü 365 durchgeführt, mit dem Ziel die Biosynthese zweifelsfrei zu belegen. Die Ergebnisse des Kultivierungsansatzes mit Zugabe von [U-$^{13}C_3{}^{15}N$]β-Alanin konnten eindeutig zeigen, dass β-Alanin der unmittelbare Vorläufer von **24** ist und somit die auf genetischen Arbeiten basierende Hypothese erfolgreich bestätigen. Ebenso ist dieser direkte Nachweis des Vorläufers β-Alanin in Bezug auf die Biosynthesen anderer Elfamycine bisher einzigartig. Das Einbaumuster des Fütterungsexperimentes mit [1-^{13}C]Acetat wies auf eine Abweichung der Biosynthese von **24** in Bezug auf die biologische Synthese seines *N*-Methylderivates, Aurodox (**53**), hin und lässt unterschiedliche Biosynthesewege oder andere Metabolismusraten vermuten.

Chemisch-analytische Arbeiten mit den Deletionsmutanten TL-kirB-1, kirAVI::thio und TL-kirOI, die im Arbeitskreis von W. WOHLLEBEN und T. WEBER erzeugt wurden, zeigten eindeutig, dass die Produktion von Kirromycin (**24**), entsprechend der aufgestellten Hypothese, ausgefallen war. Somit konnten die Grenzen des Biosynthese-Genclusters experimentell eindeutig aufgezeigt werden. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die durch T. LAIPLE durchgeführte Komplementation mit dem nativen kirOI-Gen in die TL-kirOI::thio-Mutante erfolgreich durchgeführt worden war.[53] Die Analyse der aus eigenen Kultivierungen erhaltenen Extrakte zeigte eindeutig, dass wieder eine Produktion von **24** stattfand. Somit konnte zweifellos gezeigt werden, dass der Ausfall der Kirromycin (**24**) Produktion in der TL-kirOI::thio-Mutante auf die Inaktivierung von kirOI zurückzuführen ist.

In den bisherigen Arbeiten mit diesen Deletions-Mutationen des Kirromycin-Produzenten *S. collinus* Tü 365 unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen konnten keine putativen Vorläufer von **24** über HPLC-gekoppelte Massenspektrometrie reproduzierbar identifiziert oder in mg-Mengen präparativ isoliert werden. Jedoch weisen erste Fütterungsversuche mit verschiedenen Zusätzen als Stressinduktoren auf Möglichkeiten für eine Steigerung der Sekundärstoffproduktion hin. Sowohl die Zufütterung von β-Alanin als auch Malonsäure induzierte die Produktion neuer Sekundärstoffe. Der Kultivierungsansatz unter Zugabe von DMSO zeigte keine Produktion neuer Metaboliten. Laufende Kultivierungsarbeiten mit dem Wildtyp-Stamm Tü 365 unter Zufütterung von Ancymidol und der Deletionsmutante TL-kirOI::thio zeigen hierbei viel versprechende Ansätze, da die Analyse der erhaltenen Rohextrakte ein interessantes Signalmuster präsentierte. Zusammenfassend stellt sich das Auffinden möglicher Biosynthesevorläufer und die chemisch-präparative Reindarstellung der Produkte heutzutage noch als problematisch dar, da die Expression, Produktionsraten oder Transportsysteme der genetisch veränderten Mutanten noch hohen Optimierungsbedarf haben. Der interdisziplinäre Ansatz von molekularbiologischen und chemisch-analytischen Arbeiten hingegen hat zweifelsfrei ein detailliertes Bild der ungewöhnlichen Kirromycin-Biosynthese ergeben.

B Experimenteller Teil

8 Allgemeines

8.1 Instrumentelle Analytik

Massenspektren: EI-MS: *Finnigan* MAT 95, 70 eV, Hochauflösungen wurden mit Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz gemessen, die relativen Intensitäten beziehen sich auf das Signal höchster Intensität und sind in Klammern angegeben. **DCI-MS:** *Finnigan* MAT 95, 200 eV, Reaktandgas NH_3. **ESI-MS:** *Finnigan* LC-Q. **HR-ESI-MS:** *Bruker* Apex-Q III, Feldstärke 7 T (Tesla).

Infrarotspektren: Alle IR-Spektren wurden als KBr-Presslinge mit einem FT-IR-Spektrometer der Firma *Perkin-Elmer* Modell 1600 aufgenommen. Abkürzungen: br = breit, sh = Schulter.

UV-Vis-Spektren: *Varian* Modell Cary 3E. Alle Spektren wurden mit Methanol als Lösungsmittel aufgenommen. Die Wellenlänge λ ist in [nm] angegeben, der molare Absorptionskoeffizient ε hat die Dimension [1000 cm^2 mol^{-1}] und berechnet sich wie folgt:

$$\varepsilon = \frac{Abs \cdot M}{c \cdot d}$$

Formel 1: Formel zur Berechnung des Absorptionskoeffizienten ε.

(Abs = Absorption, M = Molmasse, c = Konzentration, d = Schichtdicke)

Bei einer Schichtdicke von d = 1 cm und einer Lösung mit dem Volumen V = 10 mL ergibt sich somit:

$$\varepsilon\,[1000\,\mathrm{cm}^2\ mol^{-1}] = \frac{Abs \cdot M\ \ [g/mol] \cdot 10}{Einwaage\ \ [mg]}$$

Formel 2: Weiterführende Formel zur Berechnung des Absorptionskoeffizienten ε.

Methanol / HCl bzw. Methanol / NaOH: Zu 2 mL methanolischer Lösung wurden jeweils ein Tropfen 1 M Salzsäure bzw. 1 M Natronlauge gegeben.

Drehwerte: Polarimeter *Perkin-Elmer* Modell 343, die Drehwerte sind in [10^{-1} deg cm^2 g^{-1}], und die Konzentration (c) in [g/ 100 mL] angegeben.

^{1}H-NMR-Spektren: *Varian* Inova-600 (600 MHz), *Varian* Inova-500 (500 MHz), *Varian* Mercury-300 (300 MHz), *Varian* Unity-300 (300 MHz). Chemische Verschiebungen in δ-Werten [ppm] relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internen Standard; Kopplungskonstanten (*J*) in Hertz [Hz]. Alle ^{1}H-NMR-Spektren wurden als Spektren erster Ordnung interpretiert, soweit Signalaufspaltungen und Kopplungskonstanten angegeben sind. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, mc = Multiplett Zentrum.

^{13}C-NMR-Spektren: *Varian* Inova-600 (150.8 MHz), *Varian* Inova-500 (125.7 MHz) ausgestattet mit *Varian* PFG Cold Probe (Heliumkühlung), *Varian* Mercury-300 (75.5 MHz), *Varian* Unity-300 (75.5 MHz). Chemische Verschiebungen in δ-Werten [ppm] relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard. Multiplizitäten wurden aus $^1J_{CH}$-Korrelationsexperimenten entnommen. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett.

2D-NMR-Spektren: ^{1}H,^{1}H-COSY (^{1}H,^{1}H-Correlated Spectroscopy), **HSQC** (Heteronuclear Singular Quantum Coherence), **HMBC** (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity), **HMQC** (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), **NOESY** (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), **TOCSY** (Total Correlation Spectroscopy).

8.2 Chromatographische Methoden

Lösungsmittel: Die Lösungsmittel für die Chromatographie wurden zuvor destilliert. Für die HPLC wurden analysenreine Lösungsmittel (*Merck*) und bidestilliertes Wasser verwendet, die zuvor im Ultraschallbad (10 min) entgast wurden.

Dünnschichtchromatographie (DC): Merck HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254}, 10 x 10 cm, Schichtdicke 0.2 mm; Merck DC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254}, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm; Merck DC-Alufolien RP-18 F_{254s}, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm.

Angegeben sind R_f-Werte (Laufhöhe relativ zur Laufmittelfront).

Ermittlung von R_f-Werten: Zur Bestimmung von R_f-Werten löste man ca. 0.5 mg der zu untersuchenden Reinsubstanz in einem entsprechenden Lösungsmittel (p.a.). Man trug auf DC-Platten auf, so dass ein Vorlauf von 5 cm eingehalten wurde. Die Gesamtlaufstrecke des Laufmittels betrug etwa 15 cm. Die Detektion erfolgte mittels der unten beschriebenen Sprühreagenzien.

Anfärbereagenzien: Nach *Merck*, Anfärbereagenzien für die Dünnschicht-chromatographie.[169] Die DC-Platten wurden nach dem Ansprühen auf ca. 120°C erwärmt.
Anisaldehyd (Nr. 21): 1.0 mL Anisaldehyd in einer Lösung aus 85 mL Methanol, 10 mL Eisessig und 5 mL konz. Schwefelsäure.
Molybdatophosphorsäure (Nr. 204): Molybdatophosphorsäure, 10%ige Lösung in Ethanol.
Orcin-Sprühreagenz (Nr. 120 - 122): 1 g Eisen-(III)-chlorid wurde in 100 mL Schwefelsäure gelöst und zu gleichen Anteilen mit einer Orcinlösung (6% in Ethanol) gemischt.

Adsorberharz: *Serva* Amberlite® XAD-16.

Säulenchromatographie und Gelchromatographie: Für Schwerkraftsäulen wurde Kieselgel 60, 0.032 – 0.0064 mm (*Macherey-Nagel*, *ICN Biomedicals GmbH*) bzw. Sephadex® LH-20 (*Sigma Aldrich*, *Pharmacia*) zur Gelchromatographie verwendet.

Mitteldruckchromatographie: Pumpe: *Knauer* Modell K1000 und *Knauer* HPLC Pumpe 64 (mit 50 mL Pumpenkopf), Säule: *Merck* Lobar®-Fertigsäule, Größe B (400 x 25 mm), Größe C (400 x 40 mm); Säulenmaterial: *Merck* LiChroprep® RP-18 (40 – 63 µm) bzw. RP-8 (40 – 63 µm).

High Performance Liquid Chromatography (HPLC):
Analytische und semipräparative HPLC mit DAD-Kopplung: Pumpe: *Jasco* Modell PU-2080 Plus (1 µL/min bis 10 mL/min), Autosampler: *Jasco* AS-2055, Detektor: *Jasco* MD-2010 Plus, Datensystem: *Jasco* Borwin® mit *Jasco* Borwin® PDA Version 1.50 (Chromatographie) und *Jasco* Borwin® HSS-2000 Version 3.5.2 (Steuerung), Mixer: *Jasco* LG-2080-02, Entgaser: *Jasco* DG-2080-53 In-line degasser, Säulenofen: *Jasco* CO-2065,

analytische 20 µL und semipräparative 500 µL Aufgabeschleife.

Analytische HPLC mit MS-Kopplung: Pumpe und Mischkammer: *Flux* Instruments Rheos 4000; Entgaser: *Flux* Instruments ERC-3415α; Autosampler: *Jasco* 851-AS mit variabler Aufgabeschleife 0 – 100 µL; PDA-Detektor: *Finnigen* Surveyor; Massendetektor: *Finnigen* LC-Q; Software HPLC: *Flux* Instruments Janeiro; Chromatographie- und Steuersoftware PDA und MS-Detektor: *Finnigan* Xcalibur® Version 1.3.

Präparative HPLC: Pumpe: *Jasco* Modell PU-1587 (1–50 mL/min), Detektor: *Jasco* Modell UV 1575, Steuersoftware: *Jasco* Borwin® HSS-200 Version 3.5.2, Chromatographiesoftware: *Jasco* Borwin® Version 1.50, Aufgabeventil: *Rheodyne*, präparative 2.0 mL Aufgabeschleife.

HPLC-Säulen:

Analytisch: Säule 1: (Standardsäule für Analytik) *Knauer* Nucleosil 100 C8, 5 µm, 250 x 3 mm, Flussrate: 0.5 mL/min. **Säule 2:** (Standardsäule für HPLC-MS): *Grom* Supersphere 100 RP-18 endcapped, 4 µm, 100 x 2 mm mit Vorsäule *Grom* Supersphere 100 RP-18 endcapped, 4 µm, 10 x 2 mm, Flussrate: 0.3 mL/min. **Säule 3:** (Standardsäule für Analytik polarer Substanzen): *Phenomenex* Aqua 5u C18, 5 µm, 250 x 2 mm, Flussrate: 0.5 mL/min.

Semipräparativ/Präparativ: Säule 4: *Jasco* Nucleosil 100 C8, 5 µm, 250 x 8 mm, Flussrate: 2.5 mL/min. **Säule 5:** *Grom* Supersphere 100 RP-18 endcapped, 4 µm, 100 x 8 mm mit Vorsäule *Grom* Supersphere 100 RP-18 endcapped, 4 µm, 10 x 2 mm, Flussrate: 2.5 mL/min. **Säule 6:** *Phenomenex* Aqua 5u C18, 5 µm, 250 x 2 mm, Flussrate: 2.5 mL/min, **Säule 7:** *Jasco* Nucleosil 100 C8, 5 µm, 250 x 20 mm, Flussrate: 18 mL/min, **Säule 8:** *Grom* Supersphere 100 RP-18 endcapped, 4 µm, 100 x 2 mm mit Vorsäule *Grom* Supersphere 100 RP-18 endcapped, 4 µm, 100 x 20 mm, Flussrate: 16 mL/min.

Gradientenprogramme und Laufmittelsysteme für die HPLC:

Programm 1: (Standardprogramm für die Analytik): Laufmittelsystem: Wasser (A) / Acetonitril (B), jeweils mit 0.05% Ameisensäure; Gradient: 20% auf 100% B in 20 min, 10 min bei 100% B, in 2 min auf 20% B, 8 min bei 20% B.

Programm 2: (Standardprogramm für die HPLC-MS): Laufmittelsystem: Wasser (A) / Methanol (B), jeweils mit 0.05% Ameisensäure; Gradient: 20% auf 100% B in 20 min, 10 min bei 100% B, in 2 min auf 20% B, 8 min bei 20% B.

Programm 3: (Aufreinigung von Spirodionsäure (**23**)): Laufmittelsystem: Wasser (A) / Acetonitril (B), jeweils mit 0.05% Ameisensäure; isokratisches Laufmittelsystem: 26% B,

UV-Detektion bei 254 nm.

Programm 4: (Aufreinigung von methyliertem Kirromycin): Laufmittelsystem: Wasser (A) / Methanol (B), jeweils mit 0.05% Ameisensäure; Gradient: 55% auf 80% B in 30 min, 10 min bei 80% B, in 3 min auf 55% B, 7 min bei 55% B, UV-Detektion bei 320 nm.

8.3 Mikrobiologische Methoden

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.[170]

8.3.1 Verschiedene Geräte

Dosierpumpe: *ISMATEC* Schlauchpumpe (0.019–1.9 mL/min)

UV-Lampe: *Schütt Labortechnik*

Ultraschallbad: *Bandelin* SONOREX RK 106S

Zentrifugen: *Eppendorf* Centrifuge 5415D, *Sigma* Labartory Centrifuge 4K15.

Feinfilter: *Sartorius* Porengröße 0.2µm.

8.3.2 Nährmedienbestandteile

Alle Nährmedien wurden durch Autoklavieren (121 °C, feuchte Hitze, 1 bar Überdruck, 30 min) sterilisiert. Der pH-Wert wurde vor Sterilisation mit 1 N oder 0.5 N HCl bzw. 1 N oder 0.5 N NaOH eingestellt. Für alle Nährmedien wurde Leitungswasser verwendet, wenn demineralisiertes Wasser benutzt wurde, wird dies gesondert angegeben. Die Zugabe der jeweiligen Antibiotika fand nach Sterilisation und Abkühlung der Medien auf ca. 40 °C statt. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 20 g/L Agar hinzugegeben und nach der Sterilisation 0.4 cm dicke Schichten in sterile Petrischalen gegossen.

Die verwendeten Nährmedienbestandteile wurden von folgenden Firmen bezogen:
Malzextrakt, Fleischextrakt (trocken), Caseinpepton, D-Glucose, Stärke (aus Kartoffeln), Mannit, Calciumcarbonat ($CaCO_3$), Calciumdichlorid ($CaCl_2$), Dikaliumsulfat (K_2SO_4), Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4), Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2SO_4), Magnesiumsulfat ($MgSO_4$) und L-Tyrosin von der Fa. *Merck*, Pepton (Soja), Leberextrakt und Magnesiumdichloridhexahydrat ($MgCl_2$ x 6 H_2O), Natriumpropionat ($NaC_3H_5O_2$) und

Biotin ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$) von der Fa. *Fluka*, Casaminoacids und Agar von der Fa. *Difco*, Glycerin von der Fa. *AppliChem*, Cornsteep Powder von der Fa. *Marcor*, Sojamehl (fettarm und vollfett) von der Fa. *Henselwerk GmbH*, Hefeextrakt von der Fa. *Gibco BRL*, L-Prolin und Arginin von der Fa. *EGA-Chemie*, Glycin und Asparagin von der Fa. *Jannsen Chimica*, Natriumchlorid (NaCl) von der Fa. *Baker*, Harnstoff (CH_4N_2O) von Fa. *Acros*, Dextrin von der Fa. *Sigma*, Na-Caseinat von der Firma *Riedel-deHaën*.

Verwendete Nährmedien:

Soja/Mannit (SM): Sojamehl (fettarm) 20 g/L, Mannit 20 g/L, pH 7.0.

SGG: D-Glucose 10 g/L, Glycerin 10 g/L, Stärke (aus Kartoffeln) 10 g/L, Cornsteep Powder 2.5 g/L, Caseinpepton 5 g/L, Hefeextrakt 2 g/L, NaCl 1 g/L, $CaCO_3$ 3 g/L, pH 7.3.

M2-Medium: Malzextrakt 10 g/L, Glucose 4 g/L, Hefeextrakt 4 g/L, pH 7.0.

M2Ca-Medium: Malzextrakt 10 g/L, Glucose 4 g/L, Hefeextrakt 4 g/L, $CaCO_3$ 0.2 g/L, pH 7.0.

Medium S (Göttingen): Stärke (aus Kartoffeln) 10 g/L, Glycerin 4 g/L, Caseinpepton 4 g/L, Hefeextrakt 0.5 g/L, Fleischextrakt (trocken) 0.5 g/L, Leberextrakt 0.5 g/L, NaCl 1 g/L, pH 7.0.

Medium S* (Göttingen): Stärke (aus Kartoffeln) 12 g/L, Glucose 2 g/L, Caseinpepton 4 g/L, Hefeextrakt 0.5 g/L, Fleischextrakt (trocken) 0.5 g/L, Leberextrakt 0.5 g/L, NaCl 1 g/L, pH 7.0.

Kirromycin-Produktionsmedium (KP): Mannit 10 g/L, Sojamehl (vollfett) 10 g/L, $CaCO_3$ 5 g/L, pH 7.4.

S-Medium (Tübingen, mod. nach OKANISHI et al.[171]): Pepton 4 g, Hefeextrakt 4 g, K_2HPO_4 4 g, KH_2PO_4 4 g in 800 mL demin. Wasser und Glucose 10 g, $MgSO_4$ 0.5 g getrennt in 200 mL demin. Wasser autoklavieren, keine pH-Einstellung.

NL 1345: Glycerin 12.5 g/L, Arginin 1 g/L, L-Tyrosin 0.5 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4$ x 7 H_2O 0.5 g/L, NaCl 0.5 g/L, Spur 11 10 mL/L, pH 7.3.

NL 1345* (Variation ohne Glycerin): Stärke (aus Kartoffeln) 10 g/L, D-Glucose 2.5 g/L, Arginin 1 g/L, L-Tyrosin 0.5 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4$ x 7 H_2O 0.5 g/L, NaCl 0.5 g/L, Spur 11 10 mL/L, pH 7.5.

NL 1153: Glycerin 12.5 g/L, Arginin 1 g/L, $MgSO_4$ x 7 H_2O 0.5 g/L, NaCl 1 g/L, Spur 11 5 mL/L, pH 7.3.

NL 1154: Na-Propionat 4 g/L, Glycerin 5 g/L Asparagin 0.1 g/L, Na-Caseinat 2 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, $MgSO_4$ x 7 H_2O 0.1 g/L, Spur 11 5 mL/L, pH 7.3.

NL 1358: D-Glucose 30 g/L, Caseinpepton 2 g/L, KH_2PO4 1 g/L, $MgSO_4$ x 7 H_2O 0.5 g/L, NaCl 0.5 g/L, Spur 11 5 mL/L, keine pH-Wert Einstellung.

NL 1161: Dextrin 10 g/L, Biotin 0.05 g/L, Harnstoff 1 g/L, KH_2PO4 0.5 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L Spur 11 5 mL/L, keine pH-Wert Einstellung.

Spurenelementlösung „Spur 11“: $CaCl_2$ x 2 H_2O 3 g/L, Fe(III)-citrat 1 g/L, $MnSO_4$ 0.2 g/L, $ZnCl_2$ 0.1 g/L, $CuSO_4$ x 5 H_2O 25 mg/L, $Na_2B_4O_7$ x 10 H_2O 20 mg/L, $CoCl_2$ 4 mg/L, Na_2MoO_4 x 2 H_2O 10 mg/L.

8.3.3 Zugefütterte Substanzen

Folgende Substanzen wurden als Vorläufer oder Zusatz in verschiedenen Fermentationen verwendet:

8.3.3.1 Stamm *Streptomyces* Tü 6077: Dinatrium-α-Ketoglutarat ($Na_2C_5H_4O_5$, Fa. *Sigma-Aldrich*), NIAX (Entschäumer), Dimethylsulfoxid (DMSO, Fa. *Riedel-deHaën*), 4-Hydroxy-6-methyl-2-pyron ($C_6H_6O_2$, Fa. *Alfa Aesar*), 2-Methyl-3,5-dioxoheptansäure ($C_8H_{12}O_4$, synthetisiert von J. SIEWERT AK v. ZEZSCHWITZ), 4-Pentinsäure ($C_5H_6O_2$, Fa. *Fluka*), Vitamin B_{12} (Fa. *Fluka*) und TWEEN 40® (Fa. *Sigma*).

8.3.3.2 Stamm *Streptomyces* collinus *kirOI*::thio: β-Alanin ($C_3H_7NO_2$, Fa. *Fluka*), Malonsäure ($C_3H_4O_4$, Fa. *Merck*) und Dimethylsulfoxid (DMSO, Fa. *Riedel-deHaën*).

Die Substanzen wurden in gelöster Form zugefüttert, wobei bei allen Lösungen ein pH-Wert von ca. pH = 6-7 eingestellt wurde. Die Herstellung der Fütterungslösungen wird in den entsprechenden Kapiteln aufgezeigt.

8.3.4 Schüttler und Fermenter

Schüttler: *Braun* Certomat®BS-1, *Braun* Certomat® RM, Schüttelbrett der Universität Göttingen.

Fermenter: *Braun* Biostat B (5 L), 10 L Airliftfermenter, gebaut: *Uni Dortmund , Fischer & Porter* Gasflowmeter (45711M), *The Analytical Development Co. Ltd.* CO_2-Analysator, *Ingold* O_2-Elektrode.

Zugabe von 1 g/L Niax bei allen Kultivierungen im Fermenter.

8.3.5 Stammhaltung und Stickstoffeinlagerungen

Langzeiterhaltung in flüssigem Stickstoff:

Von einer gut bewachsenen Agarplatte wurden mit einseitig zugeschweißten und mit einem Bleistück beschwerten sterilen Polypropylen-Halmen Agarstückchen ausgestanzt, bis der Halm gefüllt war. Der Halm wurde in einen zweiten äußeren Halm gesteckt, der an beiden Enden zugeschmolzen wurde. Mehrere Halme in einem Kryoröhrchen wurden in einem Dewargefäß in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Stammhaltung auf Agarplatten:

Gut bewachsene Agarplatten wurden mit Verschlussfolie (Parafilm® M, Fa. *Brand*) verschlossen und bei 4 °C für maximal vier Monate gelagert.

Stammhaltung als Glycerinkultur (Glycerin-Einlagerung):

Bei Kultivierung in Flüssigkultur der jeweiligen Mikroorganismen wurde ein Teil der Vorkulturen (drei Tage alt) für die Weiterverarbeitung zur Glycerinkultur verwendet. Man pipettierte ca. 0.5-0.8 mL der jeweiligen Kulturbrühe in ein 2 mL Kryoröhrchen und fügte dieselbe Menge an Glycerin (steril) hinzu. Die Suspension wurde gut durchmischt und anschließend bei -20 °C gelagert.

8.3.6 Isotopenmarkierte Verbindungen

8.3.6.1 Fermentationen des Stammes Tü 6077:

[1-^{13}C]Natriumacetat (99% isotopenmarkiert) wurde von der Firma *Campro Scientific* bezogen, [2-^{13}C]Natriumacetat (99% isotopenmarkiert) von Fa. *Deutero*, [1,2-$^{13}C_2$] Natriumacetat (99% isotopenmarkiert) von *Cambridge Isotope Lab*., [1-^{13}C]Natriumpropionat von Fa. *Cambridge Isotope Lab*., [2-^{13}C]Dinatriummalonat (98.9% isotopenmarkiert) von *Chemotrade* und [U-$^{13}C_3$]Glycerin (99% isotopenmarkiert) von der Firma *Chemotrade*.

8.3.6.2 Fermentationen des Stammes *S. collinus* Tü 365:

[1-^{13}C]Natriumacetat (90% isotopenmarkiert) wurde bei der Firma *Amersham UK* und [U-$^{13}C_3{}^{15}$N]β-Alanin (98% ^{13}C, 96–99% ^{15}N isotopenmarkiert) bei der Fa. *Deutero* bezogen.

Berechnung der ^{13}C-Anreicherung (nicht miteinander koppelnde Kerne) nach SCOTT et al.:[98]

In diesem Verfahren wird die natürliche Häufigkeit von ^{13}C-Kernen berücksichtigt, um die Anreicherung der gefütterten, markierten Vorläufer im zu untersuchenden Molekül zu ermitteln. Ein erfolgreicher Einbau gilt als gesichert, wenn sich die Signalintensität eines C-Atoms verdoppelt und somit der spezifische Einbau größer eins ist. Vor der Berechnung müssen alle Intensitäten der C-Atome auf ein C-Atom, bei dem man keinen Einbau des isotopenmarkierten Vorläufers erwartet, normiert werden.

$$\%\,\text{Anreicherung} = 1.1\% \times \frac{(\text{Intensität des Signals der markierten Verbindung})}{(\text{Intensität des Signals der Referenzverbindung})} - 1.1\%$$

$$\text{Spezifischer Einbau} = \frac{(\%\,\text{Anreicherung}) \times 100}{(\%\,\text{Anreicherung der Vorstufe})}$$

Formel 3: **Berechnung der ^{13}C-Anreicherung nach Scott et al..[98]**

8.3.7 Chemikalien für Derivatisierungen

Für die Derivatisierungsreaktionen von Spirodionsäure (**23**) wurden die verwendeten Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: 2,4-Dibromacetophenon und Kaliumfluorid (KF) von der Firma *Merck* und Dimethylformamid (DMF), 2,4-Dinitrophenylhydrazin und (–)-Brucin von der Firma *Roth*.

9 Produzent *Streptomyces* sp. Tü 6077 und Metaboliten

9.1 Stammhaltung und Kultivierung

Zwei unterschiedliche Arten der Stammhaltung wurden angewandt:

Agarplatten: Die Stammhaltung erfolgte auf Agarplatten mit SM-Medium. Die Platten wurden mit Sporen einer gut bewachsenen Agarplatte oder mit einer Stickstoffeinlagerung beimpft und für 5 d bei 28 °C inkubiert. Auf der Agarplatte bildete sich eine weiße gut versporte Oberfläche aus, die sich nach zwei bis drei Wochen Lagerung bei 4 °C grau verfärbte. Die Platten wurden bei 4 °C nicht länger als vier Monate gelagert.

Langzeiterhaltung in flüssigem Stickstoff: Von einer gut bewachsenen, maximal zwei Wochen alten Agarplatte wurden mit einseitig zugeschweißten und mit einem Bleistück beschwerten sterilen Polypropylen-Halmen Agarstückchen ausgestanzt, bis der Halm gefüllt war. Der Halm wurde in einen zweiten äußeren Halm gesteckt, der an beiden Enden zugeschmolzen wurde. Mehrere Halme in einem Kryoröhrchen wurden in einem Dewargefäß über flüssigem Stickstoff (- 196 °C) eingelagert.

9.1.1 Vorkulturen

Die Kultivierung des Stammes Tü 6077erfolgte in vier 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, die mit einem Schaumstoffstück verschlossen wurden. Jeder Kolben wurde mit 100 mL SM-Nährmedium befüllt und nach Sterilisation (30 min bei 120 °C und 1 bar Überdruck) mit ⅛ Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft. Die Vorkultur wurde bei 28 °C und 180 rpm (rounds per minute) für 72 h in einem Rundschüttler kultiviert.

9.1.1.1 Variation der Vorkulturen

Variation A: Die Kultivierung des Stammes erfolgte in vier 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, die mit einem Schaumstoffstück verschlossen wurden. Jeder Kolben wurde mit 100 mL SM-Nährmedium befüllt und nach Sterilisation (30 min bei 120 °C und 1 bar Überdruck) mit ⅛ Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft. Die Vorkultur wurde bei 28 °C und 180 rpm für 72 h in einem Rundschüttler kultiviert.
Variation B: Die Kultivierung des Stammes erfolgte in vier 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikanen, die mit einem Schaumstoffstück verschlossen wurden. Jeder Kolben wurde mit 100 mL SM-Medium befüllt und nach Sterilisation (30 min bei 120 °C und 1 bar Überdruck) mit ⅛ Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft. Die Vorkultur wurde bei 28 °C und 120 spm (shakes per minute) für 72 h in einem Längsschüttler kultiviert.

Variation C–I: Rahmenbedingungen wie bei **Variante B**, aber Test verschiedener Nährmedien: Medium S, Medium S*, NL 1153, NL 1345, NL 1154, NL 1358 und NL 1161.

Variation J (optimierte Kultivierung): Die Kultivierung des Stammes erfolgte in vier 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikanen, die mit einem Schaumstoffstück verschlossen wurden. Jeder Kolben wurde mit 100 mL Medium S befüllt und nach Sterilisation mit ⅛ Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft. Die Vorkultur wurde bei 28 °C und 120 spm (shakes per minute) für 48 h in einem Längsschüttler kultiviert.

9.1.2 Hauptkulturen

Fermenter: Die Kultivierung erfolgte im 2 L Biostat-B-Fermenter. Das Fermentationsgefäß wurde mit 900 mL SGG-Nährlösung und 4 Tropfen Niax-Lösung befüllt und autoklaviert. Nach dem Inokulieren mit 100 mL der Vorkulturlösung wurde für 72 h bei 28 °C, 500 rpm und einer Luftzufuhr von 4 vvm inkubiert. Auf eine pH-Regulierung wurde verzichtet.

Schüttelkolben: In sieben 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen wurden 150 mL SGG-Nährmedium nach Sterilisation (30 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck) mit 10 mL der Vorkulturlösung beimpft. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte für 72 h bei 28 °C und 180 rpm.

9.1.2.1 Variation der Hauptkultur im Fermenter

Während der Optimierungsarbeiten der Kultivierung im Biostat B Fermenter (2.5 L Arbeitsvolumen) wurden folgende Parameter variiert:

Nährmedium: Es wurden verschiedene Ansätze mit Medium S, Medium S* und NL 1345* und verschiedene Volumina des jeweiligen Nährmediums untersucht.

Promoter: Der potentielle Vorläufer α-Ketoglutarat (α-KGL) wurde in verschiedenen Mengen den Fermentationen nach 9 h Kultivierung zugesetzt.

Adsorberharz: Das Adsorberharz XAD-16 wurde zu variierenden Zeitpunkten und in verschiedenen Mengen zugesetzt.

pH-Regulation: Die Regulation des pH-Verlaufs wurde durch eine pH-Sperre (5.5 ± 0.5) untersucht.

Niveauregelung: Der Füllstand des Kulturbrühe wurde durch Zugabe von autoklavierten Leitungswasser reguliert.

Dauer der Kultivierung: Die Fermentationsdauer wurde variiert.

Fermenter: Die Variation des Fermenters bzw. der Art der Fermentation werden gesondert aufgeführt (siehe unten).

Die Variation der Kultivierung durch Zufütterung von Acetat, Glycerin und Malonsäure wird nicht mit aufgeführt, da es sich hierbei um Verträglichkeitstests bezüglich der Vorläufer handelt.

Die Fermentationen wurden mit 10% Inokulum beimpft, bei 28 °C, 500 rpm und 4vvm kultiviert. Im Folgenden sind die Variationen tabellarisch zusammengefasst:

Ansatz[a]	Medium & Volumen	α-KGL [g/L]	XAD-16 [Menge & Zeitpunkt]	pH-Regulation [Zeitraum]	Niveau-regulation[b]	Länge der Kultivierung [h]
AJ	S; 2.0 L	1	-	-	-	72
AN	S; 1.0 L	0.5	33 g/L; 36. h	-	-	48
AS	S; 1.0 L	1	-	24.–50. h	-	96
AT	S*; 1.0 L	1	-	24.–50. h	-	96
AU	S*; 1.5 L	1	40 g/L; 44. h	-	+	96
AV	S*; 1.5 L	1	-	-	+	96
AX	1345*; 1.5 L	1	-	-	+	96
AY	S*; 1.5 L	1	-	24.–50. h	+	92
AZ	S*; 1.5 L	-	-	24.–50. h	+	72
DA	S*; 1.5 L	-	-	24.–50. h	+	96
DS	S; 1.0 L	-	-	-	-	72

Tabelle 11: Übersicht der Variationen der Kultivierungsbedingungen von Tü 6077 im Fermenter Biostat B; [a] Interne Bezeichnung der Ansätze; [b] ohne Regulation (-) bzw. mit Regulation (+) der Füllstandes.

Airlift-Fermenter mit Überdruck (Ansatz DE)[ii]: Der Stamm Tü 6077 wurde im 10 L Airlift-Fermenter mit 10 L Medium S als Nährmedium kultiviert. Nach dem Autolavieren wurde das Nährmedium mit 800 mL einer 72 h alten Vorkultur beimpft. Die Fermentation erfolgte bei 28 °C, 5 bar Überdruck, Luftzufuhr 4 vvm und ohne pH-Sperre. Die Kultivierung wurde nach 72 h Fermentationsdauer abgebrochen und aufgearbeitet.

„Separated-cell-experiment“ (Ansatz DI)[ii]: Im Rahmen der Biosynthesestudien an Spirodionsäure (**23**) (siehe Kap.10) wurde der Stamm Tü 6077 parallel in zwei Fermentern, einer mit 1 L Medium S, der zweite mit 1 L Medium S* (ohne Glycerin) kultiviert. Nach dem Autoklavieren wurde das sterile Nährmedium (Medium S bzw. Medium S*) mit 150 mL einer

[ii] Interne Bezeichnung der Ansätze.

72 h alten Vorkultur beimpft. Die Fermentation erfolgte bei 28 °C, 500 rpm, 4 vvm und ohne pH-Sperre. Nach 24 h wurden beide Fermentationen abgebrochen und steril aufgearbeitet, indem man die Kulturbrühen bei 4 °C, 4000 rpm für 1 min steril zentrifugierte. Die Zellen der glycerinreichen Fermentation (mit Medium S) wurden nun mit dem Kulturüberstand der glycerinarmen Fermentation (mit Medium S^*) unter sterilen Bedingungen vereinigt. Die Kultivierung wurde fortgesetzt, der ^{13}C-markierte Vorläufer von der 24. h bis zur 36. h zugesetzt. Die Fermentation wurde nach 72 h beendet und aufgearbeitet.

9.1.2.2 Variation der Hauptkultur im Schüttelkolben

Variante A (Ansatz BD)[ii]: In vier 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikanen wurden 100 mL Medium S^* nach Sterilisation mit 10 mL der Vorkulturlösung beimpft. Nach 9 h der Kultivierung wurden pro Kolben 5 mL α-KGL (0.5 mg/L; gelöst in H_2O_{bidest}) steril hinzugegeben. In der 28. h der Fermentation wurden ca. 4 g XAD-16 (feucht), welches zuvor autoklaviert wurde, hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte für 72 h bei 28 °C auf einem Querschüttler bei 120 spm.

Variante B (Ansatz BE)[ii]: Vier 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikanen wurden mit 100 mL Medium S^* befüllt, und bei einer Temperatur von ca. 40 °C nach Sterilisation wurde Vitamin B_{12} (5mg/L) steril hinzugefügt. Man beimpfte mit 10 mL der Vorkulturlösung und nach 9 h der Kultivierung wurden pro Kolben 5 mL α-KGL (0.5 mg/L; gelöst in H_2O_{bidest}) steril hinzugegeben. In der 28. h der Fermentation wurden ca. 4 g XAD-16 (feucht), welches zuvor autoklaviert wurde hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte für 72 h bei 28 °C auf einem Querschüttler bei 120 spm.

Variation C (Ansatz BF)[ii]: Die Kultivierung des Stammes erfolgte in vier 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikanen, die mit einem Schaumstoffstück verschlossen wurden. Jeder Kolben wurde mit 150 mL NL 1345 befüllt und nach Sterilisation mit 10 mL Vorkultur beimpft. Die Fermentation wurde bei 28 °C und 120 spm für 72 h in einem Längsschüttler kultiviert.

Variation D (Ansatz DF, DG, DH)[ii]: Die Kultivierung des Stammes erfolgte in je sieben 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, die mit einem Schaumstoffstück verschlossen wurden. Jeder Kolben wurde mit 150 mL Medium S (Zusatz: Spur 11 2.5 mL/L) befüllt und nach Sterilisation mit 10 mL Vorkultur beimpft. Nach der 44. und 48. h der Kultivierung wurden die zu fütternden Substanzen (Niax, DMSO und 4-Hydroxyl-6-methyl-2-pyron) steril der Fermentation zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 28 °C und 180 rpm für 72 h in einem Rundschüttler.

Variation E (Ansatz DK, DL, DM, DN, DO) [ii]**:** Die Kultivierung des Stammes erfolgte in je drei 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikane, die mit einem Schaumstoffstück verschlossen wurden. Jeder Kolben wurde mit 100 mL Medium S befüllt und nach Sterilisation mit 10 mL Vorkultur beimpft. Nach der 24. h der Kultivierung wurden die zu fütternden Substanzen (2-Methyl-3,5-dioxoheptansäure (**41**), 4-Pentinsäure (**44**) und Tween 40®) steril der Fermentation zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 28 °C und 120 rpm für 72 h in einem Längsschüttler.

9.2 Variationen der Aufarbeitung

Die Aufarbeitung der Fermentationen erfolgte, indem die Kulturbrühe mit 0.5 N bzw. 1 N HCl auf pH = 4 eingestellt, mit Celite (ca. 3 gehäufte EL auf 1 L Kulturbrühe) versetzt und filtriert wurde. Da sich im Mycel keine Spirodionsäure (**23**) befand, wurde es verworfen. Eine Ausnahme bildeten die Fermentationen, die unter XAD-16-Zugabe erfolgten.

Variante I: Das Kulturfiltrat wurde an Amberlite® XAD-16 adsorbiert, mit demin. Wasser (1:1 Kulturbrühe) gewaschen und mit Methanol (500 mL/1 L Kulturbrühe) eluiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum bei 40 °C entfernt und der Rückstand lyophilisiert (ca. 24 h). Das Rohprodukt wurde in demin. Wasser (50–100 mL/1 L Kulturbrühe) aufgenommen, dreimal mit Ethylacetat extrahiert (Volumina Ethylacetat:Kulturfiltrat ca. 1:1) und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Variante II: Das Kulturfiltrat wurde an Amberlite® XAD-16 adsorbiert, mit demin. Wasser (1:1 Kulturbrühe) gewaschen und mit Methanol (500 mL/1 L Kulturbrühe) eluiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum bei 40 °C entfernt und der Rückstand lyophilisiert (ca. 24 h). Das Rohprodukt wurde in Methanol (50–100 mL/1 L Kulturbrühe) aufgenommen, durch Filtration gereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Variante III: Das Kulturfiltrat wurde an Amberlite® XAD-16 adsorbiert, mit demin. Wasser (1:1 Kulturbrühe) gewaschen und mit Methanol (500 mL/1 L Kulturbrühe) eluiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum bei 40 °C entfernt und der Rückstand lyophilisiert (ca. 24 h). Das Rohprodukt wurde in demin. Wasser (50–100 mL/1 L Kulturbrühe) aufgenommen, dreimal mit Dichlormethan extrahiert (Volumina Dichlormethan:Kulturfiltrat ca. 1:1) und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Variante IV: Das Kulturfiltrat wurde lyophilisiert (ca. 24 h). Das Rohprodukt wurde in demin. Wasser (50–100 mL/1 L Kulturbrühe) aufgenommen, dreimal mit Ethylacetat (Volumina Ethylacetat:Kulturfiltrat ca. 1:1) extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum

entfernt.

Variante V: Das Kulturfiltrat wurde lyophilisiert (ca. 24 h). Das Rohprodukt wurde in Methanol (50–100 mL/1 L Kulturbrühe) aufgenommen, durch Filtration gereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Variante VI: Das Kulturfiltrat wurde lyophilisiert (ca. 24 h). Das Rohprodukt wurde mit Sand (Rohprodukt:Sand 1:1) gut vermischt und mit *n*-Heptan (200 mL/1 L Kulturbrühe) unter Rückfluss 3 h via Soxhlet extrahiert. Anschließend wurde der Rückstand mit Methanol (200 mL/1 L Kulturbrühe) versetzt und unter Rückfluss für 1 h extrahiert. Bei beiden Extraktionen wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Variante VII: Das Kulturfiltrat wurde lyophilisiert (ca. 24 h). Das Rohprodukt wurde mit Sand (Rohprodukt:Sand 1:1) gut vermischt und mit *n*-Heptan (200 mL/1 L Kulturbrühe) unter Rückfluss dreimal 30 min via Soxhlet extrahiert. Der Rückstand wurde abfiltriert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingeengt.

Variante VIII: Das Kulturfiltrat wurde lyophilisiert (ca. 24 h). Das Rohprodukt wurde mit Sand (Rohprodukt:Sand 1:1) gut vermischt und mit 1-Butanol (200 mL/1 L Kulturbrühe) unter Rückfluss dreimal 30 min via Soxhlet extrahiert. Der Rückstand wurde abfiltriert und das Lösungsmittel wurde im Vakuum eingeengt.

Variante IX: Das Kulturfiltrat wurde lyophilisiert (ca. 24 h). Das Rohprodukt wurde mit Sand (Rohprodukt:Sand 1:1) gut vermischt und mit *n*-Heptan (200 mL/1 L Kulturbrühe) unter Rückfluss dreimal 30 min via Soxhlet extrahiert. Der Rückstand wurde abfiltriert, in Methanol (100 mL/1 L Kulturbrühe) aufgenommen, durch Filtration gereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 100 mL/L Wasser aufgenommen und dreimal mit Ethylacetat (100 mL/1 L Kulturbrühe) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt.

Bei Fermentationen mit Zugabe von XAD-16 wurde das Kulturfiltrat lyophilisiert (ca. 24 h), Das Lyophilisat in Methanol (50–100 mL/1 L Kulturbrühe) aufgenommen, durch Filtration gereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Variation X: Das mit XAD versetzte Mycel wurde dreimal mit 200 mL/L Aceton versetzt und im Ultraschallbad 10 min extrahiert. Nach Filtration wurden die vereinigten organischen Phasen im Vakuum eingeengt.

Variation XI: Das mit XAD versetzte Mycel wurde mit 500 mL/L demin. Wasser unter Rühren auf dem Magnetrührer 10 min gewaschen. Anschließend wurde es zweimal mit 300 mL/L Methanol versetzt und durch Rühren 10 min extrahiert. Nach Filtration wurden die vereinigten organischen Phasen im Vakuum eingeengt.

Nach Auswertung der Aufarbeitungsvariationen erwies sich die Aufarbeitung nach **Variation IV** als beste Strategie.

9.3 Isolierung von Spirodionsäure (23) und Sekundärstoffen 29, 30

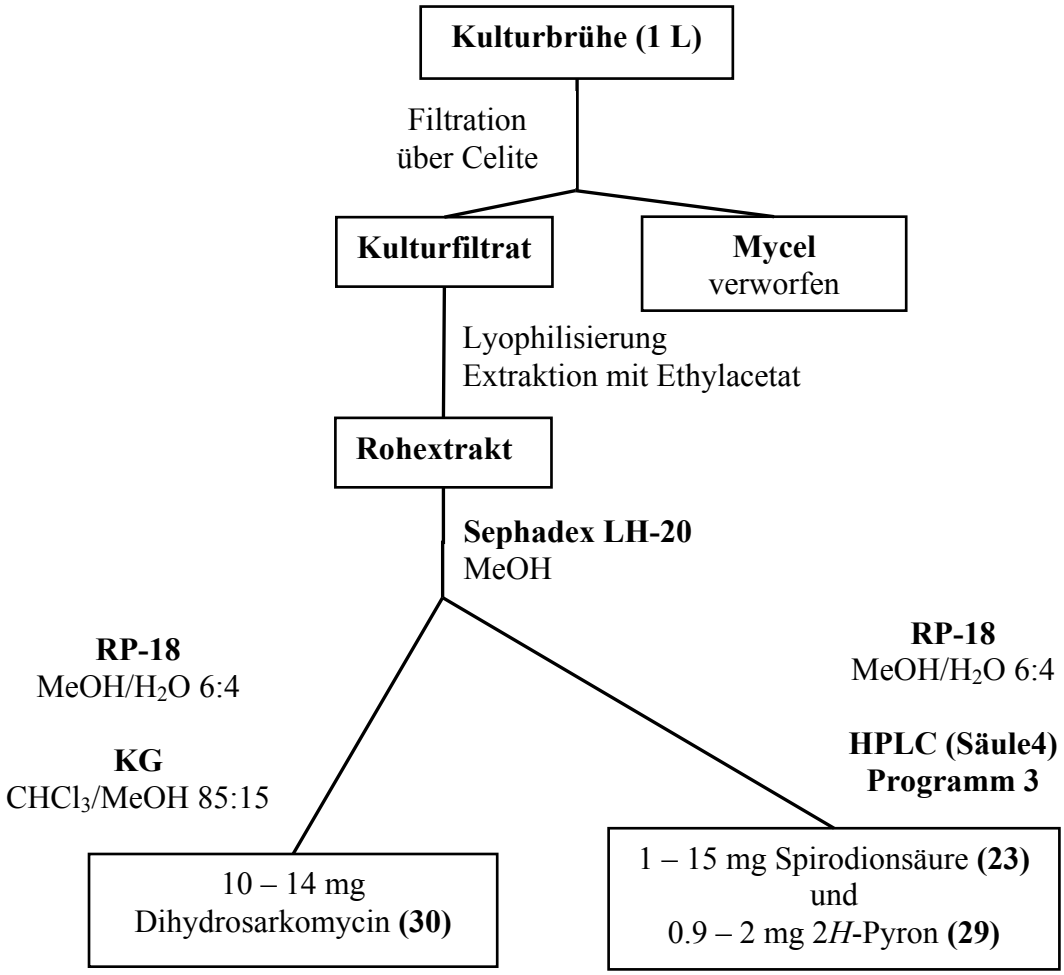


Abbildung 79: Flussdiagramm zur Aufarbeitung und Isolierung von Spirodionsäure (23), Dihydrosarkomycin (30) und 2*H*-Pyron (29)

Die Kulturbrühe wurde mit 0.5 N bzw. 1 N HCl auf pH = 4 eingestellt, mit Celite (ca. 3 gehäufte Esslöffel auf 1 L Kulturbrühe) versetzt und filtriert. Das Mycel wurde verworfen. Das Kulturfiltrat wurde lyophilisiert (ca. 24 h). Das Rohprodukt wurde in demin. Wasser (50–100 mL/1 L Kulturbrühe) aufgenommen, dreimal mit Ethylacetat (Volumina Ethylacetat:Kulturfiltrat ca. 1:1) extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

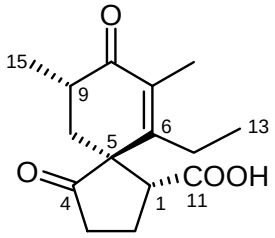
Das erhaltene Rohprodukt wurde über Sephadex LH-20 (Säule: 100 x 2.5 cm, Methanol) vorgereinigt und fraktioniert. Die erste Fraktion wurde über Mitteldruckchromatographie an RP-18 Kieselgel (Lobar-B, 40 x 2.5 cm; MeOH/H_2O 6:4) und anschließender Schwerkraftchromatographie an Kieselgel (30 x 2 cm, $CHCl_3$/MeOH 85:15) gereinigt und man erhielt 10-14 mg/L Dihydrosarkomycin (**30**). Die zweite Fraktion wurde an einer RP-18 Mitteldrucksäule (Lobar-B, 40 x 2.5 cm; MeOH/H_2O 6:4) chromatographisch vorgereinigt und anschließend an der semipräparativen HPLC (Säule 4 und Programm 3) chromatographiert. Es wurden 1-15 mg/L Spirodionsäure (**23**) und 0.9-2 mg/L 6-Ethyl-4-hydroxy-3,5-dimethyl-2-pyranon (**29**) isoliert.

9.4 Charakterisierung der Metaboliten (23, 29 und 30)

Spirodionsäure (23)

(1R,5R,9S)-6-Ethyl-7,9-dimethyl-4,8-dioxospiro[4.5]deca-6-en-1-carbonsäure

farbloser Feststoff



$C_{15}H_{20}O_4$ (264.14)

Anfärbeverhalten: rot (Anisaldehyd)

***R*$_f$** = 0.48 ($CHCl_3$/MeOH 85:15)

Schmelzpunkt: > 305 °C

EI-MS (70 eV)**:** *m/z* (%): 264 (27) $[M]^+$, 222 (98) $[M-C_2H_2O]^+$, 177 (100) $[M-C_4H_7O2]^+$.

HR-EI-MS: *m/z*: berechnet für $C_{15}H_{20}O_4$: 264.1362, gefunden 264.1360 $[M]^+$.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3436, 1738, 1664, 1457, 1379 cm^{-1}.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 253 (3.82) nm

(MeOH/HCl): λ_{max} (lg ε) = 251 (3.88) nm

(MeOH/NaOH): λ_{max} (lg ε) = 252 (3.80) nm.

$[\alpha]_D^{20}$ = –4.78 (*c* = 0.33 in MeOH).

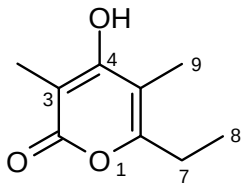
^{1}H-NMR (Pyridin-d5, 35 °C, 600 MHz): δ = 1.11 (d, ^3J(H,H) = 6.5 Hz, 3H, 15-H_3), 1.26 (t, ^3J(H,H) = 8.0 Hz, 3H, 13-H_3), 1.73 (t, ^3J(H,H) = 14.0, 14.0 Hz, 1H, 10-H_a), 1.95 (s, 3H, 14-H_3), 2.05 (dq, ^3J(H,H) = 15.0, 8.0 Hz, 1H, 12-H_a), 2.30 (m_c, 1H, 2-H_a), 2.36 (m_c, 1H, 12-H_b), 2.47 (m_c, 1H, 3-H_a), 2.50 (m_c, 1H, 10-H_b), 2.58 (m_c, 1H, 2-H_b), 2.61 (m_c, 1H, 3-H_b), 2.92 (ddq, ^3J(H,H) = 14.0, 7.0, 6.5 Hz, 1H, 9-H), 3.56 (dd, ^3J(H,H) = 11.0, 6.5 Hz, 1H, 1-H) ppm.

^{13}C-NMR (Pyridin-d_5, 35 °C, 150.8 MHz): δ = 12.4 (q, C-14), 13.0 (q, C-13), 16.0 (q, C-15),

23.3 (t, C-2), 26.4 (t, C-12), 34.5 (t, C-10), 36.2 (d, C-9), 37.8 (t, C-3), 49.0 (d, C-1), 59.9 (s, C-5), 135.0 (s, C-7), 155.8 (s, C-6), 175.8 (s, C-11), 200.0 (s, C-8), 218.4 (s, C-4) ppm.

6-Ethyl-4-hydroxy-3,5-dimethylpyran-2-on (29)

farbloser Feststoff



$C_9H_{12}O_3$ (168.08)

Anfärbeverhalten: rot (Anisaldehyd)

***R*f** = 0.43 ($CHCl_3$/MeOH 85:15)

Schmelzpunkt: > 305 °C

EI-MS (70 eV): *m/z* (%)**:**168 (80) $[M]^+$, 140 (64) $[M-CO]^+$, 125 (100) $[M-C_2H_3O]^+$.

ESI-MS (positive Ionen)**:** 169 $[M+H]^+$, 191 $[M+Na]^+$.

ESI-MS (negative Ionen)**:** 167 $[M-H]^-$.

HR-EI-MS: *m/z*: berechnet für $C_9H_{12}O_3$: 168.0786, gefunden 168.0785 $[M]^+$

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3421 (br), 2940, 2881, 1683, 1658 cm^{-1}.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 290 (0.93), 205 (2.25) nm

(MeOH/HCl): λ_{max} (lg ε) = 292 (0.93), 206 (2.35) nm

(MeOH/NaOH): λ_{max} (lg ε) = 288 (1.05), 213 (2.87), 208 (2.45), 204 (1.56) nm.

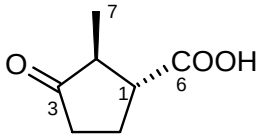
^{1}H-NMR (Pyridin-d5, 35 °C, 300 MHz): δ = 1.09 (t, ^3J(H,H) = 8 Hz, 3H, 8-H_3), 1.97 (s, 3H, 10-H_3), 2.26 (s, 3H, 9-H_3), 2.41 (q, ^3J(H,H) = 8 Hz, 2H, 7-H_2), 3.60 (s, 1H, OH) ppm.

^{13}C-NMR (Pyridin-d_5, 35 °C, 75.5 MHz): δ = 10.0 (q, C-9), 10.2 (q, C-10), 11.7 (q, C-8), 24.4 (t, C-7), 98.3 (s, C-3), 106.9 (s, C-5), 159.2 (s, C-6), 165.7 (s, C-2), 166.1 (s, C-4) ppm.

Dihydrosarkomycin (30)

(1R,2S)-2-Methyl-3-oxocyclopentancarbonsäure

farbloser, kristalliner Feststoff



$C_7H_{10}O_3$ (142.07)

Anfärbeverhalten: gelb (Anisaldehyd)

***R*f** = 0.42 ($CHCl_3$/MeOH 85:15)

EI-MS (70 eV): *m/z* (%): 142 (100) $[M]^+$, 114 (66) $[M-CO]^+$, 97 (50) $[M-COOH]^+$.

HR-EI-MS: *m/z*: berechnet für $C_7H_{10}O_3$: 142.0630, gefunden 142.0629 $[M]^+$.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3448, 2974, 1733, 1183 cm^{-1}.

$[\alpha]_D^{20}$ = +64 (*c* = 0.08 in MeOH).

^{1}H-NMR (Aceton-d_6, 300 MHz): 1.04 (d, ^3J(H,H) = 7 Hz , 3H, 7-H_3), 1.93 (m_c, 1H, 5-H_a), 2.15 (m_c, 1H, 4-H_a), 2.25 (m_c, 1H, 5-H_b), 2.33 (m_c, 2H, 2-H, 4-H_b), 2.65 (m_c, 1H, 1-H) ppm.

^{13}C-NMR (Aceton-d_6, 75.5 MHz): 13.4 (q, C-7), 25.2 (t, C-5), 37.2 (t, C-4), 47.9 (d, C-2), 49.9 (d, C-1), 177.0 (s, C-6), 217.9 (s, C-3) ppm.

10 Untersuchungen zur Biosynthese von Spirodionsäure (23)

10.1 Fermentationskurve

Zur Bestimmung der zeitabhängigen Sekundärstoffproduktion von Spirodionsäure (**23**) wurde der Stamm Tü 6077 wie in Fermentationsansatz AJ (siehe Kap. 9.1.2.1) kultiviert. Der pH-Verlauf wurde während der Fermentation mittels einer pH-Elektrode aufgenommen. Über das Probenentnahmerohr wurden alle sechs Stunden 15 mL Kulturbrühe entnommen, erstmals nach Animpfen bis zur 72. Inkubationsstunde. Die Aufarbeitung erfolgte analog zu Variante IV (siehe 9.2). Die erhaltenen Proben wurden in 110 µL MeOH gelöst, zentrifugiert und man entnahm 100 µL für die Analyse mittels analytischer HPLC (Säule 1, Programm 1, siehe 8.2). Hierbei erfolgte eine relative Bestimmung des Gehalts an Spirodionsäure (**23**) über die Fermentationszeit in Bezug auf den pH-Verlauf (Abbildung 80).

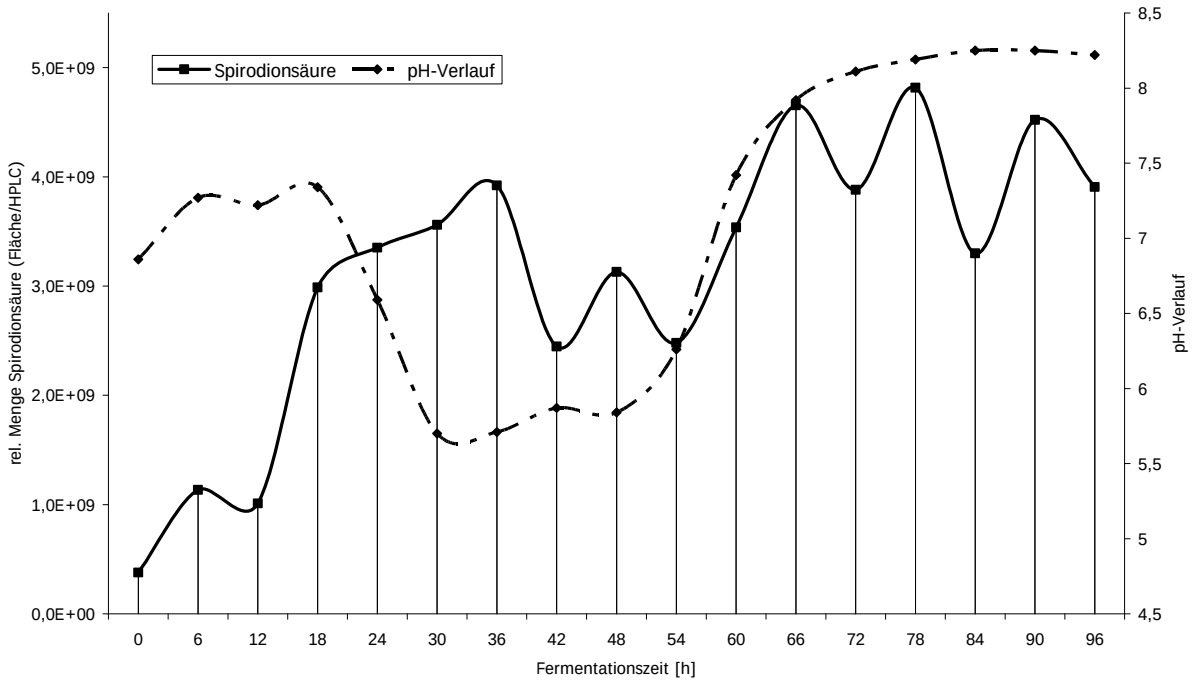


Abbildung 80: Fermentationskurve von Spirodionsäure (23) aus dem Stamm Tü 6077.

Dargestellt sind der relative Gehalt von **23** (Quadrate) und der pH-Verlauf über die Fermentationszeit (Rauten). Die Messpunkte der Wachstumskurve sind aus den Integralen der Signale von Spirodionsäure (**23**) bei 254 nm ermittelt, deren Intensität mit der Menge an **23** in der Probe gleichgesetzt wird. Die Fermentationskurve (Abbildung 80) zeigt innerhalb der ersten 18 h einen Anstieg des pH-Wertes von 6.8 zu 7.3. Ab der 24. Stunde sinkt der pH-Wert stark und hält sich im Bereich 5.7 bis 5.8. Ab der 50 Stunde der Fermentation steigt der pH-Wert bis 8.2. Die Produktion von **23** beginnt ab der 12. Stunde zu steigen und zeigt ihr erstes Maximum in der Fermentationsphase, in der der pH-Verlauf sein Minimum erreicht.
Die Analyse des Fermentationsverlaufs erwies die 24. bzw. 48. Stunde als beste Fütterungszeitpunkte.

10.2 Fütterungsexperimente mit markierten Vorläufern

10.2.1 Fütterungsexperiment mit [2-^{13}C]Dinatriummalonat

Das Fütterungsexperiment wurde analog zum Fermentationsansatz AV (siehe 9.1.2.1) durchgeführt, wobei die Fermentation in der 72. Inkubationsstunde beendet wurde. Das isotopenmarkierte Dimalonat wurde in 10 mL bidestillierten Wasser gelöst und der pH-Wert mit 0.5 N HCl auf 6.8 eingestellt. Die Lösung wurde durch einen Sterilfilter gedrückt und mit sterilem, bidestillierten Wasser auf 50 mL Gesamtvolumen verdünnt. Ab der 48. Stunde wurde der Vorläufer mittels einer Schlauchpumpe über einen Zeitraum von 12 h kontinuierlich in den Fermenter gegeben. Die Aufarbeitung erfolgte nach Variante VII (siehe 9.2). Die Aufreinigung erfolgte nach der in 9.3 beschriebenen Methodie. Es wurden 1000 mg/L (6.8 mmol/L) [2-^{13}C]Dinatriummalonat zugefüttert und 1.0 mg/L angereicherte Spirodionsäure (**23**) isoliert.

10.2.2 Fütterungsexperiment mit [U-$^{13}C_3$]Glycerin

Die Fermentation wurde nach der „**Separated-cell“-Methode** (Ansatz DI**,** siehe Kap. 9.1.2.1) durchgeführt. Die isotopenmarkierte Substanz wurde in 10 mL bidestillierten Wasser gelöst, steril filtriert und mit sterilem bidestillierten Wasser auf 40 mL Gesamtvolumen verdünnt. Ab der 24. Stunde wurde der Vorläufer mittels einer Schlauchpumpe über einen Zeitraum von

12 h kontinuierlich in den Fermenter gegeben. Die Aufarbeitung erfolgte nach Variante IX (siehe 9.2). Die Aufreinigung erfolgte nach der in 9.3 beschriebenen Methodik. Es wurden 505 mg/L (5.3 mmol/L) [U-$^{13}C_3$]Glycerin gefüttert und 5.8 mg/L angereicherte Spirodionsäure (**23**) isoliert.

10.3 Vorläufer-dirigierte Biosynthese

a) Fütterungsexperiment mit 4-Hydroxy-6-methyl-2*H*-pyron (39)

Die Kultivierung wurde nach Variante D (siehe 9.1.2.2) durchgeführt. Es wurden folgende Substanzen nach der 44. und 48. Stunde steril der Kultivierung zugefügt: Niax (2 x 1 mL, 5 mL/L), DMSO (2 x 1 mL, 1 g/L) und 4-Hydroxy-6-methylpyron (**39**) (2 x 2 mL, 7.3 mm/L). Als Referenz wurden zwei 1 L Erlenmeyerkolben mit Schikane mit 150 mL Medium S befüllt und mit 10 mL Vorkultur (72 h) beschickt und unter gleichen Bedingungen kultiviert. Die Aufarbeitung erfolgte nach Variante V (siehe 9.2) und die erhaltenen Rohprodukte wurden mit einer Konzentration von 4 mg/mL mit analysenreinem Methanol für die HPLC-ESI-MS-Analyse bereitgestellt.

b) Fütterungsexperiment mit 2-Methyl-3,5-dioxoheptansäure (41)

Die Kultivierung wurde nach Variante E (siehe 9.1.2.2) durchgeführt. Es wurden folgende Substanzen nach der 24. Stunde steril der Kultivierung zugefügt: 2-Methyl-3,5-dioxoheptansäure (0.5 mL, 0.18 mmol/L, gelöst in 99%igen Ethanol) (**41**), 4-Pentinsäure (0.5 mL, 0.18 mmol/L, gelöst in 99%igen Ethanol) (**44**) und Tween 40 (2 mL, 5 mL/L, Volumen Tween 40/H_2O 1:3). Ebenso wurden 2-Methyl-3,5-dioxoheptansäure (0.5 mL, 0.18 mmol/L, gelöst in 99%igen Ethanol) (**41**) und 4-Pentinsäure (0.5 mL, 0.23 mmol/L, gelöst in 99%igen Ethanol) (**44**) in Kombination der Kultivierung beigefügt. Als Referenz wurden drei 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikane mit 100 mL Medium S befüllt mit 10 mL Vorkultur (72 h) beschickt und unter gleichen Bedingungen kultiviert. Die Aufarbeitung erfolgte nach Variante IV (siehe 9.2) und die erhaltenen Rohprodukte wurden mit einer Konzentration von 4 mg/mL mit analysenreinem Methanol für die HPLC-ESI-MS-Analyse bereitgestellt.

11 Derivatisierungsarbeiten an Spirodionsäure (23)

11.1 Derivate von Spirodionsäure (23)

a) 4-Bromphenacylspirodionsäureester (49)

4-Bromophenacyl-6-ethyl-7,9-dimethyl-4,8-dioxo-spiro[4.5]deca-6-ene-1-carboxylat

Zu einer Lösung von Spirodionsäure (**23**) (14 mg, 0.053 mmol) in DMF (0.35 mL) wurde Kaliumfluorid (6.0 mg, 0.103 mmol) hinzugegeben. Das Gemisch wurde 10 min gerührt und mit 4-Bromphenacylbromid (**48**) (14 mg, 0.050 mmol), gelöst in 0.3 mL DMF, versetzt. Man ließ die Reaktion für 1.5 h unter DC-Kontrolle rühren. Die Reaktionsmischung wurde mit 5 mL Diethylether verdünnt, mit demin. Wasser gewaschen (2 x 6 mL) und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Reaktionsrohprodukt (24 mg) wurde durch Gelchromatographie Sephadex LH-20 (35 x 1.5 cm) und anschließende Säulenchromatographie (25 x 1.5 cm, Petrolether/Ethylacetat/Methanol 8:6:1) gereinigt. Man erhielt 8 mg von **49** als gelben Feststoff.

$C_{23}H_{25}BrO_5$ (461.32)

R_f = 0.7, $CHCl_3$/MeOH 85:15

DCI-MS (70 eV): m/z (%): 478 (46) $[M+NH_4]^+$, 940 (4) $[2M+NH_4]^+$.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3435, 1741, 1702, 1646, 1586, 1457, 1397 cm^{-1}.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 255 (0.97), 202 (0.81) nm

(MeOH/HCl): λ_{max} (lg ε) = 255 (0.99), 201 (0.81) nm

(MeOH/NaOH): λ_{max} (lg ε) = 254 (1.00), 205 (0.78) nm.

^{1}H-NMR Aceton-d_6, 600 MHz): δ = 0.96 (d, ^3J(H,H) = 6 Hz, 3H, 15-H_3), 1.14 (t, ^3J(H,H) = 7 Hz, 3H, 13-H_3), 1.39 (mc, 1H, 10-H_a), 1.80 (s, 3H, 14-H_3), 1.97 (mc, 1H, 12-H_a), 2.22-2.58 (m, 7H, 9-H, 10-H_b, 2-H_2, 12-H_b, 3-H_a 3-H_b), 3.63 (mc, 1H, 1-H), 5.55 (s, 2H, 1'-H_2), 7.76 (mc, 2H, 5'-H, 7'-H), 7.94 (mc, 2H, 4'-H, 8'-H) ppm.

b) 8-(2',4'-Dinitrophenylhdrazon)-spirodionsäuremethylester (70)

8-(2',4'-Dinitrophenylhydrazon)-6-ethyl-7,9-dimethyl-4,8-dioxo-spiro[4.5]deca-6-ene-1-carboxylat

Die Derivatisierung fand in zwei Schritten statt, wobei im ersten Schritt Spirodionsäure (**23**)

mit etherischem Diazomethan verestert wurde.[50] Im zweiten Schritt wurden Spirodionsäuremethylester (4.6 mg, 0.017 mmol) in 1.5 mL Ethanol gelöst, mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (3.27 mg, 0.017 mmol), 50%iger H_2SO_4 (30µL) und bidest. Wasser (40 µL) versetzt. Die Reaktionsmischung ließ man unter DC-Kontrolle rühren.[172] Das Rohprodukt wurde durch Mitteldruckchromatographie an RP-18 Kieslegel (Lobar-B, 31 x 2.5 cm; Aceton/H_2O 4:1) aufgereinigt. Man erhielt 2.8 mg des gewünschten Produkts (**70**) als gelbliches Gemisch.

$C_{22}H_{26}N_4O_7$ (458.46)

R_f = 0.67, $CHCl_3$/MeOH 85:15

DCI-MS (70 eV): m/z (%): 459 (42) $[M+H]^+$, 476 (12) $[M+NH_4]^+$.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 203 (0.23), 255 (0.14), 383 (0.19) nm

(MeOH/HCl): λ_{max} (lg ε) = 203 (0.22), 256 (0.17), 329 (0.13), 383 (0.21) nm

(MeOH/NaOH): λ_{max} (lg ε) = 200 (0.20), 220 (0.25), 252 (0.20), 383 (0.21) nm.

c) Brucinsalz von Spirodionsäure (23)

Es wurden zwei Ansätze verfolgt.[173, 174] Es konnte kein kristallines Produkt erhalten werden.

11.2 Chemische Analyse von nativer und synthetischer Spirodionsäure (23, 50) und deren Derivate 51a, 51b

a) Chemische Analyse nativer (23) und totalsynthetisch hergestellter Spirodionsäure (50)

Die Proben wurden in einer Tandem-Messung unter gleichen Bedingungen NMR-spektroskopisch untersucht (Pyridin-d_5, 35 °C, 150.8 MHz, 10 h, Probenmenge ca. 1 mg).

C-Atom	23 δ_C [ppm]	50 δ_C [ppm]	Abweichung in %
1	218.48	218.19	0.13
2	200.11	199.95	0.08
3	175.83	175.40	0.24
4	155.86	155.64	0.14
5	135.80	135.80	0.00
6	59.83	59.82	0.02
7	49.03	48.67	0.74
8	37.82	37.73	0.24
9	36.13	36.11	0.06
10	34.48	34.40	0.23
11	26.35	26.33	0.08
12	23.33	23.16	0.73
13	15.95	15.93	0.13
14	12.92	12.92	0.00
15	12.30	12.31	0.08
Lösungsmittel-Signale			
1	149.80	149.80	0.00
2	135.51	135.51	0.00
3	123.47	123.47	0.00

Tabelle 12: Gegenüberstellung der aufgenommenen ^{13}C-NMR-Daten der Tandem-Messung (Pyridin-d_5, 35 °C, 150.8 MHz, 10 h, Probenmenge ca. 1 mg) von nativer Spirodionsäure (23) gegenüber der totalsynthetischen (50).

Das ^{13}C-NMR-Spektrum eines Mischungsexperiments (Pyridin-d_5, 35 °C, 150.8 MHz, 11.5 h,

Verhältnis **23**/**50** 1:4) von nativer (**23**) und synthetischer Spirodionsäure (**50**) ergab einen einfachen Spektrensatz.

b) Chemischer Vergleich der Camphersultam-Derivate nativer (nativ-51a) und totalsynthetischer Spirodionsäure (synth-51a und synth-51b)

Das ^{13}C-NMR-Spektrum eines Mischungsexperiments ($CDCl_3$, 150.8 MHz, 11.5 h, Verhältnis der Diastereomere **nativ-51a**/**synth-51b** 1:5) von nativen (**nativ-51a**) und totalsynthetisch hergestellten Camphorsultam-Spirodionsäureamid (**synth-51b**) ergab einen doppelten Spektrensatz.

Die HPLC-Analyse (Daicel Chiralpak IB-Säule, Hexan/Isopropanol Laufmittelsystem: Isopropanol (A) / *n*-Hexan (B), Gradient: 30 min bei 95% B, in 20 min auf 100% B, Flussrate: 0.8 mL/min) einer Mischung von natürlichen (**nativ-51a**) Camphorsultam-Derivat mit synthetischen (**synth-51b**) im Verhältnis **nativ-51a**/**synth-51b** 1:5 ergab folgendes Signalmuster:

Rt: 21.29 min (73%)
Rt: 24.84 min (10%)
Rt: 36.08 min (14%)

Die HPLC-Analyse (Daicel Chiralpak IB-Säule, Hexan/Isopropanol Laufmittelsystem: Isopropanol (A) / *n*-Hexan (B), Gradient: 30 min bei 95% B, in 20 min auf 100% B, Flussrate: 0.8 mL/min) des Camphorsultam-Derivats (**synth-51a**) ergab folgendes Signal:

Rt: 35.98 min (14%)

12 Der Kirromycin-Produzent *S. collinus* Tü 365

12.1 Kultivierung und Aufarbeitung

Die Stammhaltung erfolgte auf Agarplatten mit SM-Medium. Die Platten wurden mit Sporen einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft und für 5 d bei 28 °C inkubiert. Auf der Agarplatte bildete sich eine graue Oberfläche aus. Die Platten wurden bei 4 °C nicht länger als 4 Monate gelagert.

12.1.1 Vorkulturen

Die Kultivierung des Stammes Tü 365 erfolgte in vier 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, die mit einem Schaumstoffstück verschlossen wurden. Jeder Kolben wurde mit 150 mL KP-Nährmedium befüllt und nach Sterilisation mit einem 1 cm^2 großen Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft. Die Vorkultur wurde bei 30 °C und 180 rpm für 48 h in einem Rundschüttler kultiviert.

12.1.2 Hauptkulturen

Schüttelkolben: In sieben 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen wurden 150 mL KP-Nährmedium nach Sterilisation mit 7.5 mL der Vorkulturlösung beimpft. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte für 72 h bei 30 °C und180 rpm.

Schüttelkolben mit XAD-Zusatz:
In vier 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen wurden 150 mL KP-Nährmedium nach Sterilisation mit 7.5 mL der Vorkulturlösung beimpft. Nach 12 h Kultivierung wurden jedem Kolben ca. 2 bis 4 g steriles XAD-16 (feucht) zugefügt. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte für 72 h bei 30 °C und180 rpm.

Fermenter: Die Kultivierung erfolgte im Fermenter Biostat-B (2.5 L Arbeitsvolumen). Das Fermentationsgefäß wurde mit 900 mL KP-Medium befüllt und autoklaviert. Nach dem Inokulieren mit 150 mL Vorkulturlösung wurde für 72 h bei 30 °C, 400 rpm und einer Luftzufuhr von 4 vvm inkubiert. Auf eine pH-Regulierung wurde verzichtet.

12.1.3 Aufarbeitung

Die Aufarbeitung von Fermenter bzw. Schüttelkultur erfolgte auf gleiche Weise. Die Kulturbrühe wurde mit 0.5 N bzw. 1 N HCl auf pH = 5 eingestellt, mit Celite (ca. 3 gehäufte Esslöffel auf 1 L Kulturbrühe) versetzt und filtriert. Das Mycel wurde verworfen, da sich nach dünnschichtchromatographischer Kontrolle kein Kirromycin (**24**) detektieren ließ. Das Kulturfiltrat wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert (Volumina Ethylacetat:Kulturfiltrat ca. 1:1) und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

Aufarbeitung mit XAD-Zusatz

Die Kulturbrühe wurde mit 1 N HCl auf pH = 5 eingestellt, mit Celite (ca. 3 gehäufte EL auf 1 L Kulturbrühe) versetzt und filtriert. Das Kulturfiltrat wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert (Volumina Ethylacetat:Kulturfiltrat ca. 1:1) und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das mit XAD-16 versetzte Mycel wurde zweimal mit 200 mL/L Methanol unter Rühren für 30 min eluiert. Nach Filtration wurden die organischen Phasen vereinigt und im Vakuum eingeengt.

12.2 Isolierung und Charakterisierung von Kirromycin (24)

12.2.1 Isolierung

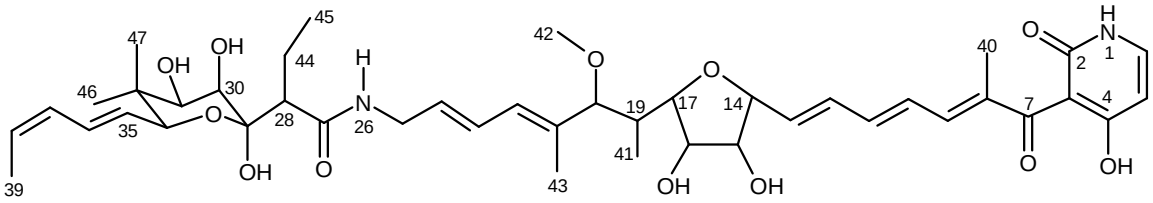
Das Rohprodukt wurde in 5 mL/L Ethylacetat gelöst und mit 50–100 mL/L Petrolether versetzt. Das Lösungsmittel wurde abdekantiert und der erhaltene Niederschlag im Vakuum getrocknet. Durch weitere Zugabe von 50 mL/L Petrolether auf die organische Phase und Eiskühlung über Nacht, konnte die Menge an Feststoff verdoppelt werden. Die erhaltenen Feststoffe wurden vereinigt und an Sephadex LH-20 (Säule: 100 x 2.5 cm, Methanol) gelchromatographisch vorgereinigt. Die Kirromycin (**24**) enthaltene Fraktion wurde an

Kieselgel (Chloroform/Methanol/25% Ammoniak, 8:2:0.5, Säule 30 x 5 cm) chromatographiert. Aus Kultivierungen im Fermenter erhielt man 6–7 mg/L Kirromycin (**24**).

12.2.2 Charakterisierung von Kirromycin (24)

N-[7-[5(R)-[7-[1,2-Dihydro-4-hydroxy-2-oxomethyl-3-pyridinyl]-6-methyl-7-oxo-1(E),3(E),5(E)-heptatrienyl]tetrahydro-3(S),4(R)-dihydroxyfuran-2(S)-yl]-6(S)-methoxy-5,7(R)-dimethyl-2(E),4(E)-heptadienyl]-α(S)-ethyl-5,5-dimethyltetrahydro-2(R),3(R),4(R)-trihydroxy-6(S)-[1(E),3(Z)-pentadienyl]-2H-pyran-2-acetamid

hellgelber Feststoff



$C_{43}H_{60}N_2O_{12}$ (796.95)

Anfärbeverhalten: blau (Anisaldehyd)

***R*$_f$** = 0.20 ($CHCl_3$/MeOH 85:15)

ESI-MS (positive Ionen)**:** 820 $[M+Na]^+$, 1616 $[2M+Na]^+$.

ESI-MS (negative Ionen)**:** 796 $[M-H]^-$, 1592 $[2M-H]^-$.

HR-EI-MS: berechnet *m/z*: 797.4219019 $[M+H]^+$,

gefunden *m/z*: 797.4218240 $[M+H]^+$ (Abweichung 0.09 ppm)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3410, 2922, 1636, 1561, 1465, 1420, 1382, 1220, 1096 cm^{-1}.

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 221 (1.41), 233 (1.53), 316 (0.72) nm

(MeOH/HCl): λ_{max} (lg ε) = 204 (0.98), 232 (1.51), 327 (0.65) nm

(MeOH/NaOH): λ_{max} (lg ε) = 222 (1.45), 232(1.50), 320(0.78) nm

^{1}H-NMR (CD_3OD, 600 MHz): δ = 0.81 (d, ^3J(H,H) = 7.0 Hz, 3H, 41-H_3), 0.89 (s, 6H, 46-H_3, 47-H_3), 0.92 (t, ^3J(H,H) = 7.5 Hz, 3H, 45-H_3), 1.66 (s, 3H, 43-H_3), 1.70 (m_c, 2H, 44-H_2), 1.73 (dd, ^3J(H,H) = 7.0, 1.5 Hz, 3H, 39-H_3), 1.98 (s, 3H, 40-H_3) 2.16 (dq, ^3J(H,H) = 3.0, 7.0 Hz, 1H, 19-H), 2.82 (dd, 1H, ^3J(H,H) = 11.0, 4.0 Hz, 28-H), 3.15 (s, 3H, 42-H_3), 3.35 (d, ^3J(H,H) = 7.5 Hz, 1H, 20-H), 3.57 (d, 1H, ^3J(H,H) = 4.0 Hz 31-H), 3.65 (d, 1H, ^3J(H,H) = 4.0 Hz 30-H), 3.68 (dd, ^3J(H,H) = 7.5, 4.0 Hz, 3H, 17-H), 3.86 (dd, ^3J(H,H) = 16.0, 6.0 Hz, 1H, 25-H_a), 3.93 (dd, ^3J(H,H) = 16.0, 6.0 Hz, 1H, 25-H_b), 4.17 (dd, ^3J(H,H) = 4, 4 Hz, 1H, 16-H) 4.30 (dd, ^3J(H,H) = 4.0, 4.0 Hz, 1H, 15-H), 4.21 (d, ^3J(H,H) = 6.0 Hz, 1H, 33-H) 4.28 (m, 1H, 14-H), 5.44 (dq, ^3J(H,H) = 11.0, 7.0 Hz, 1H, 38-H), 5.64 (dd, ^3J(H,H) = 15.0,

6.0 Hz, 1H, 35-H), 5.67 (td, ^3J(H,H) = 16.0, 6.0 Hz 1H, H-24), 5.96 (d, ^3J(H,H) = 11.0 Hz, 1H, 22-H), 5.99 (dd, ^3J(H,H) = 11.0, 1.5 Hz, 1H, 37-H) 6.05 (dd, ^3J(H,H) = 11.0, 7.0 Hz, 1H, 13-H), 6.09 (d, ^3J(H,H) = 7.0 Hz, 1H, 5-H), 6.42 (dd, ^3J(H,H) = 15.0, 11.0 Hz, 1H, H-12) 6.49 (dd, ^3J(H,H) = 15.0, 11.0 Hz, 1H, 23-H), 6.56 (m, 1H, 36-H), 6.58 (m, 1H, 9-H) 6.67 (dd, ^3J(H,H) = 16.0, 11.0 Hz, 1H, 10-H), 6.91 (d, ^3J(H,H) = 12.0 Hz, 1H, 11-H), 7.37 (d, ^3J(H,H) = 7.0 Hz, 1H, 6-H) ppm.

Atom-Nummer	**^{13}C-NMR, CD_3OD, 150.8 MHz δ_C [ppm]**	**^{13}C-NMR, Aceton-d_6 +2.5% D_2O, 150.8 MHz δ_C [ppm]**
1-NH	-	-
2	**164.6**	**176.8***
3	**112.6**	**100.3***
4	**169.9**	**164.2**
5	**102.6**	**106.3**
6	**137.6**	**139.1**
7	199.0	201.0
8	138.1	138.85
9	142.7	135.3
10	129.4	129.5
11	141.3	138.93
12	133.6	132.9
13	136.9	135.6
14	81.5	80.8
15	74.9	74.2
16	74.0	73.2
17	84.9	83.7
18-O	-	-
19	36.7	36.2
20	91.8	91.0
21	136.0	135.4
22	130.9	130.1*
23	128.1	127.4
24	131.0	130.9
25	42.0	41.35
26-NH	-	-
27	177.9	176.8*

Atom-Nummer	^{13}C-NMR, CD_3OD, 150.8 MHz δ_C [ppm]	^{13}C-NMR, Aceton-d_6 +2.5% D_2O, 150.8 MHz δ_C [ppm]
28	52.4	51.4
29	101.0	100.3*
30	71.3	70.6
31	73.96	72.9
32	39.9	39.5
33	77.3	76.3
34-O	-	-
35	130.49	130.5
36	127.7	126.8
37	130.52	130.1*
38	126.4	125.9
39	13.7	13.4
40	11.7	12.1
41	13.9	13.5
42	56.2	56.0
43	11.2	11.0
44	21.1	20.6
45	12.3	12.0
46	15.9	15.7
47	24.6	24.3

Tabelle 13: ^{13}C-NMR-Verschiebungen von Kirromycin (24) in CD_3OD und Aceton-d_6 mit 2.5% D_2O. Die C-Atome des Pyridonrings sind hervorgehoben. * Zuordnung austauschbar.

12.3 Biosyntheseuntersuchungen an Kirromycin (24)

12.3.1 Analyse des Fermentationsverlaufs von Tü 365

Kalibrierung der HPLC zur Bestimmung des Kirromycin-Gehaltes

Es wurden Lösungen von Kirromycin (**24**) in Methanol mit den Konzentrationen von 2.0 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 0.75 mg/ml, 0.50 mg/mL und 0.25 mg/mL hergestellt. Diese Proben wurden per HPLC (analyt./semipr. HPLC, Säule 1, Programm 1) analysiert, eine Eichgerade wurde ermittelt und ein kalibriertes Programm für Kirromycin (**24**) erstellt.

Fermentationskurve

Der Stamm Tü 365 wurde im Fermenter unter Standardbedingungen (siehe 12.1) kultiviert, wobei der Füllstand der Kulturbrühe durch Zugabe von autoklaviertem Leitungswasser reguliert wurde. Zur Bestimmung der zeitabhängigen Sekundärstoffproduktion von Kirromycin (**24**) wurden über das Probenentnahmerohr alle sechs Stunden 10 mL Kulturbrühe entnommen, erstmals nach Animpfen bis zur 72. Inkubationsstunde. Der pH-Verlauf wurde während der Fermentation mittels einer pH-Elektrode aufgenommen. Die erhaltenen Proben wurden mit gleichem Volumen Ethylacetat versehen und einmal ausgeschüttelt. Von der organischen Phase wurden 5 mL entnommen und das Lösungsmittel im Vakuum eingeengt. Die Rohextrakte wurden in 500 µL MeOH gelöst, zentrifugiert und man entnahm 150 µL für die Analyse mittels analytischer HPLC (Säule 1, Programm 1, siehe 8.2). Mit Hilfe der Kalibrierungsgrade konnte der Gehalt von Kirromycin (**24**) quantitativ über die Fermentation verfolgt werden (Abbildung 81).

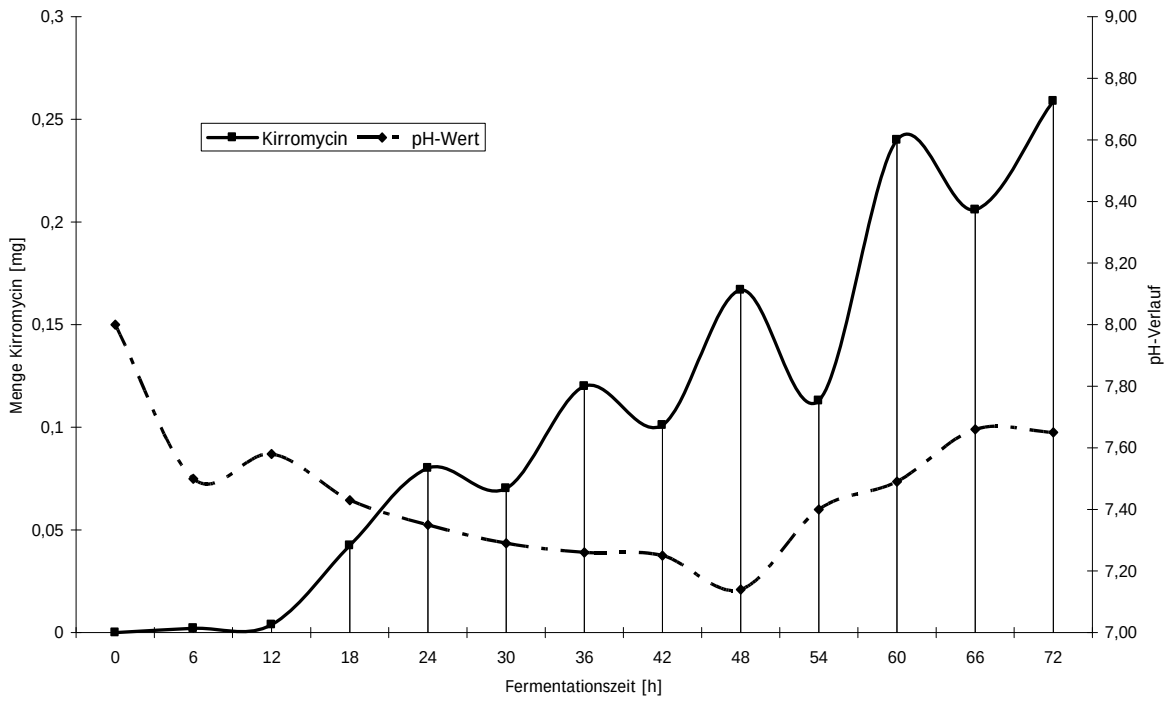


Abbildung 81: Fermentationskurve von Kirromycin (24) aus dem Stamm Tü 365.

12.3.2 Fütterungsexperimente mit markierten Vorläufern

Fütterungsexperiment mit [1-^{13}C]Natriumacetat

Das Fütterungsexperiment wurde analog zur Kultivierung im Fermenter durchgeführt. Die isotopenmarkierte Substanz wurde in 10 mL bidestilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit 0.5 N HCl auf pH = 7.0 eingestellt. Die Lösung wurde durch einen Sterilfilter gegeben und mit sterilem bidestilliertem Wasser auf 40 mL Gesamtvolumen verdünnt. Ab der 12. Stunde wurde der Vorläufer mittels einer Schlauchpumpe über einen Zeitraum von 12 h kontinuierlich in den Fermenter gegeben. Die Fermentation wurde nach der 48. Stunde abgebrochen. Die Aufarbeitung und Aufreinigung erfolgte nach dem oben beschriebenen Verfahren (siehe 12.1.3 und 12.2.1). Es wurden 700 mg/L (8.4 mmol/L) [1-^{13}C]Acetat verfüttert und 6.7 mg/L angereichertes Kirromycin (**24**) isoliert.

Fütterungsexperiment mit [U-$^{13}C_3{}^{15}$N]β-Alanin

Das Fütterungsexperiment wurde analog zur Kultivierung im Fermenter durchgeführt. Die isotopenmarkierte Substanz wurde in 10 mL bidestillierten Wasser gelöst und der pH-Wert mit 0.5 N NaOH auf ca. 7.5 eingestellt. Die Lösung wurde durch einen Sterilfilter gegeben und mit sterilem, bidestilliertem Wasser auf 40 mL Gesamtvolumen verdünnt. Ab der

12. Stunde wurde der Vorläufer mittels einer Schlauchpumpe über einen Zeitraum von 12 h kontinuierlich in den Fermenter gegeben. Die Fermentation wurde nach der 48. Stunde abgebrochen. Die Aufarbeitung und Aufreinigung erfolgte nach dem Standardverfahren (siehe 12.1.3 und 12.2.1). Es wurden 250 mg/L (2.7 mmol/L) [U-$^{13}C_3{}^{15}N$]β-Alanin verfüttert und 6.0 mg/L angereichertes Kirromycin (**24**) isoliert.

12.4 Derivatisierung von Kirromycin (24)

a) Methylierung von Kirromycin (24) mit Methyliodid

Kirromycin (**24**) (1 eq, 5 mg, 0.0063 mmol) wurde in trockenem Aceton (1 mL) gelöst. Anschließend fügte man Dikaliumcarbonat (K_2CO_3, 15 eq, 12.4 mg, 0.09 mmol) und Methyliodid (32 eq, 12 µL, 0.192 mmol) hinzu. Die Reaktionsmischung wurde unter Reflux (ca. 56 °C) für 18 h gerürt, anschließend wurde das K_2CO_3 durch Filtration von der Reaktionsmischung abgetrennt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.[168]
Das entstandene Reaktionsprodukt wurde mittels HPLC-ESI-MS analysiert (c = 5 mg/mL, Säule 2, Programm 2).

b) Methylierung mit etherischer Diazomethanlösung

Erster Ansatz: Kirromycin (1.1 mg 0.0014 mmol) wurde in MeOH (5.0 mL) gelöst und alle 15 min mit Diazomethanlösung (0.3-0.6 mL) bei 0 °C versetzt bis eine intensivgelbe Farbe vollständig erhalten blieb. Anschließend wurde die Reaktion für ca. 2 h bei RT rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Die Auswaage der Reaktionsmischung betrug 1.6 mg (0.002 mmol). Das entstandene Reaktionsprodukt wurde mittels HPLC-ESI-MS analysiert (c = 5 mg/mL, Säule 2, Programm 2).

Ansatz A: Kirromycin (4.9 mg, 0.0062 mmol) wurde in MeOH (3.0 mL) gelöst und bei konstanten 0 °C in stündlichen Abständen mit etherischer Diazomethanlösung (4 x 0.5 mL) versetzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für weitere 3 h bei 0 °C gehalten und gerührt. Die Reaktion wurde über Nacht bei 4 °C gelagert und anschließend im 2 h Takt mit Diazomethan (3 x je 1.0 mL) versetzt. Die Reaktion wurde für 3 h bei Raumtemperatur rühren gelassen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Auswaage der Reaktionsmischung betrug 6.1 mg (0.0077 mmol). Das entstandene Reaktionsprodukt wurde mittels HPLC-ESI-

MS analysiert (c = 5 mg/mL, Säule 2, Programm 2).

Ansatz B: Kirromycin (4.9 mg, 0.0062 mmol) wurde in Aceton (3 mL) suspendiert und bei konstanten 0 °C, wie in Ansatz A beschrieben, mit Diazomethan behandelt. Die Auswaage der Reaktionsmischung betrug 5.7 mg. Das entstandene Reaktionsprodukt wurde mittels HPLC-ESI-MS analysiert (c = 5 mg/mL, Säule 2, Programm 2).

Ansatz C: Kirromycin (8 mg, 0.0085 mmol) wurde in Ethanol p.a. (5 mL) gelöst und bei konstanten 0 °C dreimal in stündlichen Abständen mit etherischer Diazomethanlösung (3.0 mL) versetzt. Die Temperatur wurde 2 h beibehalten und die Reaktionsmischung wurde anschließend für 3 h bei RT gerührt. Die Auswaage der Reaktionsmischung betrug 10.6 mg. Das entstandene Reaktionsprodukt wurde mittels HPLC-ESI-MS analysiert (c = 5 mg/mL, Säule 2, Programm 2).

Isolierung von methyliertem Kirromycin (65, 66)

Es wurden 5 mg Kirromycin (0.0063 mmol) (**24**) analog zu **Ansatz C** (siehe oben) mit etherischer Diazomethanlösung behandelt. Die Auswaage der Reaktionsmischung betrug 4.7 mg. Das entstandene Reaktionsprodukt wurde mittels HPLC-ESI-MS analysiert (c = 4 mg/mL, Säule 2, Programm 2). Das Dreikomponentengemisch wurde über präparative HPLC chromatographiert (präp. HPLC, Säule 8, Programm 4).

13 Screening ausgewählter Mutanten-Stämme des Kirromycin-Produzenten

Folgende Mutanten-Stämme wurden vom Arbeitskreis T. WEBER (Universität Tübingen) zugesandt:
TL-kirOI::thio, kirAVI::thio, orf(-1)::thio (benötigter Antibiotikum-Zusatz: Thiostrepton), 1C24u, TL-kirB-1, orf(+1)::pA18 (benötigter Antibiotikum-Zusatz: Apramycin) und eine Komplementationsmutante kirOI::thio+pSETermE+kirOI (benötigte Antibiotika-Zusätze: Thiostrepton und Apramycin).

Stammhaltung als Glycerinkultur (Glycerin-Einlagerung):
Die Stammhaltung der bereitgestellten Mutanten-Stämme erfolgte als Glycerinkultur. Man fermentierte Flüssigkulturen, die mit den entsprechenden Antibiotika-Zusätzen versehen waren, für 48 h und pipettierte ca. 0.5-0.8 mL der Kulturbrühe in ein 2 mL Kryoröhrchen und fügte dieselbe Menge an Glycerin unter sterilen Bedingungen hinzu. Die Suspension wurde gut durchmischt und anschließend bei -20 °C gelagert.

13.1 Kultivierung und Aufarbeitung

13.1.1 Kultivierung

Vorkulturen
Die Kultivierung der Mutanten-Stämme erfolgte in 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, die mit einem Schaumstoffstück verschlossen wurden. Jeder Kolben wurde mit 150 mL KP-Nährmedium befüllt und nach Sterilisation bei ca. 40 °C mit 150 µL der jeweiligen Antibiotika-Stammlösung (thio^{50}, Thiostrepton in DMSO, c = 50 mg/mL bzw. apra^{50} Apramycin in bidest. H_2O, c = 50 mg/mL) versehen. Anschließend beimpfte man mit einem 1 cm^2 großen Stück einer gut bewachsenen Agarplatte bzw. 1 mL einer Glycerin-Einlagerung. Die Vorkultur wurde bei 30 °C und 180 rpm für 48 h bzw. 72 h in einem Rundschüttler kultiviert.

Hauptkulturen

In 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen wurden 150 mL KP-Nährmedium nach Sterilisation mit 7.5 mL der Vorkulturlösung beimpft. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte für 72 h bei 30 °C und 180 rpm.

13.1.2 Variation der Kultivierungsbedingungen

Variante A: (Variation der Vor- und Hauptkultur)

Die Vorkulturen der Mutanten-Stämme erfolgten in 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, die mit einem Schaumstoffstück verschlossen wurden. Jeder Kolben wurde mit 200 mL S-Medium befüllt und nach Sterilisation bei ca. 40 °C mit 100 µL der jeweiligen Antibiotika-Stammlösung (thio^{50} bzw. apra^{50}) versehen. Anschließend entnahm man 1 mL einer Glycerin-Einlagerung und beimpfte. Die Vorkultur wurde bei 28 °C und 180 rpm für 72 h in einem Rundschüttler kultiviert.

Die Hauptkulturen wurden in 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen inkubiert. Diese wurden mit 200 mL Nährmedium (Medium-S) versehen, nach Sterilisation mit 7.5 mL der Vorkulturlösung beimpft, und es wurden 75 µL der jeweiligen Antibiotika-Stammlösung beigefügt. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte für 72 h bei 28 °C und180 rpm.

Variante B: (Variation der Hauptkultur)

Für die Hauptkulturen wurden in 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen 150 mL KP-Medium nach Sterilisation mit 7.5 mL der Vorkulturlösung beimpft und 150 µL des jeweiligen Antibiotikums unter sterilen Bedingungen beigefügt. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte für 72 h bei 30 °C und 180 rpm.

Variante C: (Variation der Hauptkultur)

Für die Hauptkulturen wurden in 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen 150 mL Nährmedium (KP-Medium, Medium S, M2Ca-Medium) nach Sterilisation mit 7.5 mL der Vorkulturlösung beimpft und 75 µL des jeweiligen Antibiotikums beigefügt. Die Inkubation der Hauptkultur erfolgte für 72 h bei 30 °C und180 rpm.

Variante D: (Variation der Hauptkultur durch mögliche Promotoren)

Für die Hauptkulturen wurden in 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen und Metallspiralen 150 mL KP-Medium nach Sterilisation mit 7.5 mL der Vorkulturlösung beimpft. Die Zusätze β-Alanin (6 mmol/L; Endkonz. in Kolben), Malonsäure (pH =6.8-7.1; 6 mmol/L; Endkonz. in Kolben) und DMSO (6 mmol/L; Endkonz. in Kolben) wurden mittels

„pulse-feeding“-Verfahren in drei Schritten nach der Inkubation (12 h, 24 h und 48 h) unter sterilen Bedingungen der Kultivierung beigefügt. Die Fermentation der Hauptkultur erfolgte für 72 h bei 30 °C und180 rpm.

13.1.3 Aufarbeitung

Die Kulturbrühe wurde mit 0.5 N bzw. 1 N HCl auf pH = 5 eingestellt, mit Celite (ca. 3 gehäufte Esslöffel auf 1 L Kulturbrühe) versetzt und filtriert. Das Mycel wurde verworfen. Das Kulturfiltrat wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert (Volumina Ethylacetat:Kulturfiltrat ca. 1:1) und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die erhaltenen Rohextrakte wurden in Methanol gelöst und mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC-ESI-MS analysiert (c = 5 mg/mL**,** Säule 2, Programm 2).
Die Rohprodukte wurden gelchromatographisch an Sephadex LH-20 (Säule: 100 x 2.5 cm, Methanol bzw. Aceton) vorgereinigt und die entstandenen Fraktionen in Methanol gelöst und mittels Dünnschichtchromatographie und LC-MS untersucht (c = 3-4 mg/mL, Säule 2, Programm 2).

C Literaturverzeichnis

[1] K. C. Nicolau, D. Gray, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 783–785.

[2] K. C. Nicolau, D. Gray, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 761–763.

[3] D. Hoffmeister, A. Bechthold, S. Pelzer, W. Wohlleben, *Biospektrum* (Sonderausgabe) **2002**, 508–511.

[4] H. G. Floss, J. M. Beale, *Angew. Chem.* **1989**, *101*, 147–179.

[5] H. G. Floss, J. M. Beale, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1989**, *28*, 146–177.

[6] P. E. Fleming, H. G. Floss, M. Haertel, A. R. Knaggs, U. Mocek, K. D. Walker, *Pure and Applied Chem.* **1994**, *66*, 2045–2048.

[7] H. Simon, H. G. Floss, *Bestimmung der Isotopenverteilung in markierten Verbindungen*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, **1967**.

[8] H. B. Bode, S. C. Wenzel, H. Irschik, G. Höfle, R. Müller, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 4257–4262.

[9] H. B. Bode, S. C. Wenzel, H. Irschik, G. Höfle, R. Müller, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 4163–4167.

[10] J. Staunton, K. J. Weissmann, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380–416.

[11] H. B. Bode, P. Meiser, T. Klefisch, N. Socorro d. J. Cortina, D. Krug, A. Göhring, G. Schwär, T. Mahmud, Y. A. Elnakady, R. Müller, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2139–2144.

[12] E. J. Corey, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1724–1741.

[13] E. J. Corey, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1650–1667.

[14] S. Laschat, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 313–315

[15] S. Laschat, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1996**, *35*, 289–291.

[16] A. Ichihara, H. Oikawa, *Curr. Org. Chem.* **1998**, *2*, 365–394.

[17] D. Hilvert, K. W. Hill, K. Nared, M.-T. M. Auditor, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9261–9263.

[18] K. Auclair, A. Sutherland, J. Kennedy, D. J. Witter, J. P. Van den Heever, C. R. Hutchinson, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11519–11520.

[19] H. Oikawa, K. Katayama, Y. Suzuki, A. Ichihara, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1321–1322.

[20] H. Oikawa, T. Tokiwano, *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 321–352.

[21] T. Ose, K. Watanabe, T. Mie, M. Honma, H. Watanabe, M. Yao, H. Oikawa, I. Tanaka, *Nature* **2003**, *422*, 185–189.

[22] T. Ose, K. Watanabe, M. Yao, M. Honma, H. Oikawa, I. Tanaka, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2004**, *60*, 1187–1197.

[23] B. Seelig, A. Jaschke, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 167–176.

[24] E. M. Stocking, R. M. Williams, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 3078–3115.

[25] E. M. Stocking, R. M. Williams, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3186–3223.

[26] K. Watanabe, T. Mie, A. Ichihara, H. Oikawa, M. Honma, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 38393–38401.

[27] A. W. Alberts, J. Chen, G. Kuron, V. Hunt, J. Huff, C. Hoffman, J. Rothrock, M. Lopez, H. Joshua, E Harris, A. Patchett, R. Monaghan, S. Currie, E. Stapley, G. Albers-Schönberg, O. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, J. Liesch, J. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, *77*, 3957–3961.

[28] E. S. Istvan, J. Deisenhofer, *Science* **2001**, *292*, 1160–1164.

[29] C. R. Hutchinson, J. Kennedy, C. Park, S. Kendrew, K. Auclair, J. Vederas, *Antonie van Leeuwenhoek* **2000**, *78*, 287–295.

[30] J. K. Chan, R. N. Moore, T. T. Nakashima, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 3334–3336.

[31] R. N. Moore, G. Bigam, J. K. Chan, T. Hogg, T. T. Nakashima, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3694–3701.

[32] J. Kennedy, K. Auclair, S. G. Kendrew, C. Park, J. C. Vederas, C. R. Hutchinson, *Science* **1999**, *284*, 1368–1372.

[33] A. Ichihara, H. Tazaki, S. Sakamura, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5373–5376.

[34] H. Oikawa, T. Yokota, I. Abe, S. Sakamura, Y. Yoshizawa, J. C. Vederas, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 1282–1284.

[35] P. B. Reese, B. J. Rawlins, S. E. Ramer, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 316–318.

[36] C. A. Townsend, S. W. Brobst, S. E. Ramer, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 318–319.

[37] H. Oikawa, T. Yokota, A. Ichihara, S. Sakamura, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 1284–1285.

[38] H. Oikawa, K. Katayama, K. Suzuki, A. Ichihara, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 1321–1322.

[39] A. Ichihara, H. Oikawa, K. Hayashi, S. Sakamura, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2907–2908.

[40] H. Oikawa, A. Ichihara, S. Sakamura, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 814–815.

[41] H. Oikawa, A. Ichihara, S. Sakamura, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 600–602.

[42] S. Miki, Y. Sato, H. Tabuchi, H. Oikawa, A. Ichihara, S. Sakamura, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 1228–1229.

[43] K. Watanabe, T. Mie, A. Ichihara, H. Oikawa, M. Honma, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 530–538.

[44] C. Ruch, W. Guimaraes, M. Udier-Blagovic, W. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3577–3588.

[45] A. A. Bell, R. D. Stipanvic, D. H. O'Brien, P. A. Fryxell, *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1297–1305.

[46] C. H. Heathcock, S. Piettre, R. B. Ruggeri, J. A. Ragan, J. C. Kath, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2554–2566.

[47] D. Li, E. Lobkovsky, J. A. Porco, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10484–10485.

[48] G. Majetich, Y. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4979–4980.

[49] I. Papastavrou, *Dissertation*, Georg-August Universität (Göttingen), **2000**.

[50] A. Textor, *Diplomarbeit*, Georg-August-Universität (Göttingen), **2004**.

[51] K. T. Weber, *Dissertation*, Eberhard-Karls-Universität (Tübingen), **2004**.

[52] K. J. Laiple, *Diplomarbeit*, Eberhard-Karls-Universität (Tübingen), **2004**.

[53] K. J. Laiple, *Dissertation*, Eberhard-Karls-Universität (Tübingen), **2007**.

[54] E. K. Proß, *Diplomarbeit*, Eberhard-Karls-Universität (Tübingen), **2006**.

[55] M. Langbecker, *Diplomarbeit*, Eberhard Karls Universität (Tübingen), **1999**.

[56] X. Mao, Y. Shen, L. Yang, S. Chen, Y. Yang, J. Yang, H. Zhu, Z. Deng, D. Wei, *Process Biochem.* **2007**, *42*, 878–883.

[57] S. W. Meyer, *Dissertation*, Georg-August-Universität (Göttingen), **2003**.

[58] W. Crueger, A. Crueger, *Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie*, Oldenburg Verlag, München, **1984**.

[59] J. C. Rosa, A. Baptista Neto, C. O. Hokka, A. C. Badino, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2005**, *27*, 99–104.

[60] H. Umezawa, S. Hayano, K. Maeda, Y. Ogata, Y. Okami, *Jpn. Med. J.* **1950**, *3*, 111–117.

[61] S. Nakamura, E. L. Wang, M. Murase, K. Maeda, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1959**, *12*, 55–58.

[62] S. Nakamura, K. Maeda, T. Osato, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1957**, *10*, 265–266.

[63] K. Yagishita, *J. Antibiot.* **1960**, *13*, 83–96.

[64] A. Textor, I. Papastavrou, J. Siewert, J. Magull, A. Kulik, H. P. Fiedler, P. von Zezschwitz, S. Grond, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 7416–7423.

[65] N. Kawahara, S. Nakjima, K. Kawai, *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1546–1548.

[66] T. Abe, H. Noma, H. Noguchi, I. Abe, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 8727–8730.

[67] G. Luo, R. Pieper, A. Rosa, C. Khosla, D. E. Cane, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 995–999.

[68] E. Pretsch, P. Bühlmann, C. Affolter, M. Badertscher, *Spektroskopische Daten zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen*, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, **2001**.

[69] H. Laatsch, *AntiBase - a database for the identification of natural products*, Chemical Concepts, Weinheim, **2006**.

[70] M. Koenuma, H. Kinashi, N. Otake, *J. Antibiot.* **1974**, *27*, 801–804.

[71] R. K. Hill, P. J. Foley, Jr., L. A. Gardella, *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 2330–2335.

[72] S. Ishiyama, *J. Antibiot.* **1954**, *7*, 82–87.

[73] H. Umezawa, T. Takeuchi, K. Nitta, Y. Okami, T. Yamamoto, S. Yamaoka, *J. Antibiot.* **1953**, *6*, 147–152.

[74] S. Kondo, H. Nakamura, Y. Ikeda, H. Naganawa, K. Maeda, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 363–365.

[75] K. Maeda, S. Kondo, *J. Antibiot.* **1958**, *11*, 37–56.

[76] T. Hara, Y. Yamada, E. Akita, *J. Antibiot.* **1957**, *10*, 80–81.

[77] T. Hara, Y. Yamada, E. Akita, *J. Antibiot.* **1957**, *10*, 66–69.

[78] T. Hara, Y. Yamada, E. Akita, *J. Antibiot.* **1957**, *10*, 62–65.

[79] G. Helmchen, K. Ihrig, H. Schindler, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 183–186.

[80] G. Linz, J. Weetman, A. F. Abdel Hady, G. Helmchen, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 5599–

5602.

[81] I. Ikeda, K. Kanematsu, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 453–454.

[82] M. Mikolajczyk, R. Zurawinski, P. Kielbasinski, W. Wieczorek, J. Blaszczyk, *Synthesis* **1997**, 356–365.

[83] Dictionary of Natural Products on CD-Rom, Vol. 16:1, Autorenkollektiv, Chapman & Hall / CRC, Boca Raton (FL), **2007**.

[84] J. A. Marshall, S. F. Brady, N. H. Andersen, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1974**, *31*, 283–376.

[85] G. Guella, F. Dini, F. Pietra, *Angew. Chem. Int., Ed. Eng.l* **1999**, *38*, 1134–136.

[86] G. Guella, F. Dini, F. Pietra, *Angew. Chemie* **1999**, *111*, 1217–1220.

[87] I. Calis, H. Krimzibekmez, D. Tasdemir, P. Ruedi, *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 611–6118.

[88] H. Minato, R. Fujioka, K. Takeda, *Chem. Pharm. Bull.* **1971**, *19*, 638–640.

[89] K. Nawamaki, K. Masanori, *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1175-1182.

[90] R. C. Anderson, D. M. Gunn, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 27–28.

[91] J. Y. Ueda, L. Imamura, Y. Tezuka, Q. L. Tran, M. Tsuda, S. Kadota, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3571–3574.

[92] U. Warmers, W. A. König, *Phytochemistry* **1999**, *52*, 695-704.

[93] A. Murai, S. Shingo, A. Osada, N. Katsui, T. Masamune, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 32–33.

[94] K. B. G. Torsell, *Natural Product Chemistry, 2nd Edition*, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, **1997**.

[95] A. Stoessl, J. B. Stothers, *Can. J. Chem.* **1983**, *61*, 1766–1770.

[96] D. Caine, S. L. Graham, T. T. Vora, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3798–3802.

[97] C. M. Starks, K. Back, J. Chappell, J. P. Noel, *Science* **1997**, *277*(5333), 1815–1820.

[98] I. Scott, C. A. Townsend, K. Okada, M. Kajiwara, R. J. Cushley, P. J. Whitman, *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 8069–8080.

[99] T. S. S. Chen, C. Chang, H. G. Floss, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2661–2665.

[100] M. Gerlitz, P. Hammann, R. Thiericke, J. Rohr, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4030–4033.

[101] *Biochemical Pathways*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, **1999**.

[102] P. Kamoun, *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 175–176.

[103] J. W. Vrijbloed, K. Zerbe-Burkhardt, A. Ratnatilleke, A. Grubelnik-Leiser, J. A. Robinson, *J. Baceteriol.* **1999**, *181*, 5600–5605.

[104] T. Schuhmann, S. Grond, *J. Antibiot.* **2004**, *60*, 655–661.

[105] T. Schuhmann, D. Vollmar, S. Grond, *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 52–60.

[106] A. D. Grund, J. C. Ensign, *Arch. Mikrobiol.* **1978**, *118*, 279–288.

[107] E. M. Butterworth, C. M. Gilmour, C. H. Wang, *J. Bacteriol.* **1955**, *69*, 725–727.

[108] M. A. Osman, J. Seibl, E. Pretsch, *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 3007–3011.

[109] C. Thrope, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 148–151.

[110] D. E. Cane, W. Tan, W. R. Ott, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 527–535.

[111] P. D. Boyle, Growing Crystals That Will Make Your Crystallographer Happy, in http://www.xray.ncsu.edu/GrowXtal.html, **2007**.

[112] J. Siewert, *Dissertation*, Georg-August-Universität Göttingen, **2007**.

[113] J. Siewert, A. Textor, S. Grond, P. von Zezschwitz, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 7424–7431.

[114] M. Vandewalle, J. Van der Eycken, W. Oppolzer, C. Vullioud, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 4035–4043.

[115] J. Barber, A. E. Derome, T. D. Howard, L. Lian, G. Tebb, *Magn. Reson. Chem.* **1989**, *27*, 748–753.

[116] H. Maehr, M. Leach, T. H. Williams, J. F. Blount, *Can. J. Chem.* **1980**, *58*, 501–526.

[117] C. Vos, P. E. J. Verwiel, *Tetrahedron Lett.* **1973**, *25*, 2823–2836.

[118] H. Wolf, H. Zähner, *Arch. Mikrobiol.* **1972**, *83*, 147–154.

[119] H. Wolf, H. Zähner, K. Niehaus, *FEBS Lett* **1972**, *21*(3), 347–350.

[120] J. Berger, H. Lehr, S. Teitel, H. Maehr, E. Grunberg, *J. Antibiot.* **1973**, *26*, 15–22.

[121] H. Maehr, M. Leach, T. H. Williams, W. Benz, J. F. Blount, A. Stempel, *J Am Chem Soc* **1973**, *95*, 8448–8449.

[122] H. Maehr, M. Leach, L. Yarmchuk, A. Stempel, *J Am Chem Soc* **1973**, *95*, 8449–8450.

[123] R. S. Dewey, B. H. Arison, J. Hannah, D. H. Shih, G. Albers-Schönberg, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1691-1698.

[124] R. Wax, W. Maiese, R. Weston, J. Birnbaum, *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 670-673.

[125] C. Vos, J. Den Admirant, J. L. Van Os, H. M. Jongsma, H. J. Kooreman, Dihydromocimycin Antibiotics, in United States Patent, Vol. US4062948, Gist-Brocades N.V., Delft (NL), **1977**.

[126] R. S. Dewey, O. D. Hensens, A. W. Douglas, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 838–843.

[127] S. B. Zimmermann, J. H. Chalmers, R. S. Dewey, E. O. Staoley, *J. Antibiot.* **1979**, *32*, 665–666.

[128] P. Ferrari, D. Edwards, G. G. Gallo, E. Selva, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1359–1366.

[129] E. Selva, G. Beretta, R. Pallanza, B. P. Goldstein, M. Berti, D. M. F. Edwards, M. Denaro, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1349–1358.

[130] V. P. Gullo, S. B. Zimmermann, R. S. Dewey, O. Hensens, P. J. Cassidy, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1705–1707.

[131] I. Hummel, *Diplomarbeit*, Georg-August-Universität Göttingen, **1977**.

[132] I. Thein, *Dissertation*, Eberhard Karls Universität Tübingen, **1977**.

[133] M. R. Jefson, J. Bordner, C. P. Reese, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1610–1618.

[134] M. S. Pacey, M. R. Jefson, L. H. Huang, W. P. Cullen, H. Maeda, J. Tone, S. Nishiyama, K. Kaneda, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1453–1459.

[135] G. T. Carter, D. W. Phillioson, R. R. West, D. B. Borders, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6588–6595.

[136] W. M. Maiese, M. P. Lechevalier, H. A. Lechevalier, J. Korshalla, J. Goodman, M. J. Wildey, N. Knuck, S. D. Conner, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 1489–1493.

[137] J. E. Hochlowski, M. H. Buytendorp, D. N. Whittern, A. M. Buko, R. H. Chen, J. B.

McAlpine, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1300–1315.

[138] M. Jackson, J. P. Karwowski, R. J. Theriault, M. L. Maus, W. L. Kohl, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1293–1299.

[139] L. Gastaldo, F. Marinelli, C. Acquarella, E. Restelli, C. Quarta, *J. Ind. Microbiol.* **1996**, *16*, 305–308.

[140] M. Brünning, *Diplomarbeit*, Georg-August-Universität Göttingen, **1996**.

[141] J. Berger, Antibiotic X-5108 for Stimulating Growth, in United States Patent, Vol. 3657421, Hoffmann, **1972**.

[142] C. Vos, J. Den Admirant, Antibiotic MYC 8003 and Process for producing same, in United States Patent, Vol. 3927211, Gist-Brocades N.V., Delft (NL), **1973**.

[143] B. Clough, K. Rangachari, M. Strath, P. R. Preiser, R. J. Wilson, *Protist* **1999**, *150*, 189–195.

[144] L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg, **1990**.

[145] A. Parmeggiani, P. Nissen, *FEBS Lett* **2006**, *580*, 4576–4581.

[146] R. Oyama, T. Watanabe, H. Hanzawa, T. Sano, T. Sugiyama, K. Izaki, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58*, 1914–1917.

[147] T. Watanabe, J. Shima, K. Izaki, T. Sugiyama, *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 575–576.

[148] T. Watanabe, T. Sugiyama, K. Chino, T. Suzuki, S. Wakabayashi, H. Hayashi, R. Itami, J. Shima, K. Izaki, *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 476–484.

[149] T. Watanabe, T. Sugiyama, K. Izaki, *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 496–498.

[150] T. Watanabe, T. Sugiyama, M. Takahashi, J. Shima, K. Yamashita, K. Izaki, K. Furihata, H. Seto, *Agric. Biol Chem.* **1990**, *54*, 259–261.

[151] T. Watanabe, T. Sugiyama, M. Takahashi, J. Shima, K. Yamashita, K. Izaki, K. Furihata, H. Seto, *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 470–475.

[152] R. J. Smith, D. H. Williams, J. C. J. Barna, I. R. McDermott, K. D. Haegele, F. Pirriou, J. Wagner, W. Higgins, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2849–2857.

[153] J. Kettenring, L. Colombo, P. Ferrari, P. Tavecchia, M. Nebuloni, K. Vekey, G. G. Gallo, E. Selva, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 702–715.

[154] E. Selva, G. Beretta, N. Montanini, G. S. Saddler, L. Gastaldo, P. Ferrari, R. Lorenzetti, P. Landini, F. Ripamonti, B. P. Goldstein, et al., *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 693–701.

[155] E. Cundliffe, *Ann. Rev. Microbiol.* **1989**, *43*, 207–233.

[156] A. Parmeggiani, I. M. Krab, T. Watanabe, R. C. Nielsen, C. Dahlberg, J. Nyborg, P. Nissen, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 2893–2900.

[157] T. Hogg, J. R. Mesters, R. Hilgenfeld, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2002**, *3*(1), 121–131.

[158] A. Parmeggiani, I. M. Krab, S. Okamura, R. C. Nielsen, J. Nyborg, P. Nissen, *Biochem.* **2006**, *45*, 6846–6857.

[159] C. M. Liu, H. Maehr, M. Leach, M. Liu, P. A. Miller, *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 416–419.

[160] C. M. Liu, T. H. Williams, R. G. Pitcher, *J. Antibiot.* **1979**, *32*, 414–417.

[161] G. Darland, B. Arison, L. Kaplan, *J. Ind. Microbiol.* **1991**, *8*, 265–271.

[162] J. B. K. Neilsen, *J. Cell. Biochem.* **1990**, *44* (Suppl. S14A; CC317), 119.

[163] X. H. Chen, A. Koumoutsi, R. Scholz, A. Eisenreich, K. Schneider, I. Heinemeyer, B. Morgenstern, B. Voss, W. R. Hess, O. Reva, H. Junge, B. Voigt, P. R. Jungblut, J. Vater, R. Süssmuth, H. Liesegang, A. Strittmatter, G. Gottschalk, R. Borriss, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1007–1014.

[164] K. Schneider, X. H. Chen, J. Vater, P. Franke, G. Nicholson, R. Borriss, R. D. Süssmuth, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1417–1423.

[165] K. T. Weber, K. J. Laiple, E. K. Proß, A. Textor, S. Grond, K. Wenzel, S. Pelzer, A. Vente, W. Wohlleben, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 175–188.

[166] R. Reid, M. Piagentini, E. Rodriguez, G. Ashley, N. Viswanathan, J. Carney, D. V. Santi, C. R. Hutchinson, R. McDaniel, *Biochem.* **2003**, *42*, 72–79.

[167] J. B. K. Nielsen, *J. Cell. Biochem.* **1990**, *44* (Suppl. S14A; CC317), 119.

[168] W. E. Campbell, B. Davidowitz, E. Graham, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1303–1306.

[169] E. Merck, *Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie*, Merck, Darmstadt, **1998**.

[170] H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, Thieme Verlag, Stuttgart, **1992**.

[171] M. Okanishi, K. Suzuki, H. Umezawa, *J. Gen. Microbiol.* **1974**, *80*, 389–400.

[172] Y. Kawai, M. Hayashi, N. Tokitoh, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 465–467.

[173] K. Chandramohan, K. Ravikumar, *J. Chem. Crystallogr.* **1999**, *29*, 121–125.

[174] S. E. Boiadejiev, R. V. Person, G. Puzicha, C. Knobler, E. Maverick, K. N. Trueblodd, D. A. Lightner, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*(26), 10123-10133.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Hans-Jörg Langer, dessen tatkräftige Unterstützung die vorliegende Arbeit in diesem Rahmen erst möglich machte.
Ich möchte mich auch bei meiner Mentorin Dr. Stephanie Grond bedanken, die aufgrund ihres Engagements und ihrer Spontanität mich während meiner Forschungsarbeiten stets inspirierte.
Ebenso möchte ich allen Mitgliedern der NMR-Abteilung für die Aufnahme der NMR-Spektren danken, insbesondere Herrn Machinek der mir bei einigen Problemen gute Hilfestellung leisten konnte. Martin Weitemeyer, Carola Zolke und Christiane Siebert danke ich für die Geduld bei der Bearbeitung vieler Spektren und deren Spreizungen. Natürlich bedanke ich mich auch herzlich bei unserem NMR-Team (Inken Plitzko, Sandra Lösgen und Melanie Quitschau), die einige Wochenenden für die Aufnahme meiner Spektren opfern mussten.
György Udvarnoki, Frau Krökel und Herrn Frauendorf gilt mein Dank für die Aufnahme der Massenspektren. Für die HPLC-ESI-MS-Messungen bedanke ich mich ganz herzlich bei Luise Hoffmann, Nadine Czempinski und Daniel Vollmar.
Für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich bei Marko Gentzsch, Melanie Quitschau, Philip Kössler, Frank Surup und Daniel Vollmar.
Allen Mitgliedern des Arbeitskreises GROND/ZEECK ein großes Dankeschön für die Hilfsbereitschaft, das gute Arbeitsklima und die schönen gemeinsamen Stunden bei der Kaffeepause.
Der Besetzung des früheren Labors Z-3 Hans-Jörg, Sandra, Jutta und Inken danke ich für eine schöne Arbeitsatmosphäre im Labor. Ebenso danke ich Melli, Marko, Philp und Adrijana für die herzliche Aufnahme ins Labor Z-5.

An dieser Stelle auch ein besonderer Dank an Madlen, Mareike, Marko und Leif, die mir viele schöne Stunden außerhalb der Universität bescherten. Dankeschön an Marko, Lui und Melli, für die schöne Zeit innerhalb der Uni.
Der größte Dank gilt meinen Eltern, Geschwistern und Malte für die ständige Unterstützung während des Studiums und vor allem dafür, dass sie immer für mich da waren.

Lebenslauf

Am 25. Januar 1979 wurde ich, Adriana Textor, als drittes von drei Kindern des Orthopäden Gerhard Textor und seiner Ehefrau Claudia, geb. Golubovic, in Göttingen geboren. Ich besitze die deutsche Staatsbürgerschaft.

In der Zeit von Juli 1986 bis Juli 1990 besuchte ich die Grundschule Harleshausen in Kassel. Ab August 1990 war ich Schüler des Wilhelmsgymnasiums in Kassel, dessen Besuch ich im Mai 1998 mit der Allgemeinen Hochschulreife abschloss.

Zum Wintersemester 1998/1999 immatrikulierte ich mich an der Georg-August-Universität zu Göttingen im Fach Chemie. Die Diplomvorprüfung bestand ich im Oktober 2001. Im Wintersemester 2003/2004 begann ich unter Leitung von Herrn Prof. A. Zeeck und Dr. Stephanie Grond mit meiner Diplomarbeit zum Thema „Struktur und Isolierung von Spirodionsäure“. Die Diplomhauptprüfung bestand ich am 12. November 2004 mit der Note „gut“.

Von Dezember 2004 bis November 2007 fertigte ich die vorliegende Arbeit am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. A. Zeeck und Dr. Stephanie Grond an.

Göttingen, 12. November 2007

Adriana Textor