Untersuchungen zur Wirkstoffproduktion extremophiler Mikroorganismen sowie Biosynthese und Derivatisierung ausgewählter mikrobieller Naturstoffe

Dissertation

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

vorgelegt von

Adrijana Kubiček-Pejić

aus Tuzla

Bosnien und Herzegowina

Göttingen 2007

D7

Referent: PD. Dr. S. Grond

Korreferent: Prof. Dr. L. Ackermann

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2007

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen in der Zeit von November 2003 bis November 2007 unter der Leitung von Frau PD Dr. Stephanie Grond durchgeführt.

Frau PD Dr. S. Grond danke ich für die interessante Aufgabenstellung, ihr stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie für das entgegengebrachte Vertrauen.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Isolierung, Charakterisierung und chemischen Derivatisierung von Naturstoffen aus extremophilen Mikroorganismen und Streptomyceten.

Da über die Fähigkeiten extremophiler Mikroorganismen zur Produktion von Sekundärmetaboliten nur wenig bekannt war, wurde im Rahmen eines DBU-Verbundprojekts dieses mittels eines chemischen und biologischen Screenings genauer untersucht. Durch Einsatz heterologer Expressionssysteme wurden Wirtsstämme in Kultur genommen und unter optimierten Bedingungen fermentiert. Ausgewählte Isolate wurden auf antimikrobielle und cytotoxische Wirkung analysiert, wobei sich ein ungewöhnlich breites Wirkspektrum zeigte. Aus diesen Stämmen wurden insgesamt sechs niedermolekulare Naturstoffe isoliert, strukturell identifiziert und auf antibakterielle sowie cytotoxische Wirkung getestet.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Produktion eines neuartigen Sekundärstoffs durch einen Streptomyceten-Stamm untersucht. Dieser Metabolit, ein Spirotetron, ähnelt in seinen Strukturmerkmalen der Substanzklasse der Abyssomicine, die eine Tetronsäure- und eine Oxabicyclo[2.2.2]octaneinheit enthalten. Durch Vorläufer-dirigierte Biosynthese sowie Optimierung der Fermentationsbedingungen und der Isolierungsstrategie konnte die Ausbeute des neuen Naturstoffs signifikant erhöht und das Metabolitenspektrum erweitert werden. Die zusätzlichen Metaboliten wurden als drei zur Rifamycinfamilie gehörende Makrolide sowie ein Dipeptid identifiziert und in ihrer Struktur aufgeklärt.

Weiterhin wurden die Möglichkeiten zur Derivatisierung von Chartreusin untersucht. Die Wirkung dieses potenten Antitumor-Antibiotikums beruht auf Interkalation mit der DNA, bei der die multivalente Bindung des Zuckerteils für die Stabilität des DNA-Antibiotika-Komplexes essentiell ist. In einem semisynthetischen Ansatz wurde Chartreusin zu seinem neuen Derivat 6-O-Benzoyl-3',4'-O-Benzylidenchartreusin umgesetzt, wodurch eine bessere Löslichkeit erreicht wurde. Die Struktur wurde mit Hilfe von 2D-NMR spektroskopischen Methoden untersucht.

Abstract

The present work deals with the isolation, characterization und chemical derivatization of natural products from extremophilic microorganisms and streptomycetes.

In order to explore the previously unknown potential of extremophilic microorganisms as natural product producers, this aspect was investigated by chemical and biological screening as a part of a DBU research project. Host strains were transferred into the laboratory environment and cultivated under specifically adapted conditions. Selected isolates were tested in different antimicrobial and cytotoxic assays, showing a remarkably broad range of activities. Six secondary metabolites were isolated, structurally characterized and tested for antibacterial and cytotoxic effects.

Furthermore, the production of a novel natural product by an unidentified streptomycetes was studied. This metabolite, a spirotetrone, shows structural similarities to the substance class of abyssomicins, which contain a tetronic acid and an oxabicyclo[2.2.2]octane moiety. By applying precursor-directed biosynthesis, the yield of the product was significantly increased and the biosynthesis of further metabolites was observed. The additional metabolites were structurally identified as three rifamycin-type macrolides and a dipeptide.

The third project of this thesis concerns the study of derivatization reactions with chartreusin. This potent antitumor-antibiotic acts through intercalation with the DNA double helix, in which the sugar moiety stabilizes the DNA-antibiotic complex by multivalent bonding. Chartreusin was semi-synthetically converted into its new derivative 6-*O*-benzoyl-3',4'-*O*-benzylidenchartreusin, which exhibited enhanced solubility. The three-dimensional structure was investigated using 2D-NMR spectroscopic methods.

Inhaltsverzeichnis

A.Theoretischer Teil	1
1. Einleitung	1
1.1 Extremophile Mikrooganismen als Quelle neuer Wirkstoffe	1
1.2 Moderne Verfahren in der Naturstoffchemie	6
1.3 Strukturaufklärung und Synthese von Naturstoffen	10
1.4 Aufgabenstellung	15
2. Wirkstoffproduktion aus extremophilen Mikroorganismen	17
2.1 Arbeiten im Projektverbund	17
2.2 Herkunft der bearbeiteten Stämme und Stammauswahl	19
2.3 Screening-Methoden	23
2.3.1 Kultivierung und Extraktherstellung	24
2.3.2 Bioaktivitätsbasiertes Extraktscreening	28
2.3.3 Chemisches Screening	29
2.3.4 Genom unterstütztes Screening	31
2.4.1 Übersicht zur biologischen Profilierung und chemischen Analytik ausgewählter	
Stämme	35
Stamm 0-024 (Acidianus ambivalentis)	37
Stamm 0-029 (Thermoplasma acidophilum)	39
Stamm 0-047 (Acidithiobacillus caldus)	39
Stamm 1-009 (Fervidobacterium pennivorans)	41
Stamm 3-018 (unspezifiziertes Bakterium)	43
2.4.2 Ausgewählte Stämme und Charakterisierung von Metaboliten	48
2.4.2.1 Stamm 3-001 (Streptomyces sp.)	49
2.4.2.2 Stamm 3-002 (Streptomyces sp.)	55
2.4.2.3 Stamm 3-015 (unspezifiziertes Bakterium)	60
2.4.2.4 Isolierte Metaboliten aus Extremophilen	63
2.5 Diskussion und Ausblick	68
3. Studien zur Biosynthese eines neuen Polyketides mit Spirotetron-	
Struktur (22)	72
3.1 Tetronsäuren und makrocyclische Polyketide	72
3.2 Das ungewöhnlicher Spirotetron Abyssomicin C (64)	76
3.3 Bekannte Totalsynthesen der Abyssomicine	84
3.4 Kultivierung des Stammes GT 19961033 und Isolierung des Spirotetrons (22)	88
3.5 Untersuchungen zur Biosynthese des isolierten Naturstoffes (22)	92
3.5.1 Vorarbeiten	94
3.5.2 Hypothetischer Biosyntheseweg	94
3.5.3 Optimierung der Kultivierung	95
3.5.4 Optimierung der Aufarbeitung und Isolierungsstrategie	101
3.5.5 Fütterung von $[U-\frac{13}{C_3}]$ Glycerin (70)	104
3.6 Weitere Sekundärstoffe aus dem Stamm GT 19961033	105

3.7 Zusammenfassung und Diskussion	116
4. Derivatisierung eines ausgewählten Naturstoffes	119
4.1 Chartreusin (23) als potentes Antitumor-Antibiotikum	119
4.2 Bekannte Derivatisierungen von Chartreusin (23) und Analoga	123
4.2.1 Modifikationen der Zuckereinheiten	124
4.2.2 Modifikationen am Aglykon (109) in C-6 Posotion	127
4.2.3 Problemstellung und Aufgabenstellung	129
4.3 Zum biosynthetischen Ursprung von Chartreusin (23)	131
4.4 O,O-Acetalbildung	136
4.5 Benzoylierung	140
4.6 Weitere Derivatisierungsmethoden	145
4.7 Zusammenfassung und Diskussion	154
4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse	157
B. Experimenteller Teil	162
5.1 Instrumentelle Analytik	162
5.2 Chromatographische Methoden	163
5.3 Mikrobielle Methoden	166
5.4 Extremophille Mikroorganismen	168
5.4.1 Stammhaltung	168
5.4.2 Kultivierung und Aufarbeitung	169
5.4.3 Isolierung der Metaboliten	172
5.4.4 Probenbereitstellung	176
5.5 Chartreusin (23)	177
Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)	177
AAV1: O,O-Acetalbildung	177
AAV2: Veresterung	177
AAV3: Benzoylierung	177
AAV4: Enzymatisch katalysierte Veresterung	178
5.5.1 Derivatisierung und Charakterisierung	178
5.6 Spirotetron-Stamm GT 19961033	179
5.6.1 Stammhaltung	179
5.6.2 Kultivierung und Aufarbeitung	179
5.6.3 Wachstumskurve und Ausbeutebestimmung	182
5.6.4 Durchführung der Fütterungsversuchen	183
5.6.5 Isolierung und Charakterisierung des Spirotetrons	185
5.6.6 Isolierung und Charakterisierung der Metabolite	188
C. Literaturverzeichnis	201

A. Theoretischer Teil

1 Einleitung

1.1 Extremophile Mikrooganismen als Quelle neuer Wirkstoffe

Extremophile Mikroorganismen sind auf molekularer Ebene der Umgebung angepasst, die im Allgemeinen als "Extrem" zu bezeichnen ist. Als "Extrem" fasst man die physikalischen Eigenschaften wie zum Beispiel Temperatur, Druck und Strahlung, geochemische Eigenheiten (Salzgehalt, Dürre, Säure-Base-Gehalt, Sauerstoff-Gehalt, Redoxpotential) sowie biologische Voraussetzungen (nährstoffarme Umgebung, Populationsdichte, Parasiten, Fraßfeinde) zusammen. Das sind Parameter, die die Aktivität von Mikroorganismen regulieren und die den Grad an physikochemischen Reaktionen in biologischen Prozessen sind (Abbildung 1).¹

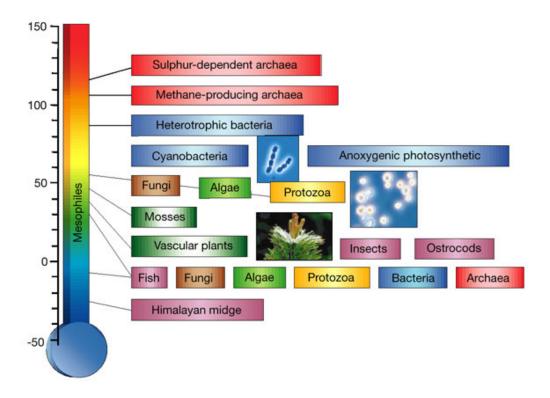


Abbildung 1: Die Temperaturgrenze des Lebens: *Archaea* sind in rot abgebildet, Bakterien in blau, Algen in grün, Pilze in braun, *Protozoa* in gelb, Pflanzen in dunkelgrün, und die Tierwelt in Purpur.

Ouelle: MANCINELLI.¹

Aufgrund der zellulären Komplexität ist die Mehrheit von höheren Organismen nicht imstande unter extremen Bedingungen zu überleben. Durch Vergleich der rRNA von typischen Repräsentanten extremophiler Mikroorganismen gelingt es, diese phylogenetisch in *Archaea* und *Bacteria* einzuordnen.² Molekularbiologische Untersuchungen zur Evolutionsbiologie führten in Bezug auf die Translation zu Parallelen zwischen *Archaea* und *Eucarya*, während ihre Membran-Transportsysteme zu Bakterien analog sind (Abbildung 2). Die thermophilen Prokaryonten haben in Biomedizin und Biotechnologie das stärkste Interesse geweckt. Sie werden als "Extremozyme" in den industriellen Prozessen eingesetzt. Hierbei spielen vor allem ihre thermostabilen Proteine, welche denaturierungs- und proteolysebeständig sind, eine Rolle.³

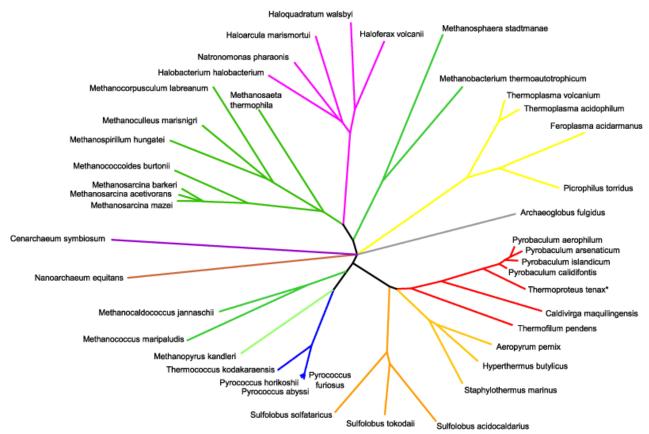


Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum zur Einordnung extremophiler Mikroorganismen.

Quelle: The UCSC Archaeal Genome Browser 4

Tabelle 1: Klassifizierung von Organismen und Beispiele von Extremophilen

Umgebungsparameter	Klassifizierung	Definition	Beispiel
	Hyperthermophile	Wachstum > 80 °C	Pyrolobus fumarii, 113 °C
Tomporatur	Thermophile	Wachstum 60-80 °C	Synechococcus lividis
Temperatur	Mesophile	15-60 °C	Homo sapiens
	Psychrophile	< 15 °C	Psychrobacter, einige Insekten
Strahlung			Deinococcus radiodurans
D 1	Barophile	gewichtliebend	Unbekannt
Druck	Piezophile	druckliebend	Mikroben, 130 MPa
0.1 1 0	Hyperschwerkraft	> 1 g	keine bekannte
Schwerkraft	Hyposchwerkraft	< 1 g	keine bekannte
X7.1		. 1	Tardigrada, Insekten,
Vakuum		tolerieren Vakuum	Mikroben, Samen
Dürme	77 111	au haadh i ati a ah	Atremia salina, Nematoden,
Dürre	Xerophile	anhydrobiotisch	Mikroben, Pilze, Flechten
Salinität	Halophile salzliebend (2-5 M NaCl)	Halobacteriaceae,	
Sammat	Halophile	saizheoend (2-3 M NaC1)	Dunaliella salina
			Natronobacterium,
	Alkaliphile	pH-Wert > 9	Spirulina sp.
nII Wart	Aikanpinie		(beide pH-Wert = 10.5)
pH-Wert	A aidamhila	Acidophile niedriger pH-Wert	Cyanidium caldarium,
	Acidophile		Ferroplasma sp.
			(beide pH-Wert = 0)
	Anaerobe	tolerieren O ₂ nicht	Methanococcus jannaschii
Sauerstoff	Microaerophile	tolerieren wenig O2	Clostridium sp.
	Aerobe	brauchen O ₂	Homo sapiens
			Cyanidium caldrium
			(reine CO ₂)
	Gase		Ferroplasma acidarmanus
chemische Extreme			
	Metalle	metalotolerant	(Cu, As, Cd, Zn)
			Ralstonia sp. CH34
			(Zn, Co, Cd, Hg, Pb)

Die Hitzebeständigkeit (hyper)thermophiler *Archaea* und *Bacteria* beruht auf der Akkumulation von kompatiblen kleinen Molekülen in hoher Konzentration. Die gelösten Stoffe spielen offensichtlich eine entscheidende Rolle beim Thermoschutz der Zellkomponenten in *in vivo*-Untersuchungen. Außerdem besteht die Zellmembran von Thermophilen aus Fettsäuren, welche die hydrophoben Eigenschaften der Membran steigern

und den Antistress-Mechanismus der Zelle gegen hohe Temperaturen kompensieren.⁵ Die Proteine der Thermophilen haben eine vergrößerte Ladungsoberfläche und ungeschützte thermolabile Aminosäuren, was die Ionenaustauschkapazität sowie die Hydrophobie erhöht. Ferner ist die Flexibilität der Proteine durch kleinere Loop-Oberflächen bei den Thermophilen gesenkt. In Folge dessen können extrem stabile Lipide archealer Membranen als neue Quelle von Wirkstoffen dienen. Neuste Forschungsberichte haben sich diesem bisher unbeachteten Ökosystem gewidmet. Hintergrund hierfür ist ein Einblick in neue Biosynthesewege sowie die Möglichkeit der Gewinnung interessanter neuer Metaboliten. Ausgewählte thermophile Spezies marinen Ursprungs werden unter kontrollierten Bedingungen fermentiert und auf die Bildung von extrazellulären Polysaccariden (EPS) überprüft.⁶ Für die Charakterisierung der Biosynthese und zur Steigerung der Produktion werden verschiedene Zucker dem Nährmedium als Kohlenstoffquelle zugesetzt. Die neu gewonnenen Polysaccharide sind für die Pharmazie interessant, sie blockieren das Eindringen verschiedener Viren in die Wirtszelle und wirken als Inhibitior retroviralen Reversen-Transkriptase. Darüber hinaus binden sie Schwermetalle und Antibiotika und bilden eine Barriere für toxische Substanzen. Weitere bekannte Vertreter dieser Substanzklasse sind die Exopolysaccaride der Cyanobakterien, welche die Membranen ihrer Produzenten in Dürreperioden vor dem Austrocknen schützen.⁷ Die Exopolysaccharid-Produzenten haben vor allem in der Biotechnologie ihren Einsatz gefunden. Bei der Herstellung skandinavischer Sauermilchprodukte führt deren Verwendung zu einem höheren Wassergehalt der Milchprodukte und damit zu einer verbesserten Schmelzbarkeit.⁸ Dies ist nur einer von vielen Verwendungszwecken, bei denen Biopolymere aus extremophilen Mikroorganismen oder die Organismen selbst Einzug in industrielle Prozesse gefunden haben.

Aufgrund ihrer ungewöhnlichen Lebensbedingungen wurde für extremophile Mikroorganismen angenommen, dass auch ihr Sekundärstoffwechsel zu ungewöhnlichen, neuartigen Produkten führt. Das chemische Screening von Extremophilen lieferte in der Tat einige Verbindungen mit interessanten, chemischen Strukturen und biologischen Aktivitäten. Es war mehr als überraschend, aus einer

neuen thermophilen Art der *Pseudomonas* eine antifungale Aktivität in den Extrakten zu finden. Pyochelin (1) wurde als erster Metabolit extremophiler Herkunft mit einer antifungalen Wirkung beschrieben.

Aus kälteadaptierten Mikroorganismen (Phsychrophile) aus der Nordsee hat man in der Arbeitsgruppe H. LAATSCH einige seltene niedermolekulare Stoffwechselprodukte isoliert. So wurde aus dem antarktischen Meeresbakterium ANT V/2 253 N^b -Acetylkynuramin (2) identifiziert. ¹⁰

Haliclamin C ($\underline{3}$) und D ($\underline{4}$), die zur Substanzklasse den 3-Alkyltetrahydropyridin-Alkaloide gehören, wurden als Metabolite aus dem arktischen Schwamm *Haliclona viscosa* isoliert. ¹¹

$$\frac{3}{4} n_1 = 7; n_2 = 5$$

$$\frac{4}{4} n_1 = 8; n_2 = 5$$

Aus dem kälteadaptierten Organismus *Pseudomonas fluorescens* wurden Eisen (III)-Chelatbilder (so genannte Siderophore) Pyoverdin 51W (<u>5</u>), suc-Pyoverdin 51W und suca-Pyoverdin 51W gewonnen.¹²

Eine große Schwierigkeit stellt die Kultivierung von Extremophilen im Labor- oder im industriellen Maßstab dar. Die Kultivierung erfordert unter anderem komplexe Nährmedien und spezielle Fermenter, die hohen Druck und Temperatur-Änderung aushalten, sowie steile Gradienten beim pH- und Salzgehaltwechsel. Unter diesen Fermentationsbedingungen kommt es durch die Veränderung der Wachstumsparameter zu einer Veränderung der Konzentration und/oder Struktur der Biopolymere und damit zu Veränderung der Morphologie der Zelle. ¹³ Trotzt aller Bemühungen ist eine große Zahl extremophiler Mikroorganismen nicht unter diesen angepassten Bedingungen kultivierbar bzw. führt erst die Genexpression in einem mesophilen Wirt zur Wiedergewinnung der erwünschten Metaboliten. ¹⁴

1.2 Moderne Verfahren in der Naturstoffchemie

Die Forschung in der Naturstoffchemie hat sich in den letzten 15 Jahren in vieler Hinsicht verändert. Die Strategien für die Suche und Identifizierung neuer Naturstoffe mit einer gewünschten biologischen Aktivität nahm dramatische Veränderungen an. Während die chemische Struktur das wichtigste Leitbild in den 1970-er und 1980-er Jahren spielte, stellt die Suche und Isolierung biologisch aktiver Sekundärmetabolite den gegenwärtigen Schwerpunkt der Naturstoffforschung dar. Die signifikanteste Änderung ist aber die Zeit, die für diese Suche zu Verfügung steht. Die kostspielige Isolierung neuer Verbindungen und ihre Strukturaufklärung erhöhte den Druck auf die Naturstoffforscher, in kürzester Zeit maximalen Erfolg zu erzielen. Zusätzlich ist der multidisziplinäre Charakter dieses Fachgebietes heute erheblich ausgeprägter als je zuvor. Um die vollständige molekulare Diversität der Mikroorganismen zu erschließen, wurden verschiedene Strategien, wie das Target-orientierte biologische Screening sowie das chemische bzw. physiko-chemische Screening und das sogenannte genetische Screening entwickelt. ¹⁵

Das biologische Screening beruht auf der biologischen Testung eines Extraktes bzw. einer Reinsubstanz. Im klassischen Sinne ist unter diesem Begriff die Untersuchung auf antibakterielle Aktivität von Substanzen gegen verschiedene Indikatororganismen zu verstehen. Die Identifizierung neuer und klinisch relevanter biologischer Targets hat zunehmend von genetischen Ansätzen profitiert. Die enorme Initiative auf molekularem und genetischem Gebiet die in den frühen 1990-er gestartet hat, führte zu umfangreichen Informationen aus den totalen Genomsequenzen. Die vollständigen Genome von etwa 700 Viren, 20 Viroiden, mehr als 10 Archaeae und von 60 Bakterien sowie einiger Eukaryoten einschließlich zweier Pilzen, einer Pflanze und zwei Tieren wurden bisher entschlüsselt. 16,17 Im August 2002 gelang es schließlich 98 % der Sequenzen des menschlichen Genoms aufzudecken. 18 Beim Target-orientierten Screening werden die einzelnen Wechselwirkungen mit spezifischen molekularen Zielort (z.B. einem Enzym, Rezeptor, RNA-/DNA-Abschnitt) untersucht, wobei eine definierte pharmazeutische Anwendung als Ziel angestrebt wird. Diese Screening-Methode setzt man heutzutage hauptsächlich im industriellen *high throughput screening* (HTS) ein. ¹⁹

Das auf Dünnschichtehromatographie basierende chemische Screening zielt primär auf das Auffinden neuer Verbindungen durch visuelle Detektion (farbige Substanzen), UV-Absorption/Fluoreszenz und Farbreaktionen der Metaboliten mit verschiedenen

Anfärbereagentien ab. Diese Methode wurde zuerst von S. UMEZAWA²⁰ beschrieben und in den Arbeitsgruppen von H. ZÄHNER²¹ und A. ZEECK²² ausgearbeitet. Erfolgt die Detektion über reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), so spricht man von physiko-chemischen Screening. Bei der Suche von Naturstoffen unter Einsatz verschiedener gekoppelter Detektions-Techniken, Multi-Wellenlängen UV/VIS-Detektoren (diode array detektion, DAD) und der HPLC wurde es möglich, Metabolite durch ihre Retentionszeiten und UV/VIS-Chromatogramme zu charakterisieren und mit den schon bekannten Einträgen zu vergleichen. ²³ Zunehmend finden auch andere gekoppelte einer Datenbank HPLC-UV/NMR^{24,25} HPLC-CD und wie HPLC-UV/MS, **HPLC-Methoden** Screeningverfahren ihre Anwendung. 26 Die letztgenannte Technik hat es ermöglicht, ohne eine präparative Trennung NMR-Spektren von den Bestandteilen komplexer Gemische zu erhalten. Wie elegant und zeitsparend diese neue online-Technik auch zu sein scheint, so ist zu beachten, dass sie noch nicht ausgearbeitet ist und viele Einschränkungen mit sich bringt. Nur homonukleare NMR-Experimente wie ¹H, COSY, TOCSY, ROESY sind mit zufriedenstellendem Signal-Rausch-Verhalten möglich, heteronucleare Methoden wie HMBC und HSQC nicht.²⁷

Nachdem ein selektives Screening nach einem neuen potentiellen Wirkstoff abgeschlossen ist, liegt in der Regel das Interesse darin, die Hitkandidaten in ihrer reinen Form zu isolieren.

Zwei wesentliche Entwicklungen verbesserten in den letzten Jahren die Aussagekraft analytischer Anwendungen: die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie (LC) mit der Massenspektrometrie (MS) und die Miniaturisierung von Chromatographiesäulen. Die LC/MS-Kopplung ermöglicht Nachweise im unteren picomolaren Bereich sowie die Detektion von Molekülmassen und Durchführung von MS/MS-Untersuchungen unmittelbar nach der chromatographischen Auftrennung. Die Einführung der Elektrospray-Technik für die Ionisierung war von entscheidender Bedeutung für die Anwendung dieser Technik auf Biomoleküle. Durch die Applikation von flüssigen Proben wurden viele Substanzen wie z.B. Peptide für die Messungen zugänglich. 30

Die Modifizierung der Naturstoffprodukte gelingt heute am effizientesten durch einen semisynthetischen Ansatz. Mittels Abbaureaktionen wird aus einem fermentativ gewonnenen Naturstoff gezielt der für die biologische Wirkung wichtige Strukturteil (Pharmakophor) bestimmt. Durch Veränderung der funktionellen Gruppen wird eine chemische Abwandlung der Leitstruktur ermöglicht und kann eine Wirksubstanz mit verbesserten pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften erzeugen. Auf diese Weise wurde der aus *Camptotheca acuminata* (einem in China heimischen Baum) isolierte

Topoisomerase I-Inhibitor Camptothecin (<u>6</u>) durch Semisynthese in das hochaktive Derivat Exatechan (<u>7</u>) umgewandelt und in der Tumortherapie eingesetzt (Abbildung 3).³¹

Abbildung 3: Semisynthetisch hergestelltes Camptothecin-Derivat Exatecan (7).

Der semisynthetische Ansatz ermöglichte zwar eine einfache Gewinnung an neuen Naturstoffanaloga, ist aber in seiner Vielseitigkeit begrenzt.

Das Konzept der strukturellen Vereinfachung in der Semisynthese scheint zurzeit einer der viel versprechenden Ansätze in der Suche nach von Naturstoffen abgeleiteten Wirkstoffen zu sein. Das Konzept geht von der Erhaltung der pharmakophoren Kernstruktur und der Vereinfachung des Molekülgerüstes aus. Die Entwicklung dieser Idee sei am Beispiel des Bryostatins (8) verdeutlicht (Abbildung 4).

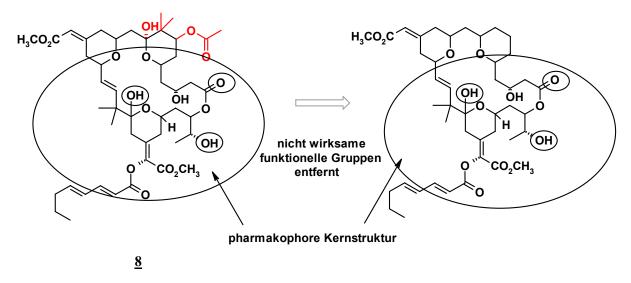


Abbildung 4: Strukturelle Vereinfachung des Bryostatins (**8**) durch das "Konzept der strukturellen Vereinfachung in der Semisynthese" (die angedeuteten funktionellen Gruppen interagieren mit dem Wirkstoff-Target). ³³

Durch detaillierte Kenntnisse über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR), das heißt über die Korrelation der molekularen Struktur von Wirkstoff und Target mit seiner biologischen Aktivität, wird heute versucht, maßgeschneiderte Semisynthesen durchzuführen. Ausgehend von der 3D-Struktur des Rezeptors wird der Wirkstoff beim "*rational drug design*" so an sein Target angepasst, dass seine Wirkung deutlich verbessert wird³⁴. Effizientes Design des passenden Liganden mit "*molecular modeling*" sollte diese Strategie abrunden. Diese Methode wurde aufgrund der schweren Zugänglichkeit von der 3D-Kristallstruktur-Proteinbindungsregion bisher nur selten angewendet. ³⁵

Eine weitere Möglichkeit für die Erzeugung neuer Wirkstoffe versprach die Nutzung der Gentechnik für die Rekonstruktion und gezielten Veränderung von bekannten Biosynthesewegen aus potenten Mikroorganismen (kombinatorische Biosynthese). ^{36,17} Eines der bekanntesten Beispiele stellt die heterologe Expression von Biosynthese-Genen des Paclitaxels (Taxol®) (9) in *E.coli* dar, die für die Bildung des entscheidenden Taxadien-Intermediates 10-Deacetylbaccatin III (10) verantwortlich sind. ³⁷ Ausgehend von dem Intermediat gelang es durch Semisynthese einen verbesserten Wirkstoff, das Docetaxel (11) zu generieren (Abbildung 5). ³⁸

Abbildung 5: Paclitaxel-Derivat Docetaxel (Taxotère[®]) (<u>11</u>).

Taxol wurde im Rahmen eines Screeningprograms für einen Mitose-Hemmstoff aus Rindenproben der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isoliert und besaß einen bis dato einzigartigen Wirkmechanismus.³⁹

Aufgrund der Komplexität der Totalsynthese von Naturstoffen und der herausfordernden praktischen Übertragung auf großtechnische Maßstäbe stellt sie eine besondere Herausforderung dar. Gleichzeitig sind die beiden Faktoren auch diejenigen, die die immense Barriere eines synthetischen Ansatzes bedeuten.

Die analytischen Geräte werden zukünftig immer schneller und sensitiver sein. Sollte es gelingen noch umfangreichere, flexiblere Datenbanken mit physiko-chemischen Eigenschaften zu generieren und diese den Naturstoffforschern zu Verfügung zu stellen, so wird die Schnellerkennung von bereits bekannten Substanzen effizienter. Auf diese Weise kann der hohe Aufwand für die Isolierung neuer Wirkstoffe und damit der hohe Kosten- und Zeitaufwand deutlich reduziert werden, so dass die Naturstoffchemie auch in Zukunft eine tragende Rolle bei der Suche nach neuen Wirkstoffen darstellen kann.

1.3 Strukturaufklärung und Synthese von Naturstoffen

Während des 19. Jahrhunderts und der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts beruhte die Strukturaufklärung neuer Naturstoffe nahezu vollständig auf der Kunst der chemischen Synthese. Des Weiteren wurde die Leistungsfähigkeit von Abbaureaktionen und Derivatisierungen genutzt, wenn die zu untersuchende Substanz in ausreichender Menge bereitstand. Eine Zuordnung der absoluten oder relativen Konfiguration konnte in den meisten Fällen nicht erreicht werden.

H. WIELAND und A. WINDAUS ermittelten die Struktur von Cholesterin (<u>12</u>) und erhielten für die Aufklärung 1927 und 1928 den Nobelpreis der Chemie.⁴⁰ Erst als J. D. BERNAL⁴¹ die erste Steroidstruktur von Ergosterin (<u>13</u>) durch Röntgenstrukturanalyse aufdeckte, konnte erkannt werden, dass der erste Vorschlag fehlerbehaftet war.

12: Vorschlag I für Cholesterin Wieland und Windaus (1927) 13: Ergosterin Bernal (1932)

12: korrekte Struktur von Cholesterin Röntgenstrukturanalyse (1932)

Trotzdem konnten unter fast ausschließlicher Anwendung der chemischen Synthese viele Strukturen richtig zugeordnet werden. So wurden z.B. vor dem Beginn des zweiten Weltkrieges die Naturstoffe Chinin⁴² und Hämin⁴³, sowie 1964 die Struktur des Strychnins⁴⁴ aufgeklärt. Die Totalsynthese wurde in dieser Zeit zur wichtigsten chemischen Disziplin. In den späten 60er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden die "klassischen" chemischen Methoden (NMR)-, Ultraviolett (UV)-, durch Kernresonanz Infrarot (IR)-Spektroskopie, Circulardichroismus (CD) und die Massenspektrometrie (MS) ersetzt bzw. ergänzt. 45 Der Strukturaufklärung wurde minimiert, die leistungsstarken zeitliche Aufwand der Spektroskopietechniken haben den Chemikern eine "unerschöpfliche Quelle unvorhersehbarer Entdeckungen"⁴⁶ eröffnet. Der spektakuläre Fortschritt der Spektroskopie führte damit zu einem Wendepunkt.

Es stellt sich heute dennoch die Frage, ob die Spektroskopietechniken eine fehlerfreie Charakterisierung garantieren. K. C. NICOLAOU und S. A. SNYDER⁴⁷ sammelten veröffentlichten Beiträge zwischen Januar 1990 und April 2004 und stellten fest, dass mehr als 300 Strukturen revidiert wurden. Darunter waren Vertreter aus nahezu allen Verbindungsklassen, Substanzen jeglicher Größe und stereochemischer Komplexität. Die klassische Falle bei der Charakterisierung war ein unberechtigtes Vertrauen in spektroskopische Daten und das Festhalten an der falschen Struktur. Man muss sich im Klaren sein, dass jede Zuordnungsmethode ihre Schwächen hat. In einigen Fällen ist sogar die NMR-Spektroskopie trotz ihrer überwältigenden Leistung machtlos, während andere Methoden wie die IR-Spektroskopie die wertvolleren Informationen liefern können.⁴⁸ Bei anderen Beispielen hätten die spektroskopischen Daten zu einer richtigen Zuordnung geführt, wenn die angewendeten chemischen Methoden nicht ein falsches Ergebnis erbracht hätten.⁴⁹ Die Geschichte jeder Neuzuordnung einer Naturstoffstruktur zeigt die Leistungsschwächen einer bestimmten Methode auf. Die Fehlerzuordnungen haben aber weitreichende Folgen, wenn auf ihrer Grundlage falsche Biosynthesewege aufgestellt werden. 1925 zeigte R. PUMMERER eine Ein-Elektronen-Oxidation von para-Kresol mit K₃[Fe(CN)₆] zur dimeren

Verbindung <u>16</u>, die über die Kupplung der beiden Radikale <u>14</u> und <u>15</u> mit anschließendem, spontanem Ringschluss verläuft (Abbildung 6).⁵⁰

Abbildung 6: Die falsche Strukturzuordnung des Pummerer-Ketons <u>17a</u> induziert durch falsch postulierten Reaktionsmechanismus.

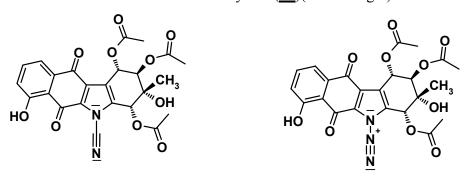
Dreißig Jahre lang diente das Pummerer-Keton (<u>17a</u>) als Grundlage für eine Reihe von Biosynthese-Hypothesen, unter anderem für ROBINSONS Biosyntheseweg zu Morphin (<u>19</u>). Da man nicht erklären konnte, warum der Ringschluss von <u>17</u> aus <u>16</u> bei Raumtemperatur erfolgen kann, schlug D. H. R. BARTON einen alternativen Reaktionsverlauf vor. ⁵¹ Die Experimente bestätigten, dass die Substanz <u>18</u> aus Pummerer-Keton <u>17b</u> durch säureinduzierte Dienon-Phenol-Umlagerung hervorgeht (Abbildung 7).

Abbildung 7: Säureinduzierte Dienon-Phenol-Umlagerung als richtiger Reaktionsweg.

Anhand dieses Reaktionsmechanismus postulierte D. H. R. BARTON einen alternativen Bioyntheseweg für Morphin ($\underline{19}$), der von einem Benzylisochinolin-Alkaloid ($\underline{20}$) ausging, welches zu jener Zeit unbekannt war. Einige Jahre später wurde $\underline{20}$ als Naturstoff isoliert und erhielt den Namen Retikulin ($\underline{20}$)^{52,53} (Abbildung 8).

Abbildung 8: Entdeckung des Retikulins (19) als Vorläufer für Morphin (20). 54

Fehlerhafte Forschungsergebnisse in der Wissenschaft führen zu Herausforderungen, die oftmals einen ungewöhnlichen, kreativen Weg erfordern. Trotz der bemerkenswerten Weiterentwicklung der Isolierung und Charakterisierung treten noch immer falsche Naturstoffstrukturen auf. Sogar die als "unfehlbar" geltende Röntgenstrukturanalyse kann zu falscher Zuordnung führen, da sie die Lage der Protonen nicht ermittelt (die Protonen sind nachträglich eingezeichnet). Es ist folglich schwer zwischen O-Atomen und NH-Gruppen zu unterscheiden. Die Identität von Atomen in funktionellen Gruppen, die keine Wasserstoffatome enthalten, kann verwechselt werden. Beispielweise ergab die Zuordnung eines C-Atoms statt eines N-Atoms (einer Cyan- statt einer Diazogruppe) für eine sehr lange Zeit die falsche Struktur für die Kinamycine (21)(Abbildung 9). 55, 56, 57



21: Kinamycin C Omura et al. (1974)

21: 2D-NMR-Spektroskopie und chemische Synthese Gould et al. (1994) und Dimtrenko et al. (1994)

Abbildung 9: Revidierte Struktur von Kinamycin C (21).

Daher ist zu konstatieren, dass der enorme Aufwand bei der Strukturaufklärung komplexer Moleküle mit begrenzten Mengen an Material große Anerkennung verdient. Jede Zuordnungsmethode ist alleine nicht ausreichend und in einigen Fällen ist auch die Spektroskopie trotz imposanter zweidimensionaler Techniken alleine nicht zweifelsfrei einsetzbar. Jede Verbindung erfordert eine individuelle, analytische und synthetische Herangehensweise. Die Erstellung einer universalen Datenbank, die Zugang zu den Abbildungen von Spektren und nicht nur zu Datentabellen gewährt, könnte zukünftig eine große Hilfe bei der Substanzidentifikation leisten.

"Solange neue Naturstoffe mit besonderen Strukturen und Eigenschaften isoliert werden, können wir sicher sein, dass auch eine Vielzahl von Herausforderungen an unsere intellektuellen und technischen Fähigkeiten auf uns zukommen werden.

Gerade im Ringen um die Synthese solcher molekularen Rätsel eröffnet sich oftmals wissenschaftliches Neuland, das darauf wartet, erschlossen zu sein." K. C. NICOLAOU und S. A. SNYDER⁴⁸

1.4 Aufgabenstellung

Im ersten Teil dieser Arbeit stand die Untersuchung von extremophilen Mikroorganismen ihrer Wirkstoffproduktion im Mittelpunkt. Im Rahmen eines Verbundprojektes sollten verschiedene, extremophile Isolate einem kombinierten chemisch-biologischen Screening zugeführt und nur die im Screening auffälligen Stämme weiter kultiviert und hinsichtlich der biologisch aktiven Inhaltsstoffe bearbeitet werden. An die breite biologische Testung sollte sich die Strukturaufklärung und spektroskopische Charakterisierung neuer Metabolite unter Einbeziehung moderner analytischer Methoden anschließen.

Als Quelle neuer potentieller Wirkstoffe bieten sich die extremophilen Mikroorganismen aus unterschiedlichen extremen Habitaten an. Umfangreiche Kultivierung sollten in Kooperationen durchgeführt werden, um möglichst viele verschiedene Mikroorganismen untersuchen zu können. Bei Stämmen mit biologischem Potenzial und interessantem Metabolitenmuster sollte durch Optimierung der Kultivierungbedingungen die gesamte Biosyntheseleistung erschlossen werden. Die Testung der Extrakte hinsichtlich einer signifikanten biologischen Aktivität sollte von der Firma BRAIN AG als Kooperationspartner durchgeführt werden.

In zweitem Teil der Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation mit dem Arbeitskreis I. SATTLER (HKI Jena) der Stamm GT 19961033 im Hinblick auf die Produktion eines neuartigen Spirotetrons CTH 090 untersucht. Durch Vorläufer-dirigierte Biosynthese und Variation der Kultivierungsbedingungen (OSMAC = One-Strain-Many-Compounds) sollte die Ausbeute von Spirotetron CTH 090 (22) gesteigert werden. Abschließende Biogenese-Untersuchungen (Fütterungsexperimente mit markierten Verbindungen) sollten detallierte Erkenntnisse zur Biosynthese des Naturstoffs bringen.

Im dritten Teil dieser Arbeit sollte das Cytostatikum Chartreusin (23) hinsichtlich seiner Struktur und Derivatisierungsmöglichkeiten näher untersucht werden. In der Veröffentlichung von S. KAMITORI (2003) wurde eine Kristallstruktur diskutiert, die mit der bisher bekannten chemischen Struktur nicht zu übereinstimmen scheint. Die Fragestellung über die Konfiguration der Disaccarid-Einheit sollte durch einen geeigneten Kristall des Chartreusins (23) oder eines Derivates überprüft werden.

2. Wirkstoffproduktion aus extremophilen Mikroorganismen

2.1 Arbeiten im Projektverbund

DBU-Verbundprojekt "Nachhaltige und effiziente Produktion neuartiger Wirkstoffe aus extremophilen Mikroorganismen durch Einsatz heterologer Expressionssysteme"

Das DBU-Projekt entstand im Rahmen der Fördermaßnahme "BioTechnologie" des DBU InnovationCentrums Biokatalyse *ICBio*.

Im erarbeiteten Konzept zur "nachhaltigen und effizienten Produktion neuartiger Wirkstoffe aus extremophilen Mikroorganismen durch Einsatz heterologer Expressionssysteme" (AZ 13070) wurde als Forschungsschwerpunkt die Untersuchung bisher unbekannter mikrobieller Diversität aus extremen Nischenhabitaten ausgewählt, mit der Zielsetzung der Identifizierung neuer Wirkstoffgrundgerüste. Aufgrund ihrer spezifischen Lebensbedingungen wurde erwartet, dass die Extremophilen eine wertvolle Quelle neuartiger Wirkstoffe sind.

Am Verbundprojekt sind vier Projektpartner beteiligt (Abbildung 10):

- 1. Technische Universität Hamburg-Harburg (TUHH) (vertreten durch die TUHH-Technologie GmbH, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Garabed Antranikian): Der Arbeitkreis G. ANTRANIKIAN war zuständig für die Fermentation von Psychrophilen, Thermoalkaliphilen und Halophilen Mikroorganismen aus deren umfassenden Sammlung (vgl. Kap. A.1.1).
- 2. Zentrum für Molekulare Evolution & Biodiversität e.V. Darmstadt (ZEB) (Arbeitsgruppe PD. Dr. Arnulf Kletzin): Die thermotoleranten Stämme (50 °C), sowie Thermoacidophile Hyperthermophile, Halophile und Archea wurden von den BioArchiven "Zentrum für molekulare Evolution und Biodiversität e.V." aus dem Bestand von ZILLIG bezogen und in das Screeningprogramm aufgenommen. Das Zentrum wurde von BRAIN AG und Arbeitsgruppen TU Darmstadt gegründet. Die Isolate wurden unter spezifischen Bedingungen angezogen und zur weiteren chemischen Bearbeitung dem Arbeitskreis S. GROND zur Verfügung gestellt.
- 3. Georg-August Universität Göttingen (UGÖ) (Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Abt. Biomolekulare Chemie, Arbeitsgruppe Dr. Stephanie Grond): Die erhaltenen Stämme wurden im AK s. GROND nach dem OSMAC-Prinzip⁵⁸ in vier verschiedenen Medien kultiviert (auf die Methode wird in A.3.5. ausführlich

eingegangen). Die chemische Profilierung erfolgte nach der von H. ZÄHNER und A. ZEECK erweiterten Methode des "Chemischen Screenings". ^{59,60} Der Reproduzierbarkeit der Screening-Ergebnisse sowie der Kultivierung wurde dabei eine entscheidende Rolle für die Auswahl der Stämme zugeteilt. Die chemisch interessanten Stämme wurden in Großmaßstab kultiviert.

In dem Arbeitskreis S. GROND erfolgte die anschließende Bewertung der mikrobiellen Extrakte im Hinblick auf Metabolitenproduktion mit Hilfe Dünnschichtchromatographie und moderner spektroskopischer Methoden wie HPLC-Massenspektrometrie, FT-ICR-Massenspektrometrie, 1D-, 2D-NMR-Spektroskopie und Datenbank-Analyse (SciFinder, Chapman & Hall, AntiBase) (Abbildung 10).

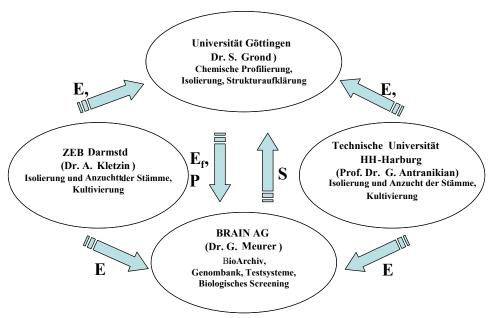


Abbildung 10: Zusammenarbeit der Kooperationspartner im Rahmen des DBU-Projektes $(\mathbf{E} = \text{Extrakte}, \mathbf{S} = \text{Stämme}, \mathbf{E_f} = \text{Fraktionierte Extrakte}, \mathbf{P} = \text{Reine Produkte})$

4. Die Firma BRAIN AG übernahm alle Arbeiten des aktivitätsbasierten Extraktscreenings, der PCR-Typisierung von extremophilen Mikroorganismen, Genom-unterstütztes Screening durch sequenzhomologes Screening der Genombanken und Erstellung einer SQL online-Datenbank, die allen Projektpartnern jederzeit zur Verfügung bereitgestellt wurde. Durch zentrale Datenerfassung und Bearbeitung sollte der Überblick über die chemischen und biologischen Profilierungsdaten sowie der genetischen Daten der bearbeiteten Stämme und Extrakte zusammenfassend dargestellt werden. Durch den Datenabgleich erfolgte dann die abschließende Beurteilung der Kandidaten durch die Projektpartner.

Die aussichtsreichsten Kandidaten (,hits') wurden erneut kultiviert, die Substanzen in kleinem Maßstab aufgereinigt und einer erweiterten Aktivitätsprofilierung durch die BRAIN AG zugeführt. Die Erstellung der *online*-Datenbank für das biologische und chemische Screening hat die Kooperationsarbeit enorm unterstützt, da alle am Projekt beteiligten Parteien relevante Daten über Stammsammlung, Kultivierung, Aktivitätsprofilierung und Substanzaufklärung aktuell abrufen und die neusten Ergebnisse untereinander austauschen konnten. Durch diese angegebene Projektstruktur war es erst möglich, ein Konzept dieses Ausmaßes erfolgreich durch den frequenten Informationsaustausch zu bewältigen.

2.2 Herkunft der bearbeiteten Stämme und Stammauswahl

Im Rahmen der Zusammenarbeit an dem Projekt zur Untersuchung extremophiler Mikroorganismen auf ihr biologisches und chemisches Potential, wurden 93 mikrobielle Isolate kultiviert und ihr Extrakt auf biologische Wirksamkeit getestet. Daraus wurden zunächst zehn Stämme für die weitere Bearbeitung in zwei Priorisierungsrunden unterteilt. Als besonders wichtig galt die Reproduktion von beobachtbarer biologischer Aktivität und chemische Analyse des Metabolitenmusters aus wiederholter Kultivierung. Als weiteres Auswahlkriterium diente die isolierte Substanzmenge (Abbildung 11).

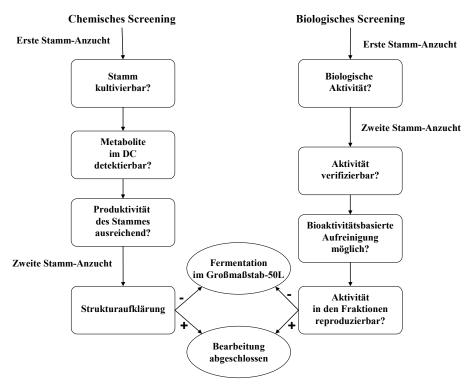


Abbildung 11: Auswahlkriterien für die weitere Bearbeitung von im chemischen und biologischen Screening auffälligen Stämmen

Für die ausgewählten Stämme war die auffällige Aktivität der Extrakte gegen einen oder mehrere Indikatororganismen sowie eine ausgeprägte zell-toxische Wirkung auf CHO-K1 Tumorzellen in jeweiligen Kultivierungs-Einsätzen signifikant (vgl. Kap. A.2.3.1). Die Erstellung antimikrobiell ausgerichteter Aktivitätsprofile hatte somit eine schnelle Einschätzung der Wirkstoff-Produktion ermöglicht.

Unter Stamm-spezifischen, optimierten Bedingungen wurden die Kultivierungen für den jeweiligen Organismus durchgeführt. Jede Kultivierung wurde hinsichtlich des Zellwachstums optimiert. Alle Kulturen wurden nach Erreichen der stationären Wachstumsphase noch mindestens zwei Tage weiter bebrütet. Als Negativ-Kontrolle für das biologische und chemische Screening wurde immer eine Nährmedium-Kontrolle durchgeführt, da Nährmedien-Bestandteile selbst die gesuchte Aktivität besitzen könnten (Ausschließen falsch-positiver Ergebnisse). Nach Beenden des chemischen Screenings (vgl. Kap. A.2.3.3) wurden die Extrakte aus Kulturfiltraten und Zellpellets einer chemischen Profilierung (vgl. Kap. A.2.3.3) unterzogen. Nach Bestätigung der biologischen Aktivität wurde zur Reproduktion eine Kultivierung im Großmaßstab in dem jeweiligen Nährmedium ausgeführt, in dem erfolgversprechende Testergebnisse erzielt wurden.

Folgende extremophile Archea und Bakterien wurden in unterschiedlichen Medien bei optimalen Wachstumsbedingungen kultiviert und anschließend untersucht. Thermophilie (optimale Wachstumstemperatur von mindestens 50 °C), Acidophilie (pH-Optima weniger als 4) und/oder ein hoher Salzgehalt im Wachstumsmedium (bis 5 M) waren die wichtigen Kriterien für die Auswahl der Stämme (dabei gibt die erste Bezeichnung des Namens die *Gattung*, die zweite Bezeichnung die *Spezies* an) (Tabelle 2):

Tabelle 2: Ausgewählte Stämme für das chemisch-biologische Screening.

Psychrotolerante (-5-20 °C)	Anzuchttemp. [°C]
Cryobacterium psychrophilum	-5
Isolat Amyl2	4
Isolat 29-12	10
Isolat 12-13	10
Isolat50quora	10
Isolat31quora	10
Psychromonas antartica	12
Haloanaerobium praevalens	37

Halophile Stämme (10-30% Salz)	Anzuchttemp. [°C]
Halococcus morrhuae	_
Halloterrigen thermotolerans	_
Salinibacter ruber	_

Extremophile	Anzuchttemp.
(60-80 °C)	[°C]
Norcardia sp.	50
Streptomyces thermonitrificans	50
Saccaromonospora sp.	50
Thermoactinomycer vulgaris	50
Thermoactinomyceten sp.	50
Fervidobacterium gondwanense	60
Bacillus thermophilum	60
Fervidobacterium pennivorans	65
Thermoanaerobacter keratinophilus	70
Thermoanaerobacter italicus	70
Dictyoglomus thermophilum	70
Anaerocellum thermophilum	70
Caldocellulos lactoaceticus	70

Thermoacidophile (pH 0-4)	Anzuchttemp. [°C]
Acidianus ambivalens	60
Acidithiobacillus caldus	70
Thermoplasma acidophilum	80

Hyperthermophile (80-110 °C)	Anzuchttemp. [°C]
Thermotoga neapolitana	85
Clostridium thermocellums	85
Pyrococcus furiosus	90

Die Organismengruppen wurden aus den vorliegenden Stammsammlungen den Projektpartnern für die Untersuchungen bereitgestellt (Tabelle 3):

 Tabelle 3: Bereits isolierte und in den Arbeitsgruppen vorhandene Mikroorganismen.

Partner	Organismengruppen
BRAIN AG Zwingenberg	Escherichia coli, Bacilli Actinomyceten
AG Antranikian TU Hamburg-Harburg	Psychrophile Thermophile Thermoacidophile Thermoalkaliphile Halophile
AG Kletzin ZEB e.V. und TU Darmstadt	Thermoacidophile Hyperthermophile Halophile Archaea
AG Grond Uni Göttingen	Actinomyceten

Die folgenden Stämme zeigten vor allem ein interessantes chemisches Metabolitenmuster.

Für einen besseren Überblick wurden die Stämme der ersten Priorisierungs-Runde in der unten angegebenen Tabelle 4 zusammengefasst (Stamm-ID = interne Probenbenennung).

Tabelle 4: Überblick der Stämme mit einer auffälligen biologischen Aktivität.

Stamm-ID	biologische Aktivität
1-004 (Fervidobacterium pennivorans)	reproduzierbar stark zytotoxisch, sehr aktiv
3-001 (<i>Streptomyces</i> sp.) (B1017B)	antifungale Aktivität
3-002 (<i>Streptomyces</i> sp.) (1014C)	breite antifungale Aktivität,
	starke Zytotoxizität
3-009 (<i>Streptomyces</i> sp.) (B4007)	zytotoxisch

In die zweite Gruppe wurden die Stämme aufgenommen, die im Vergleich zu den Stämmen der ersten Gruppe eine geringere biologische Aktivität aufwiesen, sich jedoch von den verbleibenden Stämmen hinsichtlich ihrer interessanten chemischen Profilierungsdaten unterschieden. Die zweite Priorisierungs-Runde wird anhand unten angegebener Tabelle 5 vorgestellt.

Tabelle 5: Die Priorisierungs-Kandidaten der zweiten Gruppe mit interessantem Metabolitenmuster .

Stamm –ID	biologische Aktivität
0.024(4:1: 1:1-1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:	auffällige chemische Diversität, breite
0-024 (Acidianus ambivalentis)	antimikrobielle Aktivität
0-047 (Acidithiobacillus caldus)	antibakteriell wirksam
0-049 (Haloterrigen thermotolerans)	spezifisch antimikrobiell gg. Myxobakterien
2-003 (Streptomyces sp.)	starke zytotoxische Aktivität, spezifische
	antimikrobielle Wirksamkeit
3-015 (unspezifiziertes Bakterium)	sehr spezifisch gg. Gram-positive Bakterien
3-018 (unspezifiziertes Bakterium)	stark zytotoxisch

Eine große, immer zu vermeidende Gefahr sind mögliche Infektionen der Kulturen, die z.B. durch Hefe verursacht werden, und fälschlicherweise zu einem positiven Testergebnis führen.

Hierbei bedingt die Anzuchtstemperatur thermophiler Stämme eine größere Anfälligkeit gegenüber Hefe-Stämmen. Auch hier diente die zweite Stamm-Anzucht als Möglichkeit eine eventuell infizierte Anzucht, die zur Verfälschung der Ergebnisse führen würde, zu entdecken.

2.3 Screening-Methoden

Allgemeines

Die biologische Aktivität von Extrakten ist der Ausgangspunkt für die strategische Suche nach den potentiell wirksamen, einzelnen Verbindungen.⁶¹. Diese werden mit sehr hohem Durchsatz in einem ausgewählten Screening auf ihre spezifische Bioaktivität getestet. Die Extrakte eines bestimmten, zur Kultivierung ausgewählten Mikroorganismus können die Wachstumsinhibierung bestimmten einer Spezies, eine antibiotische oder entzündungshemmende Wirkung oder andere physiologisch relevante Phänomene zeigen. Hierbei können viele Parameter den Einsatz in den biologischen Tests stören und erschweren. Ein großes Hindernis stellt die Unlöslichkeit des Extraktes oder der Fraktion dar. Andere Faktoren sind nicht gleich offensichtlich: chemische Veränderungen während der Extraktion, Verschwinden der Aktivität unter bestimmten Konzentrationsgrenzen. Jedes beschriebene Testsystem ist zu validieren, d.h. wird mit bekannten Wirksubstanzen verglichen und damit kann der Bioassay erst verlässlich zur Identifizierung eines bioaktiven Agenz führen.

Ziel ist immer die Entwicklung von spezialisierten Screening-Assays, z.B. zum Auffinden von Krebstherapeutika. Einer der häufig benutzten Assays zum Aufspüren von pharmazeutisch relevanten Substanzen ist der Test auf die Zytotoxizität einer Verbindung. Nachdem ein aktiver Extrakt im Test als Wachstums-inhibierend aufgefallen ist, folgt die chemische Analyse mit Datenbankabgleich und optional die Isolierung der biologisch aktiven Substanzen. Der Vergleich von Verbindungen mit bekannten Strukturen, ist von hohem Interesse. Datenbanken sind hier unerlässlich. Die Strukturbestimmung geschieht durch Einsatz moderner spektroskopischer und spektrometrischer Methoden. Dem Pfad einer bestätigten Aktivität des Extraktes zu folgen bedeutet, eine Entscheidung über die richtige und effektivste Methode zu treffen, bei der die Bioaktivität zur Kontrolle des Isolierungsprozesses dient. Sind in dem Extrakt mehrere Substanzen enthalten, die eine Bioaktivität, z.B. Zytotoxizität zeigen, können sie als Mischung ein positives Ergebnis liefern, das nicht auf die

Reinsubstanz zurückzuführen ist, welches die Isolierung der Wirkprinzipien sehr erschwert. 62,63

Wichtig ist, dass bereits mehrfach vorkommende und bekannte Metabolite rechtzeitig erkannt werden, und somit aus der Wirkstoffsuche ausgeschlossen werden.

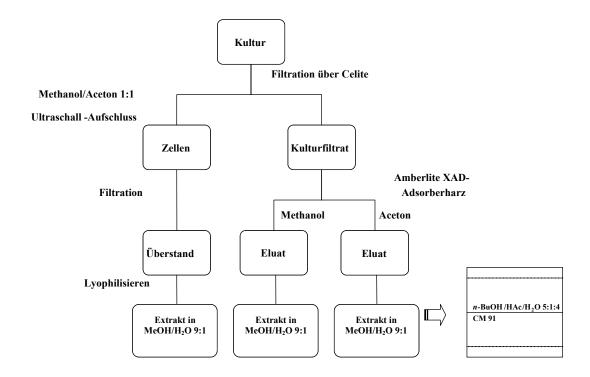
2.3.1 Kultivierung und Extraktherstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit "Wirkstoffe aus extremophilen Mikroorganismen" (WEM) wurden verschiedene extremophile Mikroorganismen chemischen und biologischen Screenings unterzogen, um neuartige Wirkstoffe zu entdecken und nutzbar zu machen.

Projektarbeiten

Die Kultivierungen erfolgten mit den für jeden Stamm spezifisch optimierten Bedingungen. In der ersten Kultivierungsphase (sogenannte erste Stamm-Anzucht, vgl. Abbildung 11) wurden die Stämme auf ein auffälliges chemisches Metabolitenmuster und signifikante biologische Aktivität analysiert. Nach abgeschlossener chemischer und biologischer Profilierung wurde die zweite Kultivierungsphase eingeleitet (zweite Stamm-Anzucht), mit dem Ziel der Wiederfindung der in der Screeningphase aufgefallenen Metabolite und Aktivitäten. Nach erfolgter Untersuchung wurde in Absprache aller Kooperationspartner eine Auswahl an den Stämmen getroffen (Priorisierung), die weiterhin in Großmaßstab (*scale-up*) untersucht werden, um möglichst das Wirkprinzip zu isolieren.

Im scale-up wurden die Stämme in den Nährstoffmedien kultiviert, mit denen ein Extrakt mit entsprechender biologischer Aktivität produziert wurde. Die Inkubation der Schüttelkulturen erfolgte zum einen an der Universität Göttingen in vier verschiedenen Medien: Malzextrakt-Hefeextrakt (M2), Stärke-Glucose-Glycerin (SGG), Soja-Mannit (SM) und Hafer-Medium (Hf). Die Kultivierung der Stämme im Fermenter erfolgte in den SM- und SGG-Medium. Die scale-up Fermenter in der technischen Mikrobiologie an der TU Hamburg-Harburg und im ZEB Darmstadt wurden mit anderen Nährmedien durchgeführt (vgl. Kap. B.5.3). Bei der Durchführung des Screenings wurden pro Nährmedium jeweils zwei Erlenmeyerkolben die Stabilität die angesetzt, um des Stammes und Reproduzierbarkeit Sekundärmetabolitenbildung zu überprüfen. Für die Herstellung der Rohextrakte aus den Kulturen und vergleichend aus den verwendeten Nährmedien wurde ein allgemeines Verfahren zusammengestellt, um ein möglichst breites Spektrum an Wirksubstanzen aus den Stamm-Isolaten zu erfassen (Aufarbeitungsschema 1).



Aufarbeitungsschema 1: Standardverfahren zur Herstellung von Extrakten im WEM-Projekt

Die Kulturbrühe wurde auf einen pH-Wert von 5.6 mit 1 m HCl eingestellt und mit Celite versetzt. Das Kulturfiltrat wurde von den Zellen mittels Filtration (Vakuum-Nutsche) abgetrennt. Den Kulturüberstand gab man auf Amberlite®XAD-2-Adsorberharz. Zur Erfassung eines möglichst breiten Metabolitenspektrums wurden aufgrund des Polaritätsunterschiedes, die Lösungsmittel Methanol und Aceton zur Eluierung des Amberlite®XAD-2-Adsorberharzes verwendet. Daher wurde parallel mit Methanol und mit Aceton eluiert. Die Zellen wurden in Methanol/Aceton 1:1 aufgeschlossen und der Überstand von dem Rückstand abfiltriert. Das Kulturfiltrat und die Eluate wurden gefriergetrocknet, die Lyophilisate (Extrakte) jeweils in 2 mL Methanol/Wasser 9:1 aufgenommen.

Die Testreihen zur Untersuchung der Wirkstoffproduktion enthielten Sets aus bearbeiteten Fermentationsansätzen mit den folgenden Bezeichnungen:

- "XA" für Aceton-Eluat von Amberlite[®]XAD-2-Adsorberharz
- "XM" für Methanol-Eluat von Amberlite[®]XAD-2-Adsorberharz
- "K" für Kulturfiltrat der vereinigten Amberlite[®]XAD-2-Eluate oder andere verarbeitete Überstände.

Aufgearbeitete Zellsedimenten:

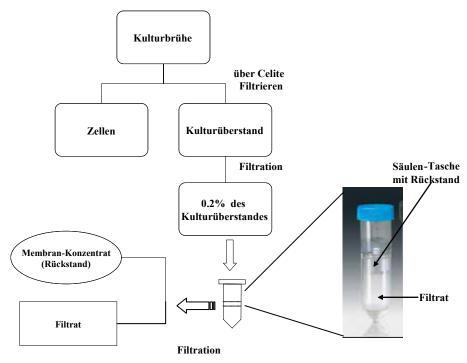
- "M" steht für Methanolextrakt der Zellen entsprechende Medienkontrollen:
 - "NXA" Nährmediumüberstand über Amberlite[®]XAD-2-Adsorber gebracht und mit Aceton eluiert
 - "NXM" Nährmedium über Amberlite[®]XAD-2-Adsorber, mit Methanol eluiert und
 - "NM" als Methanolextrakt der Feststoffe im Medium.
 - Die Bezeichnung "R" steht für den methanolunlöslichen Rückstand.

Aus 50 mL der Kulturbrühe wurden die Extrakte aus dem chemischen Screening in 2 mL Methanol/Wasser 9:1 aufgenommen und bei -20 °C für die Biotestreihen der BRAIN AG und das chemische Screening aufbewahrt. Die Rohextrakte der Upscale-Fermenter (z. B. 1 Liter) wurden nach dem gleichen Verfahren für die Wirkstoffuntersuchung in 2 mL Methanol/Wasser 9:1 gelöst, davon wurden 100 μ L abgenommen (5 Vol-% Aliquot = 50 mL Kultur) und mit 900 μ L Methanol/Wasser 9:1 verdünnt.

Im Vorfeld und mit Hinblick auf die datentechnische Erfassung von Assay-Ergebnissen war bereits eine projektintern einheitliche Nomenklatur für zu kultivierende Stämme, Isolate, die Anzahl der durchgeführten Anzuchten sowie für daraus resultierende Extrakte so festgelegt worden, dass diese möglichst Datenbank-kompatibel ist. So ist der Extrakt 3-017-2-M (s. Vorlage) durch die Nummer des bereitstellenden Projektpartners (3 = BRAIN), eine fortlaufende Zahl der von diesem Partner bereitgestellten Stämme (017 = der 17. Stamm aus BRAINs Bioarchiven), die Nummer der Anzucht dieses Stammes (2 = 2. Anzucht) und die Extraktionsmethode (M = Extraktion der Zellen) eindeutig definiert. Neben der Vergabe von identifizierenden Nummern für die einzelnen Projektpartner (0 = ZEB, 1 = TUHH, 2 = UGÖ, 3 = BRAIN) war vor allem die strikt einheitliche Benennung der verwendeten Extraktionsmethoden wichtig für das Funktionieren dieses Systems.

Erweiterung des Metaboliten-Strukturraumes

Für die Herstellung von Rohextrakten aus den Kulturen wurden etablierte naturstoffchemische Methoden erprobt. Dabei war nicht eindeutig, ob diese Verfahren geeignet sind höher molekulare, peptidische Substanzen, z.B. Bakteriocine, zu erfassen. Mit dem Ziel, die eventuell vorhandenen peptidischen Wirkstoffe in aktiven Konformationen zu erhalten, wurde die Verwendung der Ultrafiltration zur Peptidanreicherung eingeführt. Die Methode der Ultrafiltration zur Herstellung von Extrakten mit hohem peptidischen Anteil wurde durch den Einsatz von speziellen Membranen mit hohem Regenerationsfaktor und breitem Bereich für die Molmassen (bis 3 KDa) erzielt. Dafür wurden die VIVASPIN®-Minisäulen eingesetzt. Die gewonnene Kulturbrühe wurde mit Celite versetzt und auf pH = 5.6 mit 1 m HCl eingestellt. Nachdem die Zellen durch Zentrifugieren von der Kulturbrühe getrennt wurden, wurde das klare Filtrat auf eine VIVASPIN®-Minisäule aufgetragen und erneut zentrifugiert. Das Konzentrat aus der Tasche (Rückstand) und das Filtrat wurden für biologische Tests der BRAIN AG bereitgestellt. Gleichzeitig wurden die Nährmedien nach dem obengenannten Verfahren aufgearbeitet. Die Aufarbeitungsmethode wurde wie im Aufarbeitungsschema 2 durchgeführt:



Aufabeitungsschema 2: Aufkonzentrieren von Proteinen durch VIVASPIN[®]-Minisäulen.

Speziell für die Detektion anti-archaeal-wirksamer (peptidischer) Substanzen im Plattendiffusions-Assay wurde *Halobacterium* YC819-9 ausgewählt. Alle Assays wurden nach 24 und 72 h ausgewertet, da die Ausbildung von Hemmzonen teilweise verzögert auftrat. Die Nährmedien selbst wurden in allen Tests hinsichtlich ihrer inhibierenden Eigenschaften getestet, um die Auswertungen gegen falsch-positive Ergebnisse absichern zu können.

Für die Probenbenennung wurden zwei neue Kennzeichen eingeführt (s. Vorlage); das Membran-Konzentrat (Rückstand) wurde als PF abgekürzt (PF = Peptidextrakt-Filter), das Filtrat wurde als PU gekennzeichnet (PU = Peptidextrakt-Unkonzentriert).

2.3.2 Bioaktivitätsbasiertes Extraktscreening

Projektarbeiten

Nachdem die Kulturüberstände und Zellmassen zum Extrakt aufgearbeitet wurden, wurden die Extrakte systematisch den Biotests der Firma BRAIN unterzogen.

Je 25 μL Aliquot eines Extraktes wurden in einzelnen Tests gegen folgende Indikatororganismen eingesetzt:

<u>Bakterien</u>: Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus, Escherichia coli, Mycobacterium smegmatis, Pseudomonas fluorescens, Halobacterium sp., Sporobolomyces johnsonii, Candida glabrata; <u>Hefen</u>: Saccharomyces, Pichia, Candida albicans, Sporobolomyces.

Daneben wurden die Extrakte ausgewählter Extrakte priorisierter Stämme in erweiterten Assays gegen *Streptococcus mutans* (Karies-Erreger) und *Propionibacterium acne* (Akne-Erreger) getestet.

In ersten Zytotoxizitätsassays wurden Aliquots der Extrakte auf Hamster-CHO-K1-Tumorzellen getestet. Hierfür wurde eine Extraktverdünnung von 1:1000 im Assay eingesetzt und die Überlebensrate wurde nach 48 h Inkubation gegenüber einer nur mit Methanol (1:1000) inkubierten Kontrolle (=100%) bestimmt. Für die erhaltenen Daten einzelner Extrakte wurden die Hemmhofdurchmesser (antibiotische Aktivität) und die Überlebensrate (Zytotoxizität) der Tumorzellen miteinander verglichen, um zusammen mit der Methode des chemischen Screenings der Auswahl auf die produktivsten Stämmen zu lenken. Die Stämme, die in mehr als einem Assay als potent eingestuft worden sind, wurden denen gegenüber bevorzugt, die nur chemisch interessante Metabolite ohne entsprechende Aktivitäten versprechen.

Zusätzlich wurden die ausgewählten Extrakte priorisierter Stämme, die in den Overlay-Tests antimikrobielle Wirkung gezeigt haben, im Test gegen ausgewählte multiresistente *Staphylococcus*-Stämme eingesetzt. Klinisch besonders interessant sind dabei die Resistenzen gegen Ciprofloxacin, Amoxicillin und Mupirocin.

2.3.3 Chemisches Screening

Allgemeines

Es ist eine effiziente Methode, die bekannten von den unbekannten Komponenten vor dem Isolierungsaufwand zu detektieren ("Dereplikation") und nach Möglichkeit bekannte Strukturelemente bereits im Voraus auszumachen. Es ist inzwischen möglich, durch die Angabe des anhand der Masse vermuteten Fragments, alle Einträge einer Datenbank, z. B. "AntiBase", auf der Suche nach dem passenden/leitenden Strukturelement abzufragen.

Projektarbeiten

Die lyophilisierten Extrakte wurden jeweils in 2 mL Methanol/Wasser 9:1 aufgenommen und 20 μL dieser Lösung wurde auf HPTLC-Kieselgelplatten (Kieselgel®60 mit F₂₅₄-Aktivität) aufgetragen. Um einen möglichst breiten Polaritätsbereich abdecken zu können, entwickelte man die Chromatogramme in zwei Laufmittelsystemen, Chloroform/Methanol 9:1, sowie *n*-Butanol/Essigsäure/Wasser 5:1:4 (nur Oberphase). Durch die spezifischen Reaktionen mit Anfärbereagenzien (Anisaldehyd/H₂O, Orcin-Sprühreagenz, Ehrlich's Reagenz) in der Dünnschichtchromatographie, als auch über UV-Absorption/Fluoreszenz bei 254 nm und 366 nm kann auf das Vorhandensein von funktionellen Gruppen geschlossen werden. So lassen sich mit Anisaldehyd u.a. Steroide und höhere Alkohole, mit Ehrlich's Reagenz u.a. Amine und mit Orcin z.B. Zucker nachweisen.

Die Fraktionen, die ein interessantes Metabolitenspektrum zeigten, also ein gewisses "chemisches Potential" aufwiesen, wurden weiter bearbeitet. Zusätzliche spektroskopische Analyse von Extrakten mithilfe der HPLC-MS-DAD (Diode Array Detector), lieferte UV-Profile, Massenpeaks und Retentionszeiten des Metabolitenpatterns zur Profilierung.⁶⁴ Diese wiederum wurden für den ersten Dereplikationsschritt mit etablierten Datenbanken Metabolite verglichen "Dictionary of Natural Products" bekannter Chapman & Hall/CRC) und "AntiBase" (Chemical Concepts). Somit konnte zeitnah die biologische Analyse einer Fraktion nach der biologischen Wirkung massenspektrometrische Analyse des gleichen Substanzgemisches durchgeführt werden.

Im direkten Vergleich der Ergebnisse des dünschichtchromatographischen Screenings (Chloroform/Methanol 9:1 gegen n-Butanol/Eisessig/Methanol 4:1:5) wurde zunehmend

auffällig, dass das Metabolitenmuster aus überwiegend polaren Substanzen bestand. Erfahrungsgemäß ist die Isolierung solcher Stoffe durch übliche chromatographische Methoden sehr aufwendig. Die Isolierung sehr polarer Reinstoffe ist mit der Auftrennung mittels HPLC-UV verbunden, dennoch sind auch viele der Substanzen durch Anwendung dieses Verfahrens nicht fassbar wie z.B. alle Metabolite ohne Chromophor.

Die Ergebnisse des chemischen Screenings wurden in der eigenen Datenbank gesammelt ("WEM-Datenbank", BRAIN AG, vgl. Kap. A.2.1) und allen Partnern zugänglich gemacht. Mit den Ergebnissen aller vorausgehenden Resultate erfolgte eine abschließende Beurteilung der Kandidaten.

Zum hier angesprochenen chemischen Screening gehörte auch das HPLC-DAD-Screening als weitere Methode zur Untersuchung des Metabolitenspektrums von Mikroorganismen angewendet. Dafür wurden die Extrakte der priorisierten Kandidaten in HPLC-Methanol (analytische Reinheitsgrad) aufgenommen, eine Konzentration von 5 mg/mL wurde eingestellt. Nachdem die gelösten Proben von den Schwebeteilchen mittels Zentrifugieren abgetrennt wurden, wurden die Proben für die HPLC-Analyse bereitgestellt. Die Extrakte aus dem ZEB Darmstadt und TU Hamburg-Harburg mussten für die analytische HPLC-Messung von dem Wasser unter verminderten Druck (20 mbar) zuerst befreit werden. Die bis zur Trockne eingeengten Extrakte wurden in HPLC-Methanol aufgenommen und die Konzentration wurde auf 5 mg/mL eingestellt. Nachdem die Proben zentrifugiert wurden, wurde der Überstand entnommen und für die HPLC-Messung bereitgestellt. Nach dem gleichen Verfahren wurden die Proben von den weiter bearbeiteten Extrakten (säulenchromatographisch aufgetrennt) fertig gestellt. Es wurde anhand der Anzahl der im Extrakt oder in der Fraktion vorhandenen Komponenten, Retentionszeiten, UV-Spektren und zuletzt der vorhandenen Massen einzelner Substanzen entschieden, welche Fraktionen weiter bearbeitet wurden. Als Kriterien dienten ein interessantes Metabolitenmuster mit vielen UV-aktiven Komponenten dessen Retentionszeit und Massen nicht mit den Einträgen in den Datenbanken wie "Dictionary of Natural Products" (Chapman & Hall/CRC) und "AntiBase" (Chemical Concepts) übereinstimmten. 65, 66

2.3.4 Genom unterstütztes Screening

Allgemeines

Viele Gruppen von extremophilen Mikroorganismen wachsen im Labor nicht zu großen Zelldichten heran, was der Ausbeute an Substanzen die natürlichen Grenzen setzt. Um eine Fermentation effizienter zu gestalten, wurde die rekombinante Biosynthese der Sekundärstoffe in bekannten, hochaktiven Wirkstoffproduzenten angestrebt.

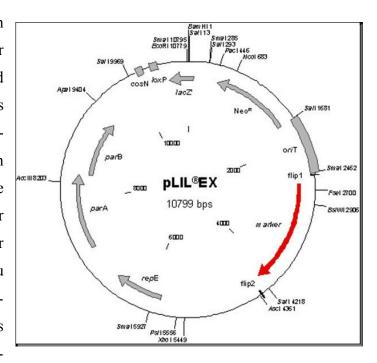
Projektarbeiten

Das Ziel ist, die Gewinnung der Wirkstoffe im großen und effektiven Produktionsmaßstab zu erreichen, um auf diese Weise bei der Fermentation und der anschließenden Reinsubstanzgewinnung Rohstoffe und Materialien einzusparen. Als Wirte für die heterologen Expressionssysteme sollten neben E.coli vor allem die Actinobacteria (speziell Streptomyces) eingesetzt werden. Diese Stämme wurden besonders wegen ihrer eigenen Biosynthesepotentiale und damit verbundenen Resistenzmechanismen für die Expression heterologer Biosynthesegencluster ausgewählt. Dafür wurden die Isolate aus erwähnten Sammlungen extremophiler Mikroorganismen (vgl. Kap. A.2.2, Tabelle 2) einem sequenzhomologen Screening und PCR-Typisierung unterzogen. Die Sonden biosynthetische Modifikationsaktivitäten (Glycosyltransferasen, Halogenasen, DAHP-Synthasen, isoprenylierende Enzyme) und ganze Gencluster für die Sekundärstoff Biosynthesewege (Polyketidsynthase I+II, nichtribosomale Peptidsynthase) wurden in ihrer Spezifität für die jeweilige Target-DNA angepasst und degeneriert (GC-Gehalt, "codon usage"). Erhaltene PCR Produkte werden kloniert und sequenziert und somit für eine spätere Verwendung als Hybridisierungssonde konserviert. Außerdem wurden Cosmid- und BAC Klone insofern für die Expression erweitertet, um mittels rekombinanter Verfahren zunächst im Labormaßstab neue und neuartige Enzym-Aktivitäten zu identifizieren und nachfolgend effizient produzieren zu können. Ebenso wurde aus den sieben priorisierten Kandidaten bereits hochmolekulare, genomische DNA isoliert.

Erfassung des genetischen Potentials in genomischen "large-insert-libraries"*

Allgemeines

Niedermolekulare Wirkstoffe werden von Gruppen sukzessiv arbeitender Syntheseenzyme hergestellt und modifiziert. Diese Gene liegen oftmals gruppiert in Form von Biosynthese-Genclustern den in Mikroorganismen vor. Um entsprechende Cluster als Funktionseinheiten in einer Genbank abzubilden, ist es notwendig, für die Anlage der Genbanken Vektoren zu wählen, die entsprechend große DNA-Fragmente stabil einbringen können. Es werden in der Regel Fosmid- oder BAC-



Vektoren eingesetzt, die bei Insert-Kapazitäten zwischen 50-200 kb reine *E.coli* Systeme darstellen. Für eine effiziente heterologe Expression werden daher die entsprechenden Inserts in die Shuttle-Vektoren umgebaut.

Projektarbeiten der BRAIN AG

Für das Projekt wurde von der BRAIN AG ein BAC-Vektor pLIL®EX BAC-Basisvektor konstruiert, in dem die shuttle-Funktion (wirtsspezifische Module) verschiedener Expressionswirte flexibel über einen Set sogenannter Flip-Konstrukte gerichtet eingebracht werden kann. Bei den Modulen handelt es sich jeweils um Kassetten, die einen wirtsspezifisch funktionsfähigen Resistenzmarker sowie Sequenzen eines ebenfalls wirtsspezifischen Phagensystems (int/attP) besitzen. Dieses BAC-Vektorsystem baut auf einem Basis-Vektor zur Herstellung von hochmolekularen Insert-DNA-Genbanken auf. Ausgehend von dem käuflichen Vektor pIndigoBAC wurde der vorhandene Resistenzmarker durch eine Neomycin-Resistenz Kassette (neo^R) ausgetauscht. Aus dem Vektor pOJ436

^{*} mit freundlicher Gehnemigung von BRAIN AG.

(Cosmid-Vektor) wurde weiterhin der "origin of transfer replication" einkloniert (*oriT*), um den Transfer der entsprechenden Vektoren in die Expressionsstämme mit mehreren Methoden zu ermöglichen (z.B. Transformation oder Konjugation). Der auf diese Weise konstruierte pLIL®EX BAC-Basisvektor ermöglicht die Expression von DNA von interessant eingestuften Mikroorganismen in den jeweiligen Expressionswirten.

Konstruktion von FLIP-Vektoren:

Im Rahmen des Projektes hat die BRAIN AG zwei FLIP-Konstrukte zur Verwendung in den Expressionswirten *Mycobacterium* sp. bzw. *Streptomyces* sp. entworfen und eingesetzt. Unter anderem wurde jeweils das in der FLIP-Kassette vorhandene *ccdB*-Gen gegen wirtspezifische Integrationselemente (*int*-attP) und Resistenzgene (Gm^R bzw. Ap^R) (A), z.B. aus pMH497 (B) bzw. pOJ436 (C) ausgetauscht (Abbildung 12).

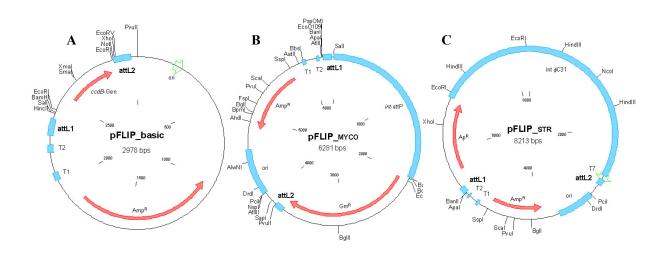


Abbildung 12: Vektorkarte des FLIP Basis-Vektors, und des *Mycobakterium*-(**B**) und *Streptomyces*-(**C**) spezifischen FLIP-Vektors.

Der pLIL®EX BAC-Vektor wurde mit den beiden FLIP-Vektoren pFLIP $_{MYCO}$ (**B**) und pFLIP $_{STR}$ (**C**) durch eine Klonierungssequenz in die shuttle-BAC-Vektoren pLIL $^{®}$ EX $_{MYCO}$ und pLIL $^{®}$ EX $_{STR}$ umgewandelt (Abbildung 13). Somit wurden drei funktionelle BAC-Vektoren für die Herstellung der Genbanken priorisierter Kandidaten und die nachhaltige Expression von Biosynthese-Gencluster in *Mycobacterium* sp. und *Streptomyces* sp. bereitgestellt.

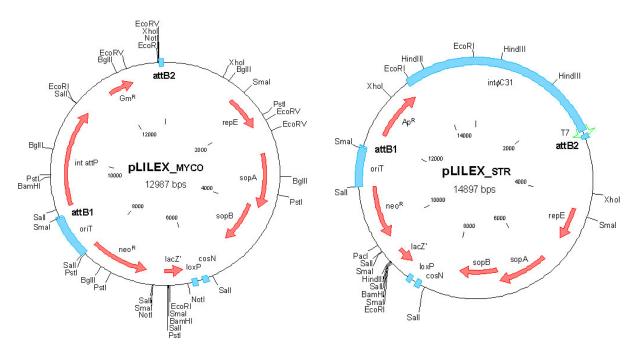


Abbildung 13: Vektorkarte der beiden shuttle-BAC-Vektoren für die Expression von Genclustern in *Mycobacterium* (MYCO) und *Streptomyces* (STR).

Aus den jeweiligen extremophilen Stamm-Isolaten wurde hochmolekulare (>600 kb), chromosomale DNA isoliert und aufgereinigt. Die DNA wird nach partieller Hydrolyse durch Restriktionsenzyme mit den entwickelten Vektoren (40-300 kb je nach Vektor) ligiert und zur Transformation von *E. coli* eingesetzt. Zur Erreichung einer 99%igen Abdeckung eines durchschnittlichen, 4 Mb-großen Bakteriengenoms dienen die modifizierten Cosmid- bzw. BAC Klone. Durch sequenzhomologes Screening wurden die Klone auf einen vollständigen Wirkstoffbiosynthese-Gencluster in Einzeltests getestet. Auf diese Weise wurden die Genombanken für die heterologe Expression priorisierter Kandidaten zur Wirkstoffproduktion hergestellt.

2.4.1 Übersicht zur biologischen Profilierung und chemischen Analytik ausgewählter Stämme

Mit den in Kap. 2.3 aufgeführten Methoden wurden 10 Stämme bearbeitet. Einen Überblick des biologischen Screening der priorisierten Kandidaten und deren Aktivität gegen verschiedene Testorganismen sind in der Tabelle 6 zusammengefasst. Dabei sind nur die Ergebnisse der Extraktprofilierung aufgelistet. Die jeweiligen einzelnen Fraktionen oder die Reinsubstanzen, die ebenfalls getestet wurden, sind nicht im Vergleich enthalten. Die aufgelisteten Resultate sind die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen von den jeweils jüngsten Anzuchten hinsichtlich der biologischen und zytotoxischen Wirksamkeit priorisierter Kandidaten.

Hierbei zeigten die Methanol-Eluate (XM) im Vergleich mit den entsprechenden Aceton-Eluaten (XA) unterschiedlich große Hemmhöfe, das heißt, es konnte keine allgemeine Tendenz bezüglich der Aktivität festgestellt werden.

Die Bewertung des zytotoxischen Ratings verlief nach folgender Skala: Bewertung 3 (starke Zytotoxizität), Bewertung 2 (mittlere Zytotoxizität) und Bewertung 1 (leichte Zytotoxizität). Alle *Overlay*-Tests wurden einem Verdünnungsgrad (2:1) entnommen.

Die alle hier aufgelisteten Extrakte zeigten gegen den Testorganismus *Streptococcus mutans* keine Inhibition.

Alle Daten wurden in der SQL-Datenbank in aktueller Form zur Weitererfolgung priorisierter Kandidaten zusammengestellt.

Ein aktuelles Problem bei der Suche nach neuartigen Stoffen in der Naturstoffforschung ist die Reisolierung bereits bekannter Verbindungen. Somit wurden auch in diesem Projekt aus verschiedenen extremophilen Mikroorganismen literaturbekannte Sekundärmetabolite isoliert. Durch den Einsatz von Naturstoffbanken wie "Dictionary of Natural Products" (DNP, Chapman & Hall/CRC) und "AntiBase" (Chemical Concepts) konnten schnell und effizient die Naturstoffe einer Substanzklasse zugeordnet und identifiziert werden.

Tabelle 6: Die biologische Profilierung priorisierter Kandidaten^[a]:

Stamm	Medium/ Ansatz [L]	Rating (1:1000)	Staphylococcus aureus [mm]	Bacillus subtilis [mm]	Spor. johnsonii [mm]	Escherichia coli [mm]	Pseudomonas fluorescens [mm]	Mycobacterium smegmatis [mm]	Micrococcus luteus [mm]	Halobacterium sp. [mm]
0-024	Medium Oeiras	2 (XA)	15 (XM) 13 (XA)	16 (XM) 15 (XA)	15 (XM) 15 (XA)	13 (XM)	15 (XM) 13 (XA)	14 (XM)	15 (XM) 13 (XA)	- -
0-029	M 158	-	-	13 (PU)	-	-	-	-	-	25 (PU)
0-047	M 150a (13L)	nicht validiert	13 (M) 14 (PU) 12 (PF)	15 (M) 14 (PU) 16 (PF)	12 (PU) 12 (PF)	12 (PU) 12 (PF)	15 (M) 14 (PU) 16 (PF)	16 (PF)	13 (M) 14 (PU) 14 (PF)	12 (PF)
1-004	M 740 (20 L)	2 (XM) 3 (XA)	12 (XA)	14 (XM) 16 (XA)	12 (XM) 14 (XA)	16 (XA)	- -	14 (XM) 16 (XA)	- 14 (XA)	35 (XM) 35 (XA)
2-003	M1 (1L)	3 (M)	-	16 (M)	-	-	-	-	16 (M)	-
3-001	M5 (10L)	1 (M)	20 (K)	-	16 (K)	-	-	-	-	-
3-002	M2 (10L)	3 (K)	-	-	14 (K)	-	-	-	-	-
3-009	M3 (10L)	3 (M) 1 (K)	-	-	-	-	-	-	-	-
3-015	M2 (10L)	3 (M) 2 (K)	-	-	17 (K)	-	-	-	-	-
3-018	M4 (5L)	3 (M) 2 (K)	-	-	-	-	-	-	15 (K)	-

Probenbenennung:	0 - Darmstadt	Nährmedium-Nummerierung (M): M1 = SM-Medium	Extrakttypen: M = Methanolextrakt der Zellen		
	1 – Hamburg	M2 = SGG-Mediu	XA = XAD mit Aceton eluiert		
	2 – Göttingen	M3 = Hafer-Mediu	XM = XAD mit Methanol eluiert		
	3 – BRAIN AG	M4 = M2-Medium	PU = unkonz. Peptidextrakt		
F 3					

 $^{^{[}a]}$ die Overlay-Bewertung wurde in Hemmhofdurchmesser [mm] angegeben.

PF = Filter-Peptidxtrakt

K = Kulturfiltrat

Stamm 0-024 (Acidianus ambivalentis)

Biologische Aktivität

Das Extrakt 0-024-8 (Anzucht Nr.8) des Stammes 0-024 wurde aus Darmstadt zur weiteren Bearbeitung bereitgestellt (Kultivierungsbedingungen in Medium Oeiras, bei 80 °C, pH = 3.0, vgl. Kap. B.5.4.2). Der Stamm war von besonderem Interesse wegen Aktivität seines Extrakts in dem Anzucht Nr. 6 0-024-6-XM (Methanol-Eluent des Amberlite® XAD-2-Adsorberharzes, s. Vorlage) gegen die in der Tabelle 6 aufgelisteten Testkeime. Die biologische Aktivität in dem 0-024-6-XA (Aceton-Eluent des Amberlite® XAD-2-Adsorberharzes) gegen die genannten Keime (Tab. 6) war ebenfalls von besonderer Bedeutung (die Probenvorbereitung für die biologische Testsystemen vgl. Kap. A.2.3.1). In der nachfolgenden Anzucht Nr.7 wiederholten sich die positiven Ergebnisse des Extraktes 0-024-7-XM gegen *S. aureus* (HH Ø 15 mm) und *B. subtilis* (HH Ø 13 mm), der Extrakt 0-024-7-XA wirkte erneut gegen *B. subtilis* (HH Ø 12 mm).

Der Produzenten-Stamm 0-024 wurde nach diesen Erfolgen als potent eingestuft. In der chemischen Profilierung sollte geklärt werden, welche Substanz für Wirkung verantwortlich seien könnte. Die Aktivität im Zytotoxizitäts-Test (mittel zytotoxisch, Bewertung 2) konnte in nachfolgender Fermentationen 0-024-8 bei den Extrakten 0-024-8-XM bzw. 0-024-8-XA wiedergefunden werden. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in der Tabelle 3 aufgelistet (erfolgreiche Produzenten, s.o).

Chemisches Screening

Bei der Begutachtung des chemischen Potentials ergab sich ein interessantes Metaboliten-Muster auf Kieselgel $^{\mathbb{R}}$ 60 F₂₅₄ (schematische Darstellung, Abbildung 14), das vor allem zwei Hauptkomponenten enthielt.

Die zwei auffällige Metabolite sind mit Anisaldehyd intensiv violett färbend (Kieselgel $^{\$}$ 60, Chloroform/Methanol (CM) 9.1, R $_{f}$ -Wert = 0.31 und 0.82). Nach chromatographischer Auftrennung des Extraktes 0-024-8XA (64.5 mg) auf Sephadex LH-20-Säulenmaterial (Methanol, 2.0×150 cm), wurden die erhaltenen Fraktionen 0-024-8-XA6, 0-024-8-XA7 und 0-024-8-XA8 dem HPLC-MS-Screening unterzogen (HPLC-MS-DAD 1, Säule 1, Programm 1, vgl. Kap. B.5.2.I.A.1.a). Die Fraktion

0-024-8-XA6-2 (54.2 mg) war am meisten mit den violett-anfärbenden

Abbildung 14: Skizze des Dünnschichtchromatogrammes des 0-024 Extraktes

0.82

0.31

Substanz angereichert, daher wurde diese zuerst weiter chromatographisch aufgereinigt (Kieselgel[®] 60, Dichlormethan/Methanol (DM) 2:1, 2.0×20.0 cm). Die anschließende ESI-MS-Analyse der Fraktion mit der violett-anfärbenden Substanz ergab die mögliche Molmasse von m/z = 169.2 ([M+H]⁺) im positiven Mode bzw. 167.3 ([M-H]⁻) im negativen Mode (M = 168 g/mol). EI-MS (70 eV) bestätigte schließlich die vermutliche Molmasse mit m/z (%) = 168.1 amu (100) ([M]⁺), 140.1 amu (20), 114.1 amu (16) (Abbildung 15).

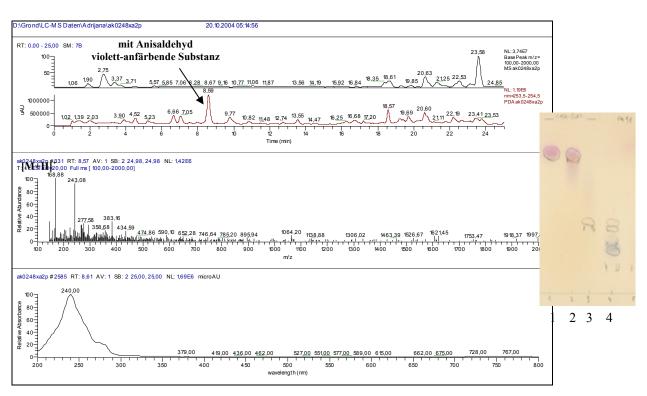


Abbildung 15: HPLC-MS-DAD-Analyse der Fraktion 0-024-8-XM6-2 (λ = 254 nm, R_t = 8.6 min) mit dem dazugehörgen Dünnschichtchromatogramm (CM 9:1, Anisaldehyd).

Stand der Bearbeitung

Eine weitere Aufarbeitung mittels präparativer Säulenchromatographie erbrachte eine nicht zufriedenstellende kleine Substanzmenge (aus 8.7 mg der Fraktion 0-024-8-6XM-21 wurden 0.2 mg gewonnen). Daher wurde keine der Substanzen spektroskopisch und spektrometrisch charakterisiert. Als weiterer Schritt mit dem Ziel einer chemischen Charakterisierung wurde eine Fermentation im Großmaßstab geplant.

Stamm 0-029 (Thermoplasma acidophilum)

Biologische Aktivität

Die Fermentation des Stammes 0-029-1 (erste Anzucht) wurde in Darmstadt unter den in Kap. B.5.4.2 angegebenen Kultivierungsbedingungen durchgeführt (Medium 158, 55 °C, pH-Wert = 1.4). Der Stamm erweckte besondere Aufmerksamkeit durch seine im Peptidextrakt aus VIVASPIN®-Minisäulen vorhandenen Aktivität (0-029-1-PU) gegen *B. subtilis* (HH \varnothing 13 mm) und *Halobact*. sp. (HH \varnothing 25 mm) (Tabelle 6).

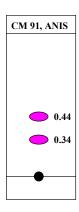


Abbildung 16: Skizze des Dünnschichtchromatogrammes des 0-029 Extraktes

Chemisches Screening

Beide für die Wirkung verantwortlichen Komponenten waren weder durch eine Farbreaktion mit Ansprühreagentien noch durch UV-Absorption bei 254 nm detektierbar. Des Weiteren zeigten zwei Substanzen im Methanolextrakt der Zellen 0-029-1-M (15.1 mg) eine rosa-Färbung mit Anisaldehyd (Kieselgel[®] 60, CM 9:1, R_f -Wert = 0.34 und 0.44) (Abbildung 16). Durch säulenchromatographische Aufreinigung auf Sephadex LH-20-Säulenmaterial (Methanol, 1.0×25.0 cm) wurden beide Komponenten in einer Fraktion erhalten 0-029-1-M3 (0.1 mg).

Stand der Bearbeitung

Die Komponenten wurden nicht weiter aufgetrennt, da die Menge von 0.1 mg nicht erfolgsversprechend erschien.

Stamm 0-047 (Acidithiobacillus caldus)

Biologische Aktivität

Ein weiterer, chemisch sehr interessanter Stamm aus dem Darmstädter Archiv ist 0-047 (DSM Medium 150a, 45 °C, pH-Wert = 0.0 bis 1.0, die Fermentationsbedingungen sind im Kap. B.5.4.2 angegeben). In dem ersten Kultivierungsansatz zeigte der Stamm breite biologische Aktivität (vgl. Tab. 6).

Der Peptidextrakt 0-047-2-PU und der Filter-Peptidextrakt 0-047-2-PF der VIVASPIN®-Minisäulen erwiesen jedenfalls breite antibiotische Aktivität fast gegen alle eingesetzten

Indikatororganismen (nur nicht gegen *P. fluorescens*, *M. smegmatis* und *Halobacterium* sp., Tabelle 6).

Chemisches Screening

In dem chemischen Screening des Extraktes 0-047-3-XM (Amberlite® XAD-2-Adsorberharz mit Methanol eluiert, Nr.3 steht für Hafer-Nährmedium, s. Vorlage) fielen zwei mit Anisaldehyd violett-färbende Substanzen (Kieselgel® 60, CM 9:1, R_f -Wert = 0.72 und 0.91), sowie rosa anfärbende Verbindungen (Kieselgel® 60, CM 9:1, R_f -Wert = 0.23 und 0.33) auf (Abbildung 17).

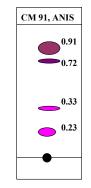
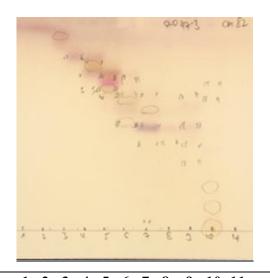


Abbildung 17: Skizze des Dünnschichtchromatogrammes des 0-047 Extraktes

Das Extrakt wurde zur weiteren Verarbeitung auf das Kieselgel[®] 60-Säulenmaterial aufgetragen (CM 8:2, 2.0 × 15.0 cm, 46.1 mg). Aufgrund nur sehr geringer Mengen der isolierten Substanzen

konnte keine abschließende Strukturaufklärung erfolgen. Die gewonnenen elf Fraktionen wogen zwischen 0.1 mg und 6.5 mg, die vier gewünschten Substanzen befanden sich in den Fraktionen Nr. 3 (0.2 mg), Nr. 5 (0.4 mg) und Nr. 7 (0.1 mg). Wie man anhand des abgebildeten Dünnschichtchromatogramm erkennen kann, ist die Auftrennung der Komponenten nicht ausreichend verlaufen (Abbildung 18).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Abbildung 18: Die dünnschichtchromatographische Aufreinigung des Extraktes 0-047-3-XM (CM 8:2, Anisaldehyd).

Zusätzlich wurde eine HPLC-MS-DAD-Untersuchung der Fraktion 0-047-3-XM5 mit der rosa-anfärbender Substanz durchgeführt (Abbildung 19). Es wurde eine Masse von $m/z = 243 ([M+H]^+)$ im positiven Mode gefunden (M = 220 g/mol).

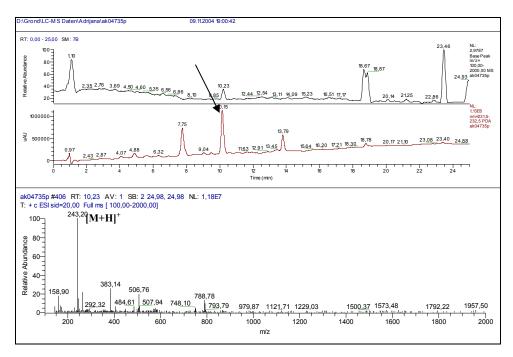


Abbildung 19: HPLC-MS-DAD-Analyse des Extraktes 0-047-3-XM5 (λ = 232 nm, R_t = 10.2 min).

Stand der Bearbeitung

Aufgrund der sehr geringen Menge der isolierten Substanzen konnte keine abschließende Strukturaufklärung erfolgen.

Stamm 1-004 (Fervidobacterium pennivorans)

Biologische Aktivität

Das Kulturextrakt 1-004-2 (zweite Anzucht) hatte sich durch die reproduzierbare sehr zytotoxische (Bewertung 3) sowie biologisch aktive Eigenschaften gegen die in Tab. 6 aufgelisteten Indikatorstämme, in der Liste der priorisierten Kandidaten etabliert.

Chemisches Screening

Eine Fermentation im Großmaßstab (20 L, Medium 740, 65 °C, pH-Wert = 6.8, vgl. Kap. B.5.4.2) wurde mit dem Ziel durchgeführt, aus den Kulturen die bioaktiven Komponenten zu isolieren und die Reinsubstanz für biologische Tests verfügbar zu machen. Die Fraktionen

waren zumeist sehr polar, was bedeutet, dass man die für die Toxizität verantwortliche Komponente eventuell mittels HPLC präparativ erhalten könnte. Die Trennung von 1-004-2-XA (60 mg) (HPLC 1, Säule 9, Programm 4, vgl Kap. B.5.2.III.A.3.b) erfolgte automatisiert durch einen Fraktionssammler, es wurde per eingestellte Zeitspanne von 1 min in das nächste Reaktionsgefäß gewechselt. Anhand des erhaltenen Chromatograms wurden die einzelnen Fraktionen untereinander verglichen und gegebenenfalls vereinigt. Nach dieser HPLC-Trennung des Extraktes 1-004-2-XA wurden die 19 erhaltenen Fraktionen zur biologischen Untersuchung geschickt. Hierdurch erhoffte man sich, die Quelle der Zytotoxizität genauer zu ermitteln und möglicherweise die Substanz zu identifizieren. Mittels durchgeführter Nährmedienkontrolle konnten die aus dem Medium stammenden Komponenten im Chromatogramm zugeordnet werden. Alle Proben wurden zur zytotoxischen Tests an BRAIN AG geschickt. Die erneute Untersuchung der zytotoxischen Werte zeigte, dass die bei $R_t = 3.0 \text{ min}$ (14.0 mg) (erste Fraktion, 1-004-2-XA1) und $R_t = 7.0$ min (28.0 mg) (zweite Fraktion, 1-004-2-XA-2) auftretende Komponenten, die Träger der Zytotoxizität waren. Der Versuch einer erneuten chromatographischen Reinigung der Fraktion 1-004-2-XA1 mittels HPLC (HPLC 1, Säule 7, Programm 5, vgl. Kap. B.5.2.III.A.1.c) wurde durch Erhaltung der unzureichenden Substanzmenge abgeschlossen (Ausbeute der Substanzen 1, 2 und 3: 0.2 mg) (Abbildung 20).

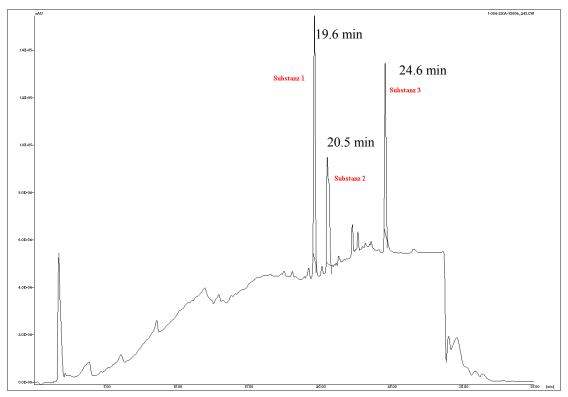


Abbildung 20: HPLC-Trennung der ersten Fraktion 1-004-2-XA1 (λ = 254 nm).

Stand der Bearbeitung

Die drei Hauptkomponenten der aufgereinigten Fraktion 1-004-2-XA1 bei R_t = 19.6 min (0.2 mg), R_t = 20.5 min (0.2 mg) und R_t = 24.6 min (0.2 mg) müssen noch im Zytotoxischen-Assay auf ihre Wirkung geprüft werden. Wenn die Ergebnisse positiv ausfielen, würde eine Großmaßstabfermentation (50 L) eventuell zur Isolierung der reinen Wirkstoffe in ausreichender Menge verhelfen und somit die Strukturaufklärung ermöglichen.

Stamm 3-018 (unspezifiziertes Bakterium)

Biologische Aktivität

Der Stamm 3-018 fiel im *Overlay-Assay* sehr positiv auf. Das chemische Screening wurde in Göttingen in vier ausgewählten komplexen Nährmedien durchgeführt (SM-, SGG-, Haferund M2-Nährmedium, B.5.3). Die Kulturfiltratextrakte aller Nährmedien waren gegen *S. aureus, B. subtilis* und *C. glabrata* aktiv. Außerdem besaß der Stamm ein interessantes Metabolitenspektrum.

Chemisches Screening

Die nachfolgenden Anzuchten führten leider immer zu unzureichenden Substanzmengen. Zum Beispiel lieferte die zweite Anzucht in Nährmedium M2 einen Zellextrakt (3-018-6-M) mit eindrucksvollen zytotoxischen Ergebnissen (Bewertung 3). Um die Zytotoxizität in dem Extrakt auf einen Stoff zurückführen zu können, erfolgte eine Kultivierung (5 L) in Schüttelkulturen (50 × 250 mL Erlenmeyerkolben, befüllt mit je 100 mL M2-Nährmedium), bei 50 °C und 180 rpm. Die Fermentation dauerte 96 h und endete mit einem pH-Wert von 8.3. Die Kulturbrühe versetzte man mit Celite, der pH-Wert wurde mittels 1 M HCl auf 5.6 eingestellt. Die Zellen wurden von dem Kulturfiltrat mittels Zentrifugieren abgetrennt (4500 U/min, 20 min), der Überstand wurde auf Amberlite®-XAD-2-Adsorberharz gegeben. Das Adsorberharz wurde mit 2 L Wasser gewaschen, die adsorbierten Substanzen anschließend mit 2 L Methanol eluiert. Der Extrakt wurde im Vakuum eingeengt und der wässrige Rückstand gefriergetrocknet. Die Zellen wurden mit Aceton/Methanol 1:1 im Ultraschallbad aufgeschlossen. Die trockenen Extrakte des Kulturfiltrats und der Zellen wurden $2 \, \mathrm{mL}$ Methanol aufgelöst, der Extrakt 3-018-11K (3.7 g)Sephadex-LH-20-Säulenmaterial gebracht, und es wurden sieben Fraktionen erhalten. Die Fraktionen wurden der chemischen und biologischen Profilierung untergezogen. Das Extrakt 3-018-11-K1 (221.0 mg) zeigte signifikante biologische Aktivität gegen M. luteus (HH Ø 15 mm) und hohe Zytotoxizität (Bewertung 3) (Tabelle 3). Alle daraus stammenden Fraktionen zeigten bemerkenswerte zytotoxische Eigenschaften: 3-018-11-K2 (968.6 mg, Bewertung 2), 3-018-K3 (234.1 mg, Bewertung 1), 3-018-11-K4 (124.7 mg, Bewertung 1), 3-018-11-K5 (51.7 mg, Bewertung 1), 3-018-11-K6 (121.7 mg, Bewertung 2), 3-018-11-K7 (75.4 mg, Bewertung 2). Man entschied sich dennoch für die Fraktion 3-018-11-K4 aufgrund des interssantesten Metaboltitenspektrums.

Aus dem dünnschichtchromatographischen Screening der Fraktion 3-018-11-K4 waren zwei Metaboliten besonders auffällig; eine mit Anisaldehyd braun-färbende Zone (8.6 mg) (R_f -Wert = 0.12, (Kieselgel® 60, CM 9:1, R_f -Wert = 0.12, 366 nm aktiv) sowie ein mit Anisaldehyd färbender graugrüner Bereich (14.6 mg) (Kieselgel® 60, CM 9:1, R_f -Wert = 0.10, 254 nm- und 366 nm-löschend). Die Probe 3-018-11-K4 (589.3 mg) wurde im Folgenden auf das Kieselgel® 60-Säulenmaterial gebracht (CM 9:1, 2.5×25.0 cm) (Abbildung 21). Die Fraktionen löste man in HPLC-Methanol und stellte eine Konzentration von 5 mg/mL für die anschließende massenspektrometrische Analyse (HPLC-MS-DAD, vgl. Kap. B.5.2.I.A.1.a) ein. Diese lenkte die Aufmerksamkeit auf das Molekül-Ion mit der Massengröße von m/z = 1092 ($[M+H]^+$, $R_t = 3.6$ min, positive Ionen) in der Fraktion 3-018-11-K4-4 (Abbildung 21).

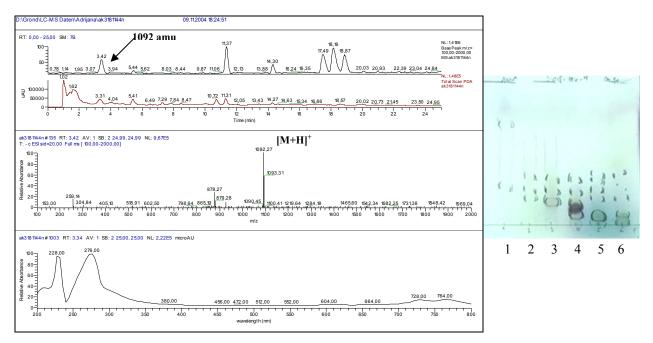


Abbildung 21: HPLC-MS-DAD-Analyse des Extraktes 3-018-11-K4-4 (*total scan*, $R_t = 3.6 \text{ min}$) mit dazugehörigen DC (CM 9:1, Anisaldehyd).

Die Vermutung bei einer Masse in dieser Größenordnung lag bei einem peptidischen Wirkstoff. Daher wurde die Probe mit möglicher peptidischer Anreicherung zunächst semipräparativ mittels HPLC aufgereinigt (HPLC 1, Säule 7, Programm 5, vgl. Kap. B.5.2.III.A.1.c) (Abbildung 22). Beide Hauptkomponenten wurden einer erneuten HPLC-MS-DAD-Untersuchung unterzogen; Substanz 1 (3.8 mg) und Substanz 2 (11.8 mg).

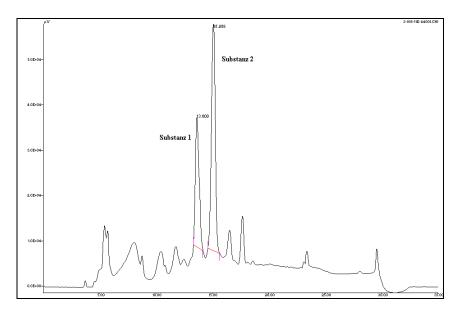


Abbildung 22: HPLC-HPLC-MS-DAD-Analyse der Fraktion 3-018-11-K4-4 mit dem Ziel der Isolierung der zytotoxischen Komponente (λ = 232 nm, Rt = 13.5 min und R_t= 15.1 min).

Die ¹H-NMR-Spektren waren nicht von zufriedenstellendem Reinheitsgrad. Die weitere Auftrennung der Substanzen durch HPLC führte nicht zu einer Verbesserung. Es ist anhand des dargestellten Chromatogrammes von Substanz 2 leicht zu erkennen, dass sich in einem Peak entweder zu viele Substanzen verbargen oder dass sich die Substanz durch weitere Auftrennung zersetzt hat (Abbildung 23).

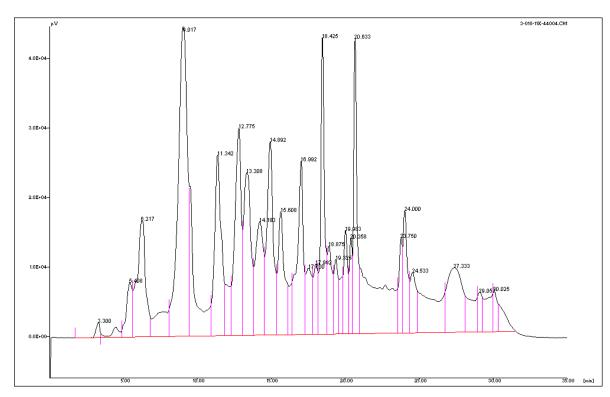


Abbildung 23: HPLC-Trennung der Substanz 2 aus der Fraktion 3-018-11-K4-4 ($\lambda = 232 \text{ nm}$).

Mittels Test auf die Zytotoxizität wurde die wirksame Komponente in der Fraktion Nr. 3, 3-018-11-K4-3 (13.4 mg) aufgespürt (Bewertung 1). Die Trennung dieser Fraktion erfolgte semipräparativ (HPLC 1, Säule 7, Programm 5, B.5.2.III.A.1.c) (Abbildung 24).

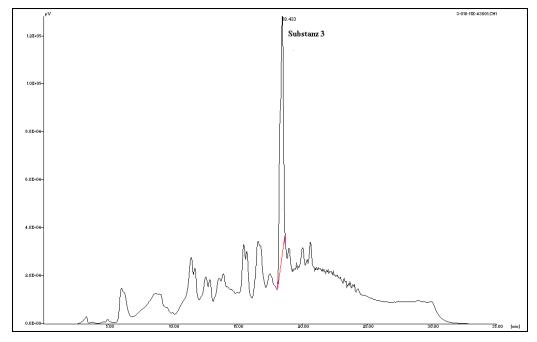


Abbildung 24: Die semipräparative Trennung der Fraktion 3-018-11-K4-3 ($\lambda = 232$ nm, $R_t = 8.4$ min).

Es wurde festgestellt, dass allzu viele nicht voneinander trennbare Verbindungen in dieser Fraktion enthalten waren. Die LC-Massenanalyse der Substanz 3 aus der Fraktion 3-018-11-K4-3 (13.4 mg) ergab folgende Befunde (HPLC-MS-DAD, B.5.2.I.A.1.a): ein dominierendes Molekül-Ion m/z = 320 ([M-H]⁻, $R_t = 10.9$ min) (Abbildung 25).

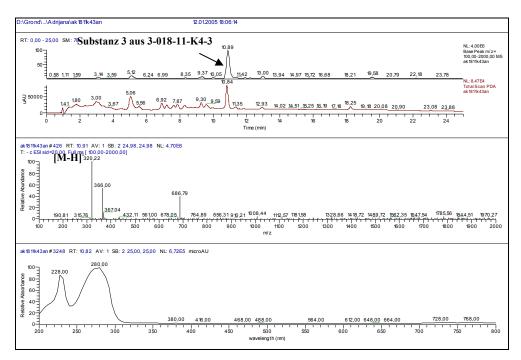


Abbildung 25: HPLCS-MS-DAD-Unteruchung der Substanz aus der Fraktion 3-018-11-K4-3 (*total scan*, $R_t = 10.9$).

Stand der Bearbeitung

Aus den ¹H-NMR-Spektren konnte man nicht auf die Wirksubstanzen zurückschließen, da 13.4 mg mehrere Substanzen enthielt.

Die beschriebenen Stämme wurden hauptsächlich wegen ihrer biologischen Aktivität untersucht. Es wurde versucht, die verantwortlichen chemischen Verbindungen durch aktivitätsgeleitete Isolierungsstrategie aufzureinigen. Es wurde eine intensive, stark parallele Kultivierung möglichst vieler in der Sammlung existierender, extremophiler Mikroorganismen durchgeführt.

Im Rahmen dieser Phase des Projektes wurde der hohe Anteil mikrobieller Aktivitäten durch hergestellte Testverfahren gegen verschiedene Indikatororganismen erfolgreich bestätigt. Die ersten in diesem Abschnitt vorgestellten fünf priorisierten Stämme haben sich in biologischen Testsystemen in mehreren aufeinander folgenden Kultivierungsansätzen als wirksame Produzenten erwiesen. Häufig konnten die Stoffe trotz großer Fermentationsansätze (5 L, 10 L, 13 L, 20 L, s. Tabelle 3) nicht isoliert werden, da sie entweder in zu kleinen Mengen

oder sie besonders produziert wurden einen schwierigen chromatographischen Trennungsgang erforderten. So gelang es für die Stämme 0-024 und 3-018, die gesuchten Verbindungen chromatographisch aufzuspüren, diese wiederum wurden in sehr kleinen Mengen erhalten (bei 0-024 waren es 0.2 mg). Zum Teil waren trotz sauberen HPLC-DAD-Chromatogramm im ¹H-NMR-Spektrum eine Mischung zwei voneinander nicht trennbarer Komponenten zu erkennen (3-018-11-K4-3 und 3-018-11-K4-4). Die erhaltene Substanzmenge reichte oft nur für eine HPLC-MS-DAD-Untersuchung (0-047-3-XM5), jedoch nicht für abschließende Strukturaufklärung. Durch die Optimierung eines schwierigen Trennungsganges gingen die Substanzen verloren (1-004-2-XA1) oder waren überhaupt nicht voneinander trennbar (0-029-1-M3). Jeder Extrakt erforderte eine auf sich abgestimmte Isolierungsstrategie. Durch die hier geleisteten Optimierungsarbeiten könnte man in nachfolgenden Anzuchten effizienter zu den gesuchten Strukturen gelangen. Dies jedoch wird nur in Verbindung mit besseren Produktionsraten extremophiler Mikroorganismen zu gewährleisten sein.

Einige der potentiellen Kandidaten waren chemisch-analytisch auffällig, besaßen aber keine signifikante biologische Wirkung: 1-019 (*Cryobacterum psychrophilum*), 1-020 (*Salinibacter ruber*), 3-011 (*Thermoactinomyces vulgaris*) und 3-016 (*Thermoactinomyces vulgaris*). Diese Stämme wurden nicht weiter bearbeitet. Die Stämme, die während der Pilotphase Bioaktivitäten gezeigt hatten, aber sich diese Aktivität in einer zweiten Anzucht nicht reproduzieren ließ, wurden auch aus der weiteren Bearbeitung genommen: 0-049 (*Haloterrigena thermotolerans*), 1-014 (*Isolat50Quora*) und 2-004 (*Streptomyces* sp.).

2.4.2 Ausgewählte Stämme und Charakterisierung von Metaboliten

Bisher wurden die priorisierten Stämme vorgestellt, die sich im biologischen Screening durch ihre beachtliche zytotoxische und mikrobiologische Wirksamkeit ausgezeichnet hatten. Ihre Bearbeitung führte jedoch nicht zu der erwünschten Strukturcharakterisierung. Deswegen wurde das Projekt durch die Beurteilung der chemischen Vielfalt von den Stämmen 3-001, 3-002 und 3-015 erweitert. Das Ziel war, die chemisch interessanten Metabolite aus den Mikroorganismen zu gewinnen, die erst später im biologischen Test eine interessante Wirkung zeigen könnten. Diese Stämme wurden ebenfalls zunächst in einer ersten Stammanzucht (Primärscreening), einer zweiten Anzucht (Reproduktion) und dann im Großmaßstab (*Up-scale*) kultiviert. Die Großfermenter (10-50 L) sollten ausreichend Ausgangsmaterial für die Reinsubstanzdarstellung bzw. Strukturaufklärung sicherstellen. In

diesem Abschnitt werden die Mikroorganismen beschrieben, deren chemische Diversität als besonders interessant eingestuft worden war, die auch interessante biologische Eigenschaften zeigten und für die einige Metabolite chemisch charakterisiert und in ihrer Struktur aufgeklärt wurden. Trotz veränderter Fermentationsparameter (Schüttelkolben im Screening, Fermentation im *Up-scale*) blieb die Metabolitenmuster bei allen diesen Stämmen erfreulicherweise unverändert.

2.4.2.1 *Stamm 3-001* (Streptomyces sp.)

Biologische Aktivität

Im Primärscreening fiel der Extrakt 3-001-2-K (SGG-Nährmedium, Kulturextrakt der vereinigten Überständen, s. Vorlage) durch die biologische Aktivität gegen *B. subtilis* (Hemmhofdurchmesser (HH Ø) 14 mm), *S. johnsonii* (HH Ø 18 mm) und *Halobacterium* sp. (HH Ø 25 mm) auf (s. aktivitätsbasierte Extraktscreening A.2.3.1).

Isolierung und Charakterisierung

In dem *Up-scale* (10 L, SGG-Nährmedium) fiel der Extrakt 3-001-5 dünnschichtchromatographisch (DC) durch eine polare, mit Anisaldehyd violett-anfärbende Substanz im Zellextrakt (M) und durch mit Anisaldehyd grün und rot anfärbende Substanzen im Kulturfiltratextrakt (XM) (vgl. Kap. B.5.4.2.1.) auf. Im biologischen Screening zeigte der Extrakt 3-001-5-K außerdem leichte Zytotoxizität (Bewertung 1), die gute Aktivität gegen *S. johnsonii* (HH Ø 18 mm)

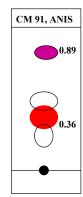


Abbildung 26: Skizze des Dünnschichtchromatogrammes des 3-001 Extraktes

und S. aureus (HH Ø 24 mm) wurde bestätigt. Die mit Anisaldehyd rot-anfärbende Substanz wurde isoliert. In den biologischen Tests zeichnete sie sich durch die Aktivität gegen S. aureus (HH Ø 20 mm) und S. johnsonii (HH Ø 16 mm) aus. Allerdings erfolgte aufgrund der zu geringen Substanzmenge keine Strukturaufklärung. Mit dem Ziel, die Substanz als Träger der biologischen Aktivität aufzuklären, wurde die nachfolgende Kultivierung 3-001-6 in den 10 L-SGG-Nährmedium durchgeführt. Für die Kultivierung wurde Airlift-Fermentationsanlage (15 L-Fermenter) genutzt (vgl. Kap. B.5.4.2.3), bei der eine ausreichende Sauerstoffzufuhr für die wachsende Kultur gewährleistet werden konnte (1 vvm). Die Fermentation erfolgte bei 50 °C und 200 rpm über 96 h bei einem pH-Wert von 7.8 (vgl. Kap. B.5.4.2.5.II). Den pH-Wert der Kulturbrühe stellte man mit 1 M HCl auf 5.6 und versetzte mit Celite. Das Kulturfiltrat wurde von den Zellen durch Zentrifugieren abgetrennt (4500 U/min, 20 min) und mit Essigester (15 L) extrahiert. Das Lösungsmittel wurde dem Extrakt unter verminderten Druck entzogen (20 mbar) und der Rückstand lyophilisiert. Die Zellen wurden mit Aceton/Methanol 1:1 im Ultraschallbad aufgeschlossen, der Überstand filtriert und im Vakuum (20 mbar) bis zur Trockne eingeengt. Die antibakterielle Aktivität gegen *S. johnsonii* (HH \varnothing 12 mm) wurde im Kulturfiltrat 3-001-6-K (6.9 g) gefunden, so dass dieses zuerst chromatographisch aufgereinigt wurde. Die Überprüfung mittels DC lenkte die Aufmerksamkeit für die Fraktion 3-011-6-K5 (189.8 mg) auf eine besonders auffällige, mit Anisaldehyd rot anfärbende Substanz (Kieselgel[®] 60, Chloroform/Methanol (CM) 9:1, R_f -Wert = 0.36, 254 nm aktiv) (Abbildung 26). Für die Isolierung dieses roten Stoffes wurden 189.9 mg der Fraktion chromatographisch aufgereinigt (Kieselgel[®] 60, CM 95:5, 2.0 × 30.0 cm). Es wurden 5.8 mg Fraktion 3-001-6-K5-8 eines gelben Öls erhalten (vgl. Kap. B.5.4.3, Aufarbeitungsschema 3). Die Fraktion wurde mittels HPLC-MS-DAD untersucht (vgl. Kap. B.5.2.A.1.a). Bei einer Retentionszeit (R_t) von 7.9 min ist die Masse m/z = 203.96 ([M+H]⁺) für die gesuchte Substanz aufgetreten, das weißt auf die Substanz N^b -Acetyltryptamin (24) ($C_{12}H_{14}N_2O_{2}$ 202.26 g/mol) hin.

Der Vergleich der erhaltenen ESI-MS-Werten mit denen der "AntiBase"-Datenbank² lieferte ein übereinstimmendes Ergebnis mit bereits bekannten Tryptaminen.

Die charakteristischen Signale der aromatischen Protonen liegen im Tieffeld als zwei Dubletts bei $\delta_H = 7.38$ ppm (7-H) und

N H

<u>24</u>

 δ_H = 7.57 ppm für (4-H) sowie als zwei Dubletts von Dublett bei δ_H = 6.94 (5-H) und δ_H = 7.08 ppm (6-H). Das Proton der Methingruppe 2-H ist dem Signal bei δ_H = 7.08 ppm zuzuordnen. Die Protonen der Seitenkette liegen als Dublett von Dublett bei δ_H = 2.92 ppm (8-H_a) und bei δ_H = 3.46 ppm (8-H_b). Das Proton der Methylengruppe ist dem Signal bei δ_H = 3.28 ppm (9-H) zuzuordnen.

Außerdem wurde aus Fraktion 3-001-6-K5-6 eine rotbraune, ölige Substanz, die mit Anisaldehyd schwach gelb anfärbend war (Kieselgel[®] 60, CM 9:1, R_f-Wert = 0.63; Kieselgel[®] RP-18, Methanol/Wasser (MW) 7:3, R_f-Wert = 0.59) in einer Ausbeute von 5.0 mg mittels Mitteldruckflüssigkeitschromatographie isoliert (Lobar[®] Kieselgel-RP-18, Aceton/Wasser (AW) 4:1, 1.0×30.0 cm). Das EI- bzw. ESI-Massenspektrum ergab ein unspezifisches Fragmentierungsmuster. Eine hochauflösende MS-DCI-Analyse konnte kein eindeutiges Ergebnis liefern. Das 1 H-NMR-Spektrum zeigt das Vorliegen von fünf aromatischen Protonen zwischen $\delta_H = 7.11$ ppm und $\delta_H = 7.40$ ppm, die zu einer

Phenylgruppe gehören. Ebenso finden sich zwei ins Tieffeld verschobene Methylengruppen $(\delta_{\rm H} = 0.92 \text{ ppm sowie } \delta_{\rm H} = 1.06 \text{ ppm})$, die auf eine Isopropylgruppe deuten. Drei Heteroatomtragende Kohlenstoffatome sind auf Grund ihrer chemischen Verschiebung im 13C-NMR-Spektrum gut erkennbar ($\delta_C = 57.6$ ppm; $\delta_C = 60.0$ ppm; $\delta_C = 61.5$ ppm). Die Signale carbonylischer Kohlenstoffe sind bei einer chemischen Verschiebung von $\delta_C = 166.8$ ppm, $\delta_{\rm C} = 167.5$ ppm, $\delta_{\rm C} = 170.53 \text{ ppm}$ und $\delta_{\rm C} = 172.6 \text{ ppm}$ zu entnehmen. Das HMQC-1J_(C,H)-Experiment weist auf sieben Methylengruppen auf. Die ¹H, ¹H-COSY- $HMBC^{-2,3}J_{(C,H)}$ -Korrelation Korrelation und lassen aufgrund der vorhandenen Konnektivitäten auf folgende Molekülfragmente zurückschließen (Abbildung 27):

Abbildung 27: Aus HMQC- $^{1}J_{(C,H)}$ - und ^{1}H , ^{1}H -COSY-Experimenten erhaltene Strukturfragmente, die über HMBC- $^{2,3}J_{(C,H)}$ -Korrelationen zusammengesetzt wurden.

Die Kohlenstoffatome der Stukturfragmente $\underline{25}$ und $\underline{26}$ weisen im HMBC-^{2,3} $J_{(C,H)}$ -Spektrum sehr schwache Kopplungen zu dem Proton bei $\delta_H = 3.35$ ppm auf. Die chemische Verschiebung der Heteroatom-tragenden Kohlenstoffatome würde sehr gut einer Aminogruppe-substituierten Methingruppe entsprechen. Die Molekülfragmente $\underline{27}$ und $\underline{29}$ ähneln in ihrer Struktur den Aminosäuren Phenylalanin (Phe) und Valin (Val). Das Fragment $\underline{28}$ wurde zu der Aminosäure Lysin (Lys) passen, jedoch ist es sehr ungewöhnlich, dass die beiden Kohlenstoffatome bei $\delta_C = 45.9$ ppm und $\delta_C = 46.1$ ppm bezüglich 1 H, 1 H-COSY- und HMBC-^{2,3} $J_{(C,H)}$ -Experimenten unmittelbar miteinander verbunden sind. Wäre das Kohlenstoffatom bei $\delta_C = 45.9$ ppm an einen peptidischen Stickstoffatom gebunden, hätte

man erwartet, dass die chemische Verschiebung des nähsten Kohlenstoffatoms bei etwa $\delta_C = 30.0$ ppm aufzufinden ist. Das Kohlenstoffatom bei $\delta_C = 45.9$ ppm koppelt im HMBC-^{2,3} $J_{(C,H)}$ -Spektrum nur mit dem Kohlenstoffatom bei $\delta_C = 46.1$ ppm. Anhand der ausgewerteten Daten kann man folgende Verknüpfung der Molekülfragmente vorschlagen (Abbildung 28):

Abbildung 28: Mögliche Verknüpfung der Molekülfragmente <u>27</u> und <u>28</u> als Dipeptid Phe-Lys sowie Valin als endstehender Aminosäure.

Eine Alternative für die Problematik der Verknüpfung beider Kohlenstoffatome bei $\delta_C = 45.9$ ppm und $\delta_C = 46.1$ ppm würde folgende Zusammenstellung der Molekülfragmente ergeben (Abbildung 29):

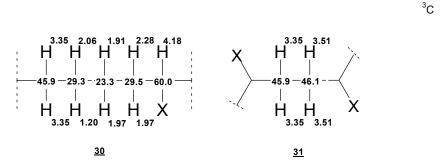


Abbildung 29: Alternative Verknüpfungsmöglichkeit der Molekülfragmenten.

Das Molekülfragment <u>31</u> wurde hiermit zur Glutaminsäure (Glu) oder zu einem Verknüpfungsfragment zwischen beiden peptidischen Einheiten und würde damit folgende Strukturvorschläge in Betracht ziehen (Abbildung 30):

$$\begin{array}{c} O \\ O \\ O \\ NH_2 \end{array}$$

$$\begin{array}{c} O \\ NH_2 \\ O \\ NH_2 \end{array}$$

$$\begin{array}{c} O \\ CH_3 \\ CH_3 \end{array}$$

$$\begin{array}{c} O \\ CH_3 \\ CH_3 \end{array}$$

Abbildung 30: Weitere Strukturvorschläge für die Verknüpfung der Molekülfragmente.

Den vorgeschlagenen Molekülstrukturen würde allerdings das fehlende carbonylische Kohlenstoffatomsignal im 13 C-NMR-Spektrum bei δ_C = 170.0 ppm oder das fehlende Signal für weiteren Heteroatom-substituierten Kohlenstoffatom bei etwa δ_C = 60.0 ppm entgegensprechen. Zur Verdeutlichung wurde in der Abbildung 31 das 1 H-NMR-Spektrum abgebildet.

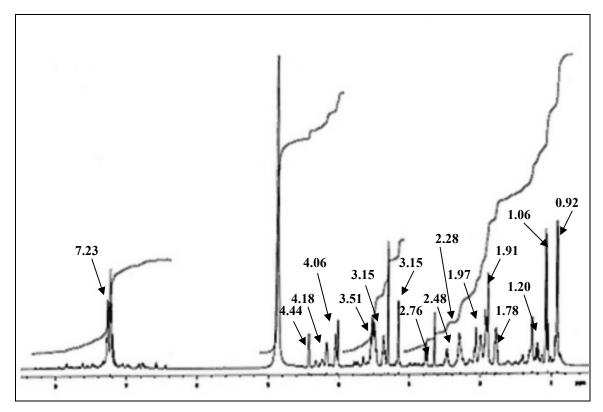


Abbildung 31: Das 1 H-NMR-Spektrum (600 MHz) der Substanz aus Fraktion 3-001-6-K5-6 in Methanol- d_4 (die Protonensignale sind im [ppm] angegeben).

Besonderes Interesse galt der in den Fraktionen 3-001-6-K2 (180.5 mg), 3-001-6-K3 (2.4 g), 3-001-6-K4 (1.2 mg) und 3-001-6-K5 (189.8 mg) mehrfach aufgetretenen, unpolaren, mit Anisaldehyd anfärbenden purpur-rosa Zone (Kieselgel[®] 60; CM 9:1; R_f -Wert 0.89; Kieselgel-RP-18; MW 7:3; R_f -Wert = 0.62).

In der HPLC-MS-DAD Analyse zeigte sich in der aufgereinigten Fraktion 3-001-6-K5-21 (0.2 mg aus 5.1 mg, Lobar[®] Kieselgel-RP-18, MW 7:3, 1.0×30.0 cm) die folgende Masse: $m/z = 391.20 ([M+H]^+)$ mit dazugehörigen Ionen $m/z = 390.13 ([M-H]^-)$, $781.00 ([2M-H]^-)$, $414.11 ([M+Na]^+)$ und $782.84 ([2M+1]^+) (M = 391 g/mol)$ (Abbildung 32).

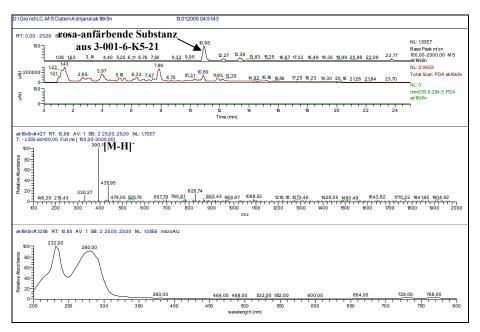


Abbildung 32: HPLC-MS-DAD-Analyse der interessanten, mit Anisaldehyd rosa-anfärbenden Substanz aus 3-001-6-K5-21 (λ = 254 nm, R_t = 10.9 min).

Leider waren die Komponenten in zu komplexe Metabolitenmuster eingebunden, die Verbindungen waren, so wie offensichtlich auch die gesuchte, mit Anisaldehyd rosa-anfärbende Substanz, nur im Spuren erhalten. Nach erneuter chromatographischer Reinigung war entweder der Reinheitsgrad für eine spektroskopische Untersuchung noch nicht zufriedenstellend, oder die Ausbeuten waren für eine chemische Charakterisierung nicht ausreichend. Die Suche in der Datenbank nach den interessierenden Molmassen um die 390 g/mol ergab als Vorschläge viele aktive Verbindungen aus *Streptomyces* sp., wie z.B. das Antibiotikum Tetraacetyl A 33853 32 (391 g/mol).

<u>32</u>

Stand der Bearbeitung:

Die für die biologische Aktivität verantwortliche Komponente in dem Extrakt 3-001-6-K5-6 wurde aufgespürt und hinsichtlich der Struktur als Acetyltryptamin zugeordnet. Die Struktur **24** des weiteren Metaboliten aus dem Extrakt 3-001-6-K5-8 wurde vorgeschlagen. Für die Reinisolierung der mit Anisaldehyd rosa-anfärbenden Substanz in 3-001-6-K5-21 bedarf es einer weiteren Kultivierung.

2.4.2.2 *Stamm 3-002* (*Streptomyces* sp).

Biologische Aktivität

Das Primärscreening des Stammes 3-002 zeigte biologische Aktivitäten in den Extrakten 3-002-1-M (SM-Nährmedium, Methanolextrakt der Zellen, s. Vorlage) gegen *Halobacterium* sp. (HH Ø 16 mm), 3-002-1-K (SM-Nährmedium, s. Vorlage) gegen *B. subtilis* (HH Ø 14 mm), 3-002-2-K (SGG-Nährmedium) gegen *S. johnsonii* (HH Ø 22 mm), *C. glabrata* (HH Ø 22 mm) und *Halobacterium* sp. (HH Ø 30 mm), 3-002-3-K (Hafer-Nährmedium) gegen *B. subtilis* (HH Ø 16 mm) und in dem M2-Nährmedium 3-002-4-K gegen *S. johnsonii* (HH Ø 16 mm). Außerdem zeichnete sich der Extrakt 3-002-3 (Hafer-Nährmedium) durch seine erstaunlich gute Zytotoxizität (Bewertung 3) aus. Es wurde dennoch entschieden, die nachfolgende Kultivierung in dem SGG-Nährmedium zu starten, da sich die antimikrobielle Wirksamkeit gegen mehrere Indikatororganismen und die Zytotoxizität beobachtet wurde (Bewertung 1).

Isolierung und Charakterisieurng

Auch die chemische Profilierung des Extraktes 3-002-2 war nicht uninteressant: eine breite Palette von mit Anisaldehyd detektierbaren violetten, grünen, roten und gelben Zonen wies auf eine hohe chemische Strukturdiversität hin (vgl. Kap. B.5.4.2.1). Die zweite Anzucht

(Reproduktion) in den Schüttelkulturen wurde gleich im Großmaßstab durchgeführt (10 L. SGG-Nährmedium), es sollte vor allem die biologische Aktivität aufgeklärt werden. Den Aktivitätsergebnissen zu folge sind die Fraktionen 3-002-5-K1 (HH Ø 20 mm), 3-002-5-K2 (HH Ø 21 mm), 3-002-5-K3 (HH Ø 26 mm), 3-002-5K4 (HH Ø 28 mm) und 3-002-5-K5 (HH Ø 22 mm) gegen *Halobacterium* sp. aktiv gewesen, die Fraktion 3-002-5-K1 erwies erneut eine starke Zytotoxizität (Bewertung 3) auf. Die nachfolgende Scale up-Kultivierung erfolgte im SGG-Nährmedium (12 L), bei 50 °C, 180 rpm, die Wachstumsphase wurde nach 96 h beim pH-Wert von 7.7 abgeschlossen (B.5.4.2.2). Die Aufarbeitung der Kulturbrühe wurde nach der etablierten Standardmethode durchgeführt (vgl. Kap. B.5.4.2.5.I), das Rohproduktextrakt 3-002-6-K (16.1 g) wurde mittels Sephadex LH-20 aufgetrennt (Methanol, 2.0 x 150.0 cm) (B.5.4.3, Aufarbeitungsschema 4). Nachdem die biologische Untersuchung der Fraktionen mit vergleichbaren Ergebnissen von Fermentation 3-002-5 abgeschlossen wurde, wurden die Ergebnisse der HPLC-MS-DAD-Analyse zusätzlich herangezogen, um sich hauptsächlich auf die geeignete Fraktion konzentrieren zu können, in der sich die biologische Aktivität befindet (vgl. Kap. B.5.2.A.1.a). Die zwei mit Anisaldehyd gelbfärbenden Substanzen waren in der Fraktion 3-002-6-K7 (176.6 mg) angereichert (Kieselgel® RP-18, MW 7:3, beide R_f-Werte = 0.91). Nach der säulenchromatographischen Trennung wurden die dazugehörigen Molekülmassen in der HPLC-MS-DAD (vgl. Kap. B.5.2.A.1.a) gefunden: bei einer Retentionszeit von 14.2 min m/z = 535.15 ([2M+H]⁺) (M = 267 g/mol) und bei $R_t = 16.6 \text{ min für m/z} = 266.05 \text{ amu } ([M+Na]^+) (M = 243.16 \text{ g/mol}).$ Die ESI-MS Analyse der ersten chromatographisch aufgereinigten Fraktion 3-002-6-K7-4 bestätigte die Annahme, dass es sich um eine Masse von 267 g/mol handelte (vgl. Kap. B.5.4.2, Aufarbeitungsschema 4) (m/z = 268 $[M+H]^+$). Die Verbindung wurde als blassgelbes Öl erhalten (1.0 mg, Kieselgel[®] 60, CM 8:2, 1.5×30.0 cm). Im Protonenspektrum erschienen zwei für eine Pentose charakteristischen Signale von sauerstoffsubstituierten Methingruppen

als Dubletts bei $\delta_H = 4.14$ ppm (3'-H) und $\delta_H = 4.31$ ppm (2'-H). Zwei Protonen bei $\delta_H = 3.63$ ppm (5'-H_a) und $\delta_H = 3.71$ ppm (5'-H_b) wurden der Methylengruppe zugeordnet. Das mit der Methylengruppe koppelnde Proton wurde dem Aufspaltungsmuster bei $\delta_H = 3.85$ ppm zugeordnet (4'-H). Das anomere Wasserstoffatom erschien als Dublett bei $\delta_H = 6.02$ ppm (1'-H). Die zwei

Singulettsignale bei $\delta_H = 8.24$ ppm und $\delta_H = 8.48$ ppm deuteten auf die Anwesenheit eines Stickstoff-Heterozyklus hin. Durch den Vergleich der MS- und 1 H-NMR-Daten mit

Literaturwerten konnte der Substanz die Struktur des Adenosins (<u>33</u>) (C₁₀H₁₃N₅O₄, 267.25 g/mol) zugeordnet werden.⁶⁸

Adenosin (33) kommt nicht nur in den Polynukleotiden DNA und RNA vor, sondern bildet als freies Triphosphat (ATP) den universellen Energieüberträger der Zelle. Es ist außerdem Teil vieler wichtiger Coenzyme und auch einiger Antibiotika und Enzyme.⁶⁹

Die zweite Komponente aus dem Extrakt 3-002-6-K7-5 wurde als gelbes Öl in einer Ausbeute von 1.2 mg isoliert (vgl. Kap. B.5.4.2, Aufarbeitungsschema 4). In den spektroskopischen Daten zeigte sie ein dem Adenosin (<u>33</u>) sehr ähnliches ¹H-NMR-Signalmuster. Die Protonen

des Zucker-Kohlenstoffgerüstes waren bei $\delta_{\rm H} = 4.28$ ppm (3'-H) und $\delta_{\rm H} = 4.59$ ppm (2'-H) und bei $\delta_{\rm H} = 3.73$ ppm (5'-H_a) und $\delta_{\rm H} = 3.84$ (5'-H_b) zu finden. 5'-H_a und 5'-H_b koppelten als Dublett von Dublett mit dem Proton 4'-H bei $\delta_{\rm H} = 4.17$ ppm. Das Signal des anomeren Wasserstoffatoms 1'-H zeigte eine chemische Verschiebung bei $\delta_{\rm H} = 5.92$ ppm (J = 6.0 Hz). Desweiteren erschienen die Dubletts zweier Protonen in den aromatischen Bereich der chemischen Verschiebung bei $\delta_{\rm H} = 7.08$ ppm (4-H) und

 δ_H = 7.14 (5-H) ppm. Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen und massenspektrometrischen Daten von ESI-MS (m/z = 266 [M+Na]⁺) mit den Literaturwerten legten die Strukturbestimmung von Cytidin (<u>34</u>) (1.2 mg) (C₉H₁₃N₃O₄, 243.22 g/mol) nahe.

Nucleoside sind allgemein bekannt als klassische Antitumor-Arzneimittel und antivirale Pharmazeutika. Sie sind wichtige Leitverbindungen, da viele Arzneistoffe ähnliche Strukturmerkmale besitzen (z.B. Pentostatin (35) und Nebularin (36))(Abbildung 33).^{70,71}

Abbildung 33: Antitumor-Arzneimittel Pentostatin (<u>35</u>) und Nebularin (<u>36</u>).

Der therapeutische Einsatz von <u>35</u> und <u>36</u> ist durch ihre geringe Selektivität und relative hohe Toxizität eingeschränkt. Dennoch besitzen die synthetischen Analoga wie das patentgeschützte Acyclovir (<u>37</u>) (9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanin, Zovirax®) eine umfassende Aktivität gegen Thymidylat-Kinase von HIV und gegen Herpes Simplex Virus Typ 1 und 2 (Abbildung 34).⁷²

$$H_2N$$
 N
 N
 N
 N
 O
 O
 O
 O
 O
 O
 O

Abbildung 34: Die Struktur des Acyclovirs (37).

Durch die Purineinheit und 2-Hydroxyethoxy-Methyl-Gruppe, die wahrscheinlich die natürlich vorkommende Pentoseeinheit ersetzt, ähnelt das Acyclovir⁷³ in seinen Struktureigenschaften dem 2'-Desoxyguanosin. Seine Wirkung geht zurück auf Inhibition der menschlichen Purin Nukleosid-Phosphorylase (PNP), die verantwortlich für den Abbau von Deoxyguanosin ist. Genetische Mangelfunktion dieses Enzyms führt zur schwerwiegenden immunosuppressiven Effekten der T-Zellen im Blut und damit zu autoimmunen Störfunktionen, die Krankheiten wie rheumatoide Arthritis, Psoriasis, chronisch-entzündliche Darmerkrankung (IBD) und multiple Sklerose verursachen.

Unphysiologische Purin- oder Pyrimidinbasen werden in der Tumortherapie als Inhibitoren eingesetzt, wobei ihre Wirkung auf der Hemmung der DNA- und RNA-abhängigen Polymerase als auch auf der Vermittlung falscher Informationen durch den direkten Einbau in die DNA beruht.⁷⁴

In der nachfolgenden Kultivierung 3-002-7 des Stammes wurden zwei weitere Verbindungen isoliert. Die Kultivierung erfolgte im SGG-Medium in einem 5 L-Ansatz in 250 mL Erlenmeyerkolben mit 150 mL Kulturlösung auf dem Rundschüttler bei 50 °C und 180 rpm (B.5.4.2.2). Die Ernte erfolgte nach 96 h, und die Aufarbeitung gemäß B.5.4.2.4. (Aufarbeitungsschema 5). Nachdem die Kulturbrühe auf pH-Wert 5.6 mit 1 m HCl gebracht wurde, wurde das von den Zellen abgetrennte Kulturfiltrat (zentrifugieren, 4500 U/min, 20 min) mit Essigester (10 L) extrahiert und im Vakuum eingeengt (20 mbar). Besonders interessant erschien die Fraktion 3-002-7-K6 (173.5 mg), die auch ein breites

Substanzspektrum bewies. In der HPLC-MS-DAD-Untersuchung (vgl. Kap. B.5.2.A.1.a) erschien die Verbindung mit der Masse $m/z = 323.11~([2M+H]^+)$ und $321.26~([2M-H]^-)$ bei $R_t = 15.6~min~(M = 161~g/mol)$ besonders stark in der Fraktion angereichert zu sein. Das Anfärbeverhalten des isolierten weißen Feststoffes (Kieselgel®60, CM 8:2, $0.5 \times 30.0~cm$,

2.4~mg) war intensiv gelb (Kieselgel®RP-18, MW 7:3, $R_f = 0.58$, Färbung ohne Anfärbereagenz). Die EI-MS ergab ein Molekül-Ionen-Muster mit zwei charakteristischen Signalen bei $m/z = 161.1~([M]^+)$, $144.1~([M-OH]^-)$ und $117~([M-CO_2]^+)$. Bei der chemischen Charakterisierung ließ das ungerade Molekulargewicht mindestens ein Stickstoffatom pro Molekül vermuten. Im 1 H-NMR-Spektrum trat das charakteristische Muster eines

ABCD-Systems eines 1,2-disubstituierten Phenylringes auf. Die chemische Verschiebung des Singuletts bei δ_H = 8.27 ppm (2-H) war ein Hinweis darauf, dass ein Heteroaromat vorliegt. Die chemische Verschiebung der Protonensignale bei δ_H = 7.21 ppm, 7.46 ppm und 8.20 ppm deuteten auf die Methingruppen des Indol-Ringes. Im 13 C-NMR-Spektrum war die Resonanz einer Carboxylgruppe bei δ_C = 172.6 ppm erkennbar. Durch zusätzlichen Datenvergleich der Fragmentierungsmuster mit den Daten aus der Spektrensammlung "nist_62K" (massenspekrometrische Abteilung des Instituts), wurde die Struktur der 1*H*-Indol-3-carbonsäure (38) (C₉H₇NO₂, 161 g/mol) zugeordnet.

Zur eindeutigen Zuordnung weiterer Komponenten musste die Fraktion 3-002-7-K6-2 weiter aufgetrennt werden. Die mit Anisaldehyd rot-anfärbende Substanz (Kieselgel® RP-18, MW 7:3, $R_f=0.72$) in der Fraktion 3-002-7-K6-22 wurde zuerst chromatographisch aufgereinigt (semipräparative HPLC 1, Säule 9, Programm 3, vgl. Kap. B.5.2.III.A.3.a, Aufarbeitungsschema 5). Die wurde als farbloses Öl isoliert (1.6 mg). In dem HPLC-MS-DAD-Chromatogramm ergab sich das Ion bei $R_t=6.9$ min, das als 204.1 ([M-H]⁻) (M = 205 g/mol) identifiziert wurde. Die Signale im 1 H-NMR- und 13 C-NMR-Spektrum

konnten anhand der schon beschriebenen Daten von *1H*-Indol-3-carbonsäure (<u>38</u>) leicht zugeordnet werden. Das 13 C-NMR-Spektrum zeigte vier für das Indolgerüst typische Signale (δ_C = 111.8 ppm und δ_C = 121.9 ppm für C-4 bis C-7). Die anderen Kohlenstoffatome lagen bei δ_C = 128.2 ppm (C-7a) und δ_C = 137.9 ppm (C-2). Die restlichen Methingruppen des Indol-Ringes waren bei δ_C = 124.3 ppm (C-3a) und

<u>39</u>

112.6 ppm (C-3). Das Kohlenstoffatom bei $\delta_C = 74.8$ ppm entsprach in seiner chemischen Verschiebung einem Hydroxylgruppe-tragenden Kohlenstoffatom (C-9). Ein quartäres

Kohlenstoffatom, mit der chemischen Verschiebung von $\delta_C = 181.1$ ppm, konnte der Carbonsäure zugeordnet werden.

Die Datenbanksuche einer Substanz mit der Molekülmasse von 205 g/mol, elf Kohlenstoffatomen und den genannten Strukturelementen, führte in *AntiBase* zu der Struktur von der Indol-3-milchsäure (<u>39</u>) (C₁₁H₁₁NO₃, 205.22 g/mol).⁷⁵

Indol-3-milchsäure (<u>39</u>) wird z.B. aus Tryptophan über Indol-3-Pyruvat im Prozess der alkoholischen Gärung gebildet ("Ehrlich-Abbauweg"). ^{76,77}

2.4.2.3 Stamm 3-015 (unspezifiziertes Bakterium)

Biologische Aktivität

Die Extrakte des Stammes 3-015 fielen im ersten chemischbiologischen Screening sehr Zvtotoxizität durch gute (SGG-Nährmedium, Extrakt aus Kulturfiltrat und Zellpellet) (Bewertung 2 und 3) auf. Biologische Aktivität wurde in dem Extrakt 3-015-5-M des SGG-Nährmediums in dem zweiten Screening gegen die in Tab. 6 aufgeführten Testkeime festgestellt. Auch für die Fraktionen wurden erfreulich starke biologische Aktivitäten beobachtet: 3-015-5-K1 gegen S. johnsonii (HH \varnothing 20 mm), 3-015-5-K2 gegen S. aureus (HH \varnothing 14 mm), B. subtilis (HH \varnothing 16 mm) und Halobacterium sp. (HH \varnothing 16 mm)

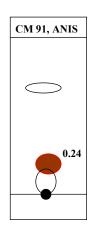


Abbildung 35: Skizze des Dünnschichtchromatogrammes des 3-015 Extraktes

und im methanolunlöslichen Rückstand (R) 3-015-5-R gegen *S. aureus* (HH \varnothing 16 mm), *B. subtillis* (HH \varnothing 22 mm), *S. johnsonii* (HH \varnothing 34 mm), *P. acnes* (HH \varnothing 30 mm) und *S. mutans* (HH \varnothing 22 mm). In dem SM-Nährmedium erwies der Zellextrakt 3-015-6-M inhibierende Wirkung gegen *M. smegmatis* (HH \varnothing 14 mm).

Isolierung und Charakterisierung

In dem Extrakt des Kulturfiltrats 3-015-7-K und dem Extrakt der Zellen 3-015-7-M aus SGG-Nährmedium fand man eine auffällig mit Anisaldehyd rot-anfärbende Zone (Kieselgel® 60, CM 9:1, R_f -Wert = 0.24), die auch spezifisch antimikrobiell gegen gram-positive Bakterien wirkte. Daher galt das primäre Interesse der chemischen Charakteristik dieser Komponente. Dazu wurde der Stamm 3-015 in einem 5 L-Fermenter kultiviert. Die Kultivierung wurde in Schüttelkulturen angesetzt (50 × 250 mL Erlenmeyerkolben, je mit 100 mL SGG-Nährmediums befüllt) bei 180 rpm, 50 °C und 96 h.

Das Kulturfiltrat wurde mittels 1 m HCl auf pH-Wert = 5.6 gebracht, mit Celite versetzt und durch Zentrifugieren von der Zellmasse abgetrennt (4500 U/min, 20 min). Das Kulturfiltrat trug man auf Amberlite® XAD-2-Adsorberharz auf und eluierte mit 4 L Methanol. Durch säulenchromatographische Aufreinigung des Kulturextraktes 3-015-10-K6 (278.5 mg) (Kieselgel[®] 60, CM 8:2, 2.0 × 30.0 cm) gewann man in der ersten Fraktion 3-015-10-K6-1 (3.3 mg) ein Gemisch, das die rot-anfärbende Verbindung enthielt (Abbildung 32). Die biologischen Tests bestätigten die Aktivität des Extraktes 3-015-10-K6-1 gegen S. johnsonii (HH Ø 14 mm). Durch zweifache chromatographische Aufreinigung dieser Fraktion (Kieselgel[®] 60, CM 8:1, 1.0×15.0 cm; Kieselgel[®] 60, von CM 9:1 zu CM 4:1, 1.0×15.0 cm) war der Reinheitsgrad nicht für weitere biologische Untersuchungen oder die Strukturaufklärung ausreichend (0.9 mg). Die nachfolgende Kultivierung 3-015-11 fand in der Airlift-Fermentationsanlage im SGG-Medium statt (10 L) (200 U/min, Sauerstoffzufuhr 1 vvm, 50 °C, 96 h) und endete mit einer pH-Wert von 7.9 (B.5.4.2.3). Die Kulturbrühe wurde wie bei 3-015-10 beschrieben aufarbeitet. Das Metabolitenmuster des Kulturfiltrats 3-015-11-K ähnelte sehr dem Metabolitenspektrum des Zellextrakts 3-015-11-M (vgl. Kap. B.5.4.2.5.I, Aufarbeitungsschema 6). Extrakt 3-015-11-K trug Sephadex-LH-20-Säulenmaterial auf und erhielt vier Fraktionen (Methanol, 2.0 × 150.0 cm). Die dritte Fraktion 3-015-11-K3 war sehr mit Anisaldehyd rot-anfärbenden Zone angereichert. Die HPLC-MS-DAD-Analyse des 3-015-11-K3 (223.9 mg) ergab einen

intensives Signal als ersten Hinweis für die Masse von $m/z = 203.0 \, ([M+H]^+) \, (M = 202.0 \, g/mol)$. Die Fraktion 3-015-11-K3 wurde auf Kieselgel® 60-Säulenmaterial aufgetrennt (CM 8:1, $2.5 \times 30.0 \, cm$).

Aus der Probe 3-015-K-63-3 gelang es, die mit dem Anisaldehyd rot-anfärbende Substanz als orangenes Öl in einer Ausbeute von 1.2 mg zu isolieren und die Struktur mittels ¹H-NMR und

HPLC-MS-DAD-Analyse aufzuklären. Ein Vergleich der Strukturmerkmale einer Substanz mit der Molekülmasse von 202 g/mol in der "AntiBase"Datenbank² bestätigte die Annahme, dass es sich hierbei um N^b -Acetyltryptamin (24) ($C_{12}H_{14}N_2O$, 202.26 g/mol) handelte.

Indole dienten auch als Strukturvorlage für synthetische Pyrido[3,2-b]-indol-4-yl-amine, die eine signifikante Aktivität in klinischen Tests gegen Malaria erzielt hatten.⁷⁸ Cobalo-Indol-Derivate (<u>40</u>) wurden auf Grund ihrer Cyclooxygenasehemmung und Antitumoraktivität synthetisiert und auf ihre Zellwachstumshemmung von Brustkrebslinien getestet; im direkten

Vergleich gegen bekannten Zytostatika lagen ihre IC_{50} -Werte deutlich höher. Als Inhibitoren der Glutathion S-Transferase werden die von Indolen abgeleiteten Wirkstoffe, wie z.B. TDD ($\underline{41}$) erfolgreich in der Bekämpfung der Resistenz von Antikrebsmitteln eingesetzt. Es wurde bewiesen, dass die Bildung der konjugierten Form mit Gluthation S in Gewebe-Entzündungsreaktionen (Prostaglandin-Mechanismus), und damit die "Vergiftung" der antikanzerogenen Mittel hervorrufen kann. Somit verbessern die Inhibitoren der Gluthation S-Transferase die Wirkung von Antitumor-Therapeutika und wurden ferner als entzündungshemmende Mittel eingesetzt (Abbildung 36).

Abbildung 36: Cyclooxygenase-Hemmer 40 und 41.

Substituierte und annelierte Indol- bzw. Carbazolderivate sind vom pharmakologischen Aspekt interessante Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Antibiotika mit Antitumor-Aktivität. Seit neue Erkenntnisse über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen im Bezug auf Topoisomerase-II-Hemmer gewonnen wurden, sind in den letzten Jahren sehr viele neue Verbindungen auf diesem Gebiet entwickelt worden. "Combilexine"⁷⁹ sind eine Gruppe von DNA-Liganden der Hybridmolekülreihe bei denen ein interkalierendes Chromophor (bevorzugter DNA-Binder) mit einem sequenzerkennenden DNA-Furchenbinder (Linker) verknüpft ist (Abbildung 37).^{80,81}

Abbildung 37: Synthetisch hergestellte Combilexine <u>42</u> und <u>43</u> als potentielle Topoisomerase-II-Hemmer.

Ihre zellbiologische Antitumor-Wirkung ist durch ihre schnelle Penetration in die Zellkerne von Krebszellen verursacht, wodurch die Topoisomerase-II unterdrückt wird. ⁸² Während sich das Chromophor des Combilexins <u>42</u> in die Doppelhelix "schraubt", bleibt die Linkereinheit in der großen- und kleinen Furche positioniert. ^{83, 84}

2.4.2.4 Isolierte Metaboliten aus Extremophilen

Die isolierten Wirkstoffe aus den Stämmen 3-001, 3-002, sowie 3-015 sind zwei großen Klassen von Sekundärstoffen, nämlich Nucleosiden und Indolen bzw. Tryptophanen zuzuordnen. Im chemischen Screening wurden diese Substanzklassen aus verschiedenen Stämmen nachgewiesen. Dünnschichtchromatographische Untersuchung und HPLC-Analytik bestätigten die Ähnlichkeit der Metabolitenmuster zwischen den Stämmen 3-001, 3-002 und 3-015. Die Produktivität war bei dem Stamm 3-002 am besten. Aus diesem wurden insgesamt vier Substanzen isoliert und chemisch charakterisiert: Adenosin (33) (267.25 g/mol, Cytidin (34) (243.16 g/mol), 1*H*-Indol-carbonsäure (38) (161.16 g/mol) und Indol-3-milchsäure (39) (205.22 g/mol) (Abbildung 38):

HO OH HO OH
$$\frac{33}{3}$$
 $\frac{34}{3}$ $\frac{38}{3}$ $\frac{39}{3}$

Abbildung 38: Isolierte Metaboliten aus dem Stamm 3-002.

Die Ausbeuten an gewonnenem Rohextrakt waren bei den Stämmen 3-002 und 3-015 vergleichbar hoch, allerdings zeigte das Metabolitenmuster des Stammes 3-002 eine höhere Vielfalt an Sekundärmetaboliten als bei 3-015.

Einblicke in die Biosynthese von L-Tryptophan (46) und Tryptamin (47)

In Anlehnung an die Studien über Indolalkaloide aus marinen Streptomyceten, kommt N^b -Acetyltryptamin (24) in der Natur nicht häufig vor. 85 Eine erste Studie berichtet von N^b -Acetyltryptamin (24) als ein Biosynthesederivat, transformiert vom Tryptamin bei Streptomyces staurosporeus. 86 Ausgehend von der Chorisminsäure (44) wird Pyruvat durch die Anthranilatsynthetase abgespalten und durch Einführung einer Aminogruppe von Glutamin Anthranilsäure (45) gebildet.⁸⁷ Die Abspaltung von Glycerinaldehyd-3-phosphat Indol-3-glycerolphosphat wird durch **(46)** die α-Untereinheit Tryptophansynthetase katalysiert, es entsteht ein Indol (47). Die β-Untereinheit katalysiert die Übertragung des Serins auf das Indol zur Bildung von L-Tryptophan. Zunächst wird Serin durch Pyridoxalphosphat (PLP) der \u03b3-Untereinheit gebunden, dann dehydroxyliert und kondensiert es mit dem Indol. Durch Umlagerung und Abspaltung des PLP-Komplexes (48) wird L-Tryptophan (49) frei. Bei der Decarboxylierung von Tryptophan (49) entsteht Tryptamin (50), das an der Bildung weiterer Alkaloide beteiligt ist (Abbildung 39).

Abbildung 39: Biosynthese des L-Tryptophans (49) und Tryptamins (50).88

<u>48</u>

Wie bei zahlreichen prokaryotischen und eukaryotischen Organismen sind die Arylamin-*N*-Acetyltransferasen (NAT) zahlreich vorhanden. Substrate der Arylamin-*N*-Acetyltransferase sind Substanzen mit primären Aminogruppen wie primäre aromatische oder seltener aliphatische Amine, Sulfanilamide, Hydrazine und Aminosäuren. Dabei verläuft die Acetylierung der NAT-Substrate über einen zweistufigen Ping-Pong-Mechanismus (Abbildung 40). Im ersten Schritt acetyliert Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) (<u>51</u>) die SH-Gruppe eines Cysteinyl-Restes (Cys⁶⁸) im aktiven Zentrum der Arylamin-*N*-Acetyltransferase (<u>52</u>). Anschließend wird die Acetylgruppe auf den Stickstoff des Substratmoleküls übertragen.

Abbildung 40: NAT-katalysierte Acetylierung eines Amins.

Die häufigste Modifizierung der Nucleoside ist die Methylierung. Diese wird meistens nach der Biosynthese der Nucleinsäure, d. h. am fertigen Polynucleotid ausgeführt; während lediglich ein Enzym, die RNA-Polymerase, zur Synthese der Nucleotid-Kette benötigt wird, sind bereits mehr als 100 Enzymen bekannt, die Transfer-Ribonucleinsäuren (tRNA) auf der makromolekularen Stufe modifizieren.

Eine zusätzliche Anwendung kommt aus ihrer antibiotischen und cytostatischen Wirkung. Durch die Modifizierung kann die Aktivität der Nucleoside gesteigert werden, so dass bereits kleinere Mengen für den gewünschten Effekt ausreichen und das Wirkungsspektrum verbreitern.

Die gewonnenen Naturstoffe sind schon in ähnlicher Form aus anderen extremophilen Streptomyceten isoliert worden.⁸⁹ Im Laufe der Arbeiten an der Wirkstoffsuche aus extremophilen Mikroorganismen wurden auch andere, neue, sowie bekannte Substanzen isoliert und aufgeklärt. Während ihrer Dissertation konnte HOFFMANN⁹⁰ aus dem Stamm

3-009 1-Methyl-iso-inosin (<u>53</u>) (ein Strukturisomer des Inosins), 3-(2,3-Dihydroxy-1-methoxypropyl)-indol (<u>54</u>), 4-Hydroxyphenylessigsäure (<u>55</u>) sowie Anthranilsäure (<u>45</u>) und Genistein (<u>56</u>), wahrscheinlich ein Nährmedienbestandteil, isolieren und strukturaufklären (Abbildung 41).

Abbildung 41: Isolierte Verbindungen aus dem extremophilen Stamm 3-009.

Da die aufgeführten Metaboliten aus Extremophilen noch nicht beschrieben worden sind, könnten diese Verbindungsklassen ein charakteristisches Merkmal dieser Mikroorganismen sein.

2.5 Diskussion und Ausblick

Im Rahmen des DBU-Projektes sollten die extremophilen Mikroorganismen als Quelle neuartiger, bioaktiver Sekundärstoffe, die bisher unerforscht sind, untersucht werden. Dieser Problemkomplex sollte durch konsequente Anwendung moderner naturstoffchemischer, biologischer und genetischer Verfahren gelöst werden. Die biotechnologische Bedeutung extremophiler Mikroorganismen, besonders der *Archaea*, wird heute fast ausschließlich mit der Anwendung extrem thermostabiler Enzymaktivitäten verbunden. Über die biosynthetischen Leistungen extremophiler Mikroorganismen hinsichtlich der Produktion von Wirkstoffen ist diesbezüglich wenig bekannt.

Eine Hypothese ist, dass bakterielle Wirkstoffe oftmals primär gegen artverwandte Konkurrenten eingesetzt werden. In der Literatur findet man, dass parallel antibiotisch wirksame Peptide (Halozine und Sulfolobicine) aus Halobakterien und Sulfoloben (extrem halophilen bzw. thermophilen *Archaea*) isoliert wurden. Es bestand die Möglichkeit, dass weitere Metaboliten extremophiler Herkunft auch sekundär immunologische, onkologische und zytotoxische Aktivitäten zeigen. Im dualen Ansatz des chemischen und biologischen Screenings sollten extremophile Mikroorganismen auf ihre biosynthetischen Fähigkeiten hinsichtlich der Produktion neuartiger Wirkstoffe untersucht werden.

Der Schwerpunkt wurde auf biologisch und chemisch interessante Stämme und deren nachhaltigen Produktion gelegt. Von den 93 getesteten Extrakten wurde eine Auswahl von zehn Kandidaten getroffen, die sich in mehr als einem biologischen Assay gegen Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Sporidio johnsonii, Escherichia coli, Pseudomonas fluorescens, Mycobacterium smegmatis, Micrococcus luteus, Candida glabrata, Halobacterium sp., Propionibact acnes und Streptococcus mutans durch signifikante Aktivität ausgezeichnet hatten.

1) Die Extrakte 0-024-8, 0-029-1, 0-047-2, 0-047-3, 1-004-2 und 3-018-11 zeichneten sich wegen ihren guten biologischen Aktivitäten gegen die aufgelisteten Indikatororganismen aus. Es wurde versucht, die für die biologische Wirksamkeit verantwortlichen Metaboliten zu isolieren. Die Stämme wurden in Großmaßstabfermentationen kultiviert (20 L), für jeden Extrakt wurde eine Isolierungsstrategie optimiert, die meist einen schwierigen Trennungsgang beinhaltete. Die Fraktionen wurden immer aufs Neue auf die biologische Aktivität überprüft, somit verfolgte man den Pfad des aktiven Metaboliten durch die Trennung. Sobald die aktive

Komponente in einer Fraktion lokalisiert wurde, lieferte die HPLC-MS-DAD-Analyse zusätzlich die Hinweise auf den potentiellen Wirkstoff. Durch den Vergleich der UV-Spektren, Molmassen und Fragmentierungsmuster mit den Einträgen in den etablierten Naturstoffdatenbanken "Dictionary of Natural Products" (DNP, Chapmann & Hall/CRC) und "AntiBase" (Chemical Concepts) konnte schnell festgestellt werden, ob es sich bei dem gefragten Metaboliten um literaturbekannte oder neuartige Metaboliten handelt. Die isolierten Substanzmengen von den Metaboliten war leider dennoch entweder zu gering oder der Reinheitsgrad war nicht ausreichend, um die abschließende Strukturaufklärung durchführen zu können. Da in dem Zeitrahmen des geförderten DBU-Projektes eine Nachkultivierung im größeren Maßstab nicht mehr möglich war, wurde keine weitere chemische Profilierung erstellt.

2) Die Stämme 3-001, 3-002 und 3-015 fielen positiv sowohl in dem biologischen als auch in dem chemischen Screening auf. Alle Stämme wurden in komplexen Medien unter "Göttinger Bedingungen" in verschiedenen Anzuchten im Großmaßstab kultiviert (5 L, 10 L, 12 L, 15 L). Aus dem Extrakt 3-001-6-K5-8 gelang es, den für die biologische Aktivität gegen *S. aureus* und *S. johnsonii* verantwortlichen Stoff, *N*^b-Acetyltryptamin (24), in einer Ausbeute von 5.8 mg (aus 15 L) zu isolieren.

Außerdem konnte in der gleichen Anzucht eine möglicherweise neue, bisher nicht literaturbekannte Verbindung, aus Fraktion 3-001-6-K5-6 (5.0 mg aus 15 L) isoliert und anhand der vorhandenen 2D-NMR-Experimenten die erste räumliche Verknüpung der Molekülfragmenten erarbeitet werden. Für die Bestätigung, ob tatsächlich eine peptidische Verbindung vorliegt, würde ein 2D-NOESY-Spektrum bessere Einblicke in die Peptidsequenz gewähren.

Aus der aufgereinigten Fraktion 3-001-6-K5-21 ist es nicht gelungen, die interessante, mit Anisaldehyd rosa-anfärbende Substanz zu isolieren. Die HPLC-MS-DAD-Untersuchung ergab eine Molmasse von 390 g/mol, welche auf interessante Antibiotika-Strukturen wie Tetraacetyl A 33853 <u>32</u> verweist.

3) Der Stamm 3-002 war durch eine besonders hohe zytotoxische Aktivität (Bewertung 3) und ein auffälliges Metabolitenmuster als erfolgversprechender Produzent eingestuft worden. Während der Bearbeitung sind vier bekannte Naturstoffe gewonnen worden:

HO OH HO OH
$$\frac{33}{3}$$
 $\frac{34}{3}$ $\frac{38}{3}$ $\frac{39}{3}$

- 4) Der Stamm 3-015 enthielt in dem Extrakt 3-015-10-K6 eine spezifisch auf gram-positive Bakterien antimikrobiell wirksame Komponente, worauf sich die Isolierungsstrategie hauptsächlich richtete. Es wurde vermutet, dass die bioaktive Verbindung eine mit Anisaldehyd auffällig rot-anfärbende Substanz ist. Die Isolierung und chemische Charakterisierung wurde erfolgreich abgeschlossen. Bei dem isolierten Stoff handelte es sich erneut um den

 N^b-Acetyltryptamin (24) (1.2 mg aus 10 L). Leider ging die biologische Aktivität des Extraktes damit in Tests gegen Indikatororganismen verloren.
- 5) Viele Ergebnisse sind erst gegen Ende des Projektes fertig gestellt worden. Dadurch blieb die Auswertung vieler interessanter Kandidaten auf der Stufe des chemischen Screening stehen und wurde nicht weiter experimentell verfolgt: 3-012 (*Thermoactinomyceten* sp.; Aktivitäten gegen *M. smegmatis* (Hemmhofdurchmesser (Ø HH) 14 mm), *Halobacterium* sp. (Ø HH 15 mm), 3-013 (*unspez. Bakterium*, leichte Zytotoxizität (Bewertung 1); Aktivität gegen *B. subtilis* (Ø HH 18 mm), *S. aureus* (Ø HH 16 mm), *M. smegmatis* (Ø HH 28 mm), *S. johnsonii* (Ø HH 22 mm), 3-014 (*unspez. Bakterium*, leichte Zytotoxizität (Bewertung 1), aktiv gegen *M. smegmatis* (Ø HH 30 mm), *S. aureus*. (Ø HH 22 mm), *M. luteus*. (Ø HH 14 mm).

Obwohl es mit bisherigen Ergebnissen nicht gelang viele neuartige Leitstrukturen zu gewinnen, konnte mit den Extremophilen ein neues Kapitel in der Naturstoffforschung aufgeschlagen werden. Diese Mikroorganismen waren aufgrund ihres oftmals schwer zugänglichen und nur unter großem technischem Aufwand nachzuahmenden Lebensraums eine mit vielen Herausforderungen verbundene Ressource. Ein Großteil der extremophilen Mikroorganismen wächst nicht zu hohen Zelldichten heran, so dass die Ausbeuten gering sind. Eine verlängerte Kultivierungsphase verhinderte, in der zur Verfügung stehenden Zeit die Anzucht einer größeren Anzahl von Stämmen auszuführen. Dennoch konnte ein Einblick in einen Teil der biosynthetischen Kapazität von Extremophilen gewährt werden, und wir haben einen generellen Überblick über ihre antimikrobielle Aktivität gewonnen. In ihrer biologischen Aktivität haben die aus ihren Kulturen gewonnenen Extrakte eine erstaunliche Leistung aufgewiesen.

3. Studien zur Biosynthese eines neuen Polyketides mit Spirotetron-Struktur

3.1 Tetronsäuren und makrocyclische Polyketide

Allgemeines

Streptomyceten produzieren außer den klassischen Makrolid-Antibiotika eine Vielfalt an außergewöhnlichen Makroliden, die nicht der strukturellen Normalität und daher nicht den Biosynthesemustern herkömmlicher Verbindungen entsprechen. Einige ausgewählte Vertreter von Spirotetronat-Polyketiden dieser Substanzklasse sind hier als Beispiele aufgeführt.

Das Chlorothricin (<u>57</u>) ist das älteste und bekannteste Antibiotikum dieser besonderen Antibiotikagruppe. Obwohl viele der Spirotetronate eine nachweisliche Aktivität gegen Gram-positive Bakterien besitzen, ist Chlorothricin (<u>57</u>) die einzige Verbindung, die die Pyruvat-Carboxylase der anaplerotischen Synthesereaktion vom Oxalacetat inhibiert:⁹⁶

Pyruvat +
$$CO_2$$
 + ATP + H_2O \rightarrow Oxalacetat + ADP + P_i + 2 H^+

Außerdem ist Chlorothricin (<u>57</u>) in der Lage, mit den Membran-Phospholipiden von *B. subtilis* in Wechselwirkung zu treten. Der Wirkungsmechanismus unterscheidet sich aber deutlich von dem der anderen Makrolid-Antibiotika. ⁹⁷

Kijanimicin (<u>58</u>) zeigt *in vitro* die Aktivität gegen einige gram-positive und anaerobe Bakterien. In den Untersuchungen *in vivo* wies es eine potente Aktivität gegen Malaria auf. Ebenfalls besitzt Kijanimicin (<u>58</u>) Antitumorale-Aktivität.

$$\begin{array}{c} O_2N & CH_3 \\ O_2N & CH_3 \\ O & CH_3$$

Tetrocarcin A (<u>59</u>) besitzt eine breite Palette an antitumoraler Aktivität, zeigt aber in den Testsystemen keine signifikante Myelosuppression und Nephrotoxizität mit Mäusezelllinien. Einige neuere Studien beweisen jedoch, dass Tetrocarcin A (<u>59</u>) die Apoptose einer Leukämie-zellinie (T-ALL) und einer chronischen lymphozytischen Leukämie-Zelllinie (Typ B, B-CLL) verursacht. Die Induktion erfolgt hierbei über einen neuen Signal-Transduktion-Reaktionsmechanismus. Aufgrund seiner biologischen Aktivität ist Tetrocarcin A (<u>59</u>) als potentielle Leitstruktur für neuartige, semisynthetische Wirkstoffe besonders interessant.

Aristotatin A (<u>60</u>) und B (<u>61</u>) gehören zur Klasse von Tetrocarcin-Antibiotika und sind als neue Analoga des Tetrocarcin A (<u>59</u>) eingestuft worden. Die Strukturaufklärung des Aristotatins A (<u>60</u>) führte zur Revision der Disaccharid-Struktur von Chlorothricin (<u>57</u>). Deren beträchtliche antibakterielle-Aktivität *in vitro* gegen Gram-positive Bakterien und gute Aktivität gegen Tumorzelllinien weckte das Interesse für diese außergewöhnliche Makrolide. ¹⁰²

Die Struktur des Bielschowskysin (<u>62</u>) mit seinem hoch oxygenierten, hexazyklischen Ringsystem wurde als solche bisher nur einmalig berichtet. Die Grundstruktur des tricyclo[9.3.0.0]tetradecan-Grundgerüstes ist aus Diterpenoid-Lactonen abzuleiten, wobei eine ungewöhnliche Umlagerung des Kohlenstoffgerüsts während der Biosynthese postuliert wird. Bielschowskysin (<u>62</u>) zeigte außerdem eine signifikante antiplasmodiale Aktivität.

Abyssomicin B (<u>63</u>), C (<u>64</u>) und D (<u>65</u>) gehören einer Antibiotika-Klasse an, die als pABA-Inhibitoren in der Natur selten vorkommt. Sie hemmen die Biosynthese der bakteriellen pABA und sind somit die ersten Wirkstoffe dieser Art, die aus einer mikrobiellen Quelle stammen. ¹⁰⁷ Abyssomicine werden in Kap. 3.2 detailliert vorgestellt.

<u>62</u>

Allen hier erwähnten Makrolid-Antibiotika ist ihre ungewöhnliche, polycyclische Struktur gemeinsam. Das Aglykon ist ein Makrolidringsystem, das eine charakteristische

Tetronsäure-Einheit enthält, die spiroverknüpft mit einem Cyclohexen- oder Cyclohexanring ist. Sie kann auch über eine Carbonsäureestergruppierung an ein *trans*-Octahydronaphtalin gebunden sein.

Die Tetronsäuren (4-Hydroxy-2-(5H)-furanone) bilden eine Unterklasse der β-Hydroxybutenolide. Ihre allgemeine Struktur (<u>66</u>) ist in der Abbildung 42 dargestellt. Die repräsentativen Vertreter dieser Substanzklasse sind Vitamin C (Ascorbinsäure) (<u>67</u>) und die Halbacetalform der Penizillsäure (<u>68</u>).

Abbildung 42: Allgemeine Struktur (<u>66</u>) von Tetronsäuren und deren bekannten Vertreter Vitamin C (<u>67</u>) und Halbacetalform der Penizillinsäure (<u>68</u>).

3.2 Das ungewöhnliche Spirotetron Abyssomicin C (64)

Allgemeines

Auf der Suche nach Inhibitoren der aromatischen Aminosäuren sowie *para*-Aminobenzoesäure (*p*ABA) konnten im Arbeitskreis von H.-P. FIEDLER mittels eines gezielten Screening-Ansatzes die Subtanzklasse der Abyssomicine detektiert und isoliert werden. ¹⁰⁸

Die ungewöhnlichen polyzyklischen Antibiotika Abyssomicin B (63), C (64) und D (65) wurden hiermit erstmalig als Substanzen isoliert und beschrieben. Diese Antibiotika aus *Verrucosispora*, einem seltenen marinen Actinomyceten-Stamm, sind Inhibitoren der bakteriellen *para*-Aminobenzoesäure (*p*ABA). Die Biosynthese von *p*ABA ist essentieller Teil der Biosynthese von Tetrahydrofolaten. Seitdem bekannt ist, dass diese Biosynthese nur in Mikroorganismen und nicht im Menschen stattfindet, ist die Entwicklung von Polyketid-Antibiotika als *p*ABA-Inhibitoren ein sehr interessantes Ziel der pharmazeutischen Forschung. Es wurde herausgefunden, dass der inhibitorische Effekt der Abyssomicine in der bakteriellen Biosynthese während der Umwandlungen von Chorismat zur *p*ABA stattfindet. Abyssomicin C (64) inhibiert beide für die Konvertierung von Chorismat in *p*ABA verantwortlichen Enzyme, die 4-Amino-4-deoxychorismat-Synthase (ADC-Synthase) und die 4-Amino-4-deoxychorismat-Lyase (ADC-Lyase) (Abbildung 43).

Abbildung 43: Inhibitorischer Effekt des Abyssomicins C (<u>64</u>) auf Tetrahydrofolat-Biosynthese.

In dem postulierten Mechanismus beruht die Bioaktivität auf dem annelierten Oxabicyclooctan-System (C und D Ring), das eine offensichtliche Ähnlichkeit sowohl zu dem konformativen Zustand des Chorismats (in Lösung) als auch zu synthetischen Analoga von Chorismat-Substraten besitzt (Abbildung 44).¹⁰⁷

Abbildung 44: a) Diaxiale Konformation von Chorismat in wässriger Lösung;

b) Synthetisches Übergangszustands-Analogon von Chorismat-Mutase Substraten.

Darüber hinaus scheint das Michael-System (C7-C9) neben dem Oxabicyclooctan-Ringssytem in <u>64</u> verantwortlich für die antibiotische Aktivität zu sein, was der Vergleich mit antibiotisch inaktiven <u>63</u> impliziert. In dem postulierten Mechanismus wird Abyssomicin B (<u>63</u>) durch 1,4-Addition von Hydroxylamin an Abyssomicin C (<u>64</u>) (vermutlich geliefert von NADH) mit anschließender Oxidation gebildet. Bei der Bildung des Abyssomicins D (<u>65</u>) folgt auf die 1,4-Addition eine intramolekularen Michael-Addition des Enolats an den benachbarten Ester (Abbildung 45).

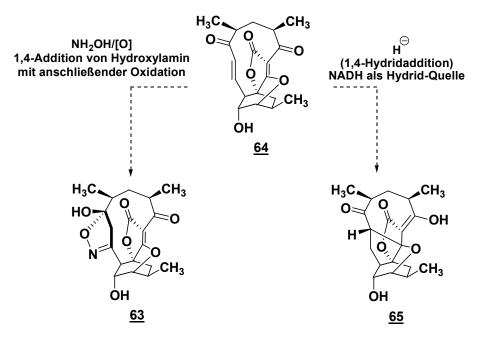


Abbildung 45: Umwandlung von Abyssomicin C (<u>64</u>) in das Abyssomicin B (<u>63</u>) und D (<u>65</u>).

Die Verbindungsklasse der Chorismatmutase-Hemmer und somit im weitesten Sinne die Antifolate, inhibierten *Staphylococcus aureus* und andere multiresistente Bakterienstämme bereits in einer Konzentration von 4-13 μg/mL. Die antibiotische Wirkung ist damit sehr deutlich, die genaue Bindungsstelle ist noch nicht bekannt. Diese Ergebnisse deuten darauf, dass das Abyssomicin C (<u>64</u>) und dessen Derivate in Zukunft gegen Infektionskrankheiten eingesetzt werden könnten.

Das Tetronsäure-Motiv des Rings B ist vergleichbar mit Antibiotika vom Tetrocarcin-Typ. Daher ist anzunehmen, dass die Biosynthese der Abyssomicine große Ähnlichkeiten zu anderen Antibiotika, die vom Tetrocarcin A (59) abgeleitet werden können, aufweist.

Biosynthesestudien von H. G. FLOSS am Chlorothricin (<u>56</u>) zeigten, dass das Aglykon Chlorothricolid (<u>69</u>) überwiegend polyketidischer Herkunft ist (iterativer Typ I Polyketidsynthase). Fütterungsexperimente ergaben, dass es aus zehn Acetat- und zwei Propionat-Einheiten aufgebaut wird (Abbildung 46).

Abbildung 46: Einbaumuster von Propionat und Acetat in das polyketidische Aglykon <u>69</u> von Chlorothricin (<u>57</u>) von H. G. FLOSS.

Da die Kohlenstoffatome C-25 und C-26 des Tetronsäure-Gerüstes keine intakten Acetat-Einheiten aufweisen, war ihr Ursprung zuerst nicht klar. FLOSS untersuchte die metabolische Herkunft der drei Kohlenstoffatome über Fütterungsexperimente mit verschiedenen ¹⁴C-markierten Acetat- und Propionat-Verbindungen ([1,2-¹⁴C₂]Acetat und [3-¹⁴C]Propionat) und anschließender Methanolyse des radioaktiv angereicherten Metaboliten. Die Analyse der prozentualen Verteilung der spezifischen Radioaktivität des Aglykon-Methylesters ergab eine eindeutige Aufteilung auf zehn Acetat-Einheiten und implizierte zusätzlich den Einbau der radioaktiven Tracer in weitere, nicht vom Acetat abstammenden Kohlenstoffatome.¹¹¹

Diese Ergebnisse erklärten nicht die Herkunft von C-22, C-23 und C-24 des Aglykons.

Daher wurden weitere Biosyntheseuntersuchungen in der gleichen Studie von FLOSS durchgeführt, um die Herkunft der Kohlenstoffatome C-22, C-23 und C-24 zu klären. Hierbei wurden Fütterungsversuche mit markierten Vorläufern eingeleitet. Die Fütterungsexperimente mit uniform markiertem [U-13C3]Glycerin (70)

(Anreicherung 99 % pro Kohlenstoffatom) und [1-14C]Glycerin und anschließende Methanolyse des Naturstoffes 57, zeigten die Anreicherung an den Positionen C-22, C-23 und C-24 (33 % Einbaurate). Die Analyse des Kopplungsmusters in Chlorothrichlorid (69) bestätigte außerdem den Einbau von 13C-Glycerin über Metabolisierung zu Acetyl-CoA durch die Detektion über starke Anreicherungen in den Acetat-Einheiten und einen moderaten Einbau in die Propionat-Einheiten. Diese Unterschiede in der Höhe der Anreicherung der 13C-NMR-Signale spiegeln den Eintritt von Acetyl-CoA in den Citronensäurezyklus wider. 111

Fütterungsexperimente mit stereospezifisch ¹³C-angereichertem Glycerin zeigten weitere Details der Biosynthese der Tetronsäureeinheit. Im prochiralen Glycerin (<u>71</u>) stehen beide Hydroxymethylgruppen in einer enantiotopen Beziehung zueinander und sind durch Glycerin-Kinase unterscheidbar (Abbildung 47). ¹¹²

Abbildung 47: Stereospezifische Umwandlung des Glycerins (<u>71</u>).

Die Glycerin-Kinase bewirkt den Eintritt von Glycerin in den zellulären Stoffwechsel, sie phosphoryliert unter ATP-Verbrauch die *pro-R*-Hydroxymethylgruppe stereospezifisch zu L-Glycerin-3-phosphat (<u>72</u>), welches dann zu Triosephosphat (<u>74</u>) oxidiert wird (Abbildung 48). ¹¹³

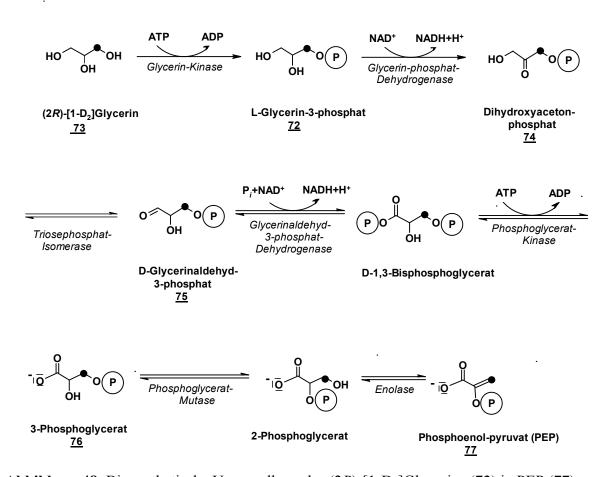


Abbildung 48: Biosynthetische Umwandlung des (2R)-[1-D₂]Glycerins $(\underline{73})$ in PEP $(\underline{77})$.

Triosephosphat (<u>74</u>) wird über die Triosephosphat-Isomerase in D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (<u>75</u>) umgewandelt, dass über 3-Phosphoglycerat (<u>76</u>) und Phosphoenol-pyruvat (<u>77</u>) zu Pyruvat (<u>78</u>) reagiert (Abbildung 49).

Abbildung 49: Abschließender Schritt der Umwandlung des Pyruvats (<u>78</u>) in Acetyl-CoA.

Die Fütterungsversuche mit (2R)- $[1-D_2]$ Glycerin bestätigten den Einbau von Deuterium in C-22 des Glycerins (71). Dieses Kohlenstoffatom entspricht dem C-1 des Glycerins (69) (die pro-R-Hydroxymethylgruppe, siehe Abbildung 40) und dem C-3 von Triosephosphat (74). Die aus Propionat stammende Methylgruppe C-27 wurde entgegensetzt der Erwartungen mit Deuterium angereichert. Dementsprechend wurde ein plausibeler Mechanismus für die Bildung von Chlorothricolid (69) vorgeschlagen, der die Bindung des PEP an die PKS-Kette umfasst (Abbildung 50).

Abbildung 50: Hypothetischer Mechanismus der Entstehung der Aglykon-Einheit von <u>57</u>.

Die Kondensation der Polyketidkette (<u>80</u>) mit dem Phosphoenol-Pyruvat unter Retention eines Wasserstoffatoms an C-22, führt zur Ausbildung einer *trans*-Doppelbindung zwischen C-21 und C-22 (<u>81</u>). Auf Grund dieser Tatsache postulierte H. G. FLOSS, dass der Ringschluss unmittelbar vor der Addition von Wasserstoff stattfinden musste und die Addition an die Doppelbindung demzufolge auch in *anti*-Stellung erfolgen musste. Dadurch kann die Z-Konfiguration des Sechsrings im Makrolid erklärt werden.

H. G. FLOSS stellten weiterhin die Hypothese auf, dass die Polyketidkette <u>79</u>, die mit dem Phosphoenol-Pyruvat zum Tetronsäure-Gerüst kondensiert (<u>82</u>), nicht direkt Glycerin, sondern ein Metabolit von Glycerin ist. Die bereits in Abb. 48 gezeigte biosynthetische Umwandlung über Phosphoenol-pyruvat (<u>77</u>) bietet hiermit die wahrscheinlichste Möglichkeit.

Weitere Fütterungsexperimente mit [1,2-¹³C₂]Succinat bestätigten die Vermutung, dass die Propionat-Einheiten über die Methyl-Malonyl-CoA-Mutase zum direkten Vorläufer Methyl-Malonyl-CoA metabolisiert werden, da keine intakten Einheiten identifiziert werden konnten (Abbildung 51).

Abbildung 51: Darstellung des Einbaus von [1,2-¹³C₂]Succinat, zwei Wege A und B können unterschieden werden.

Die Klonierungs- und Sequenzierungsexperimente des Biosynthesegenclusters von <u>57</u> durch W. LIU erbrachten neue Einblicke in noch fehlende Teile der postulierten Biosynthese. Die Startereinheit wurde als Glyceroyl-S-ACP (<u>83</u>) postuliert (Abbildung 52). ¹¹⁴

Abbildung 52: Glyceroyl-S-ACP (<u>83</u>) als vorgeschlagene Startereinheit in der Biosynthese von Chlorothricin (<u>57</u>) von W. LIU.

Nach der Cyclisierungsreaktion der Tetronsäureeinheit (<u>87</u>), geht das resultierende Polyketid-Intermediat (<u>88</u>) eine intramolekulare [4 + 2] Diels-Alder Reaktion ein (Abbildung 53).

Abbildung 53: Darstellung der abschließenden Schritte in Biosynthese des <u>57</u> postuliert durch Gensequenzierung von W. LIU.

Das *trans*-Decalinsystem wird wahrscheinlich nicht enzymatisch gebildet, d.h. das dazugehörige Gen für eine in der Natur möglicherweise vorkommende Diels-Alderase, verantwortlich für die intramolekulare Diels-Alder Reaktion, ist bisher noch nicht gefunden worden. Die Baeyer-Villiger Oxidation wird durch eine Monooxygenase der FAD-Monooxygenase-Familie hervorgerufen. Das Enzym ChE2 aus der Familie der P-450-Enzyme könnte für die Oxidation der Methylgruppe zur Carboxylgruppe verantwortlich sein.

Damit wird deutlich, dass gute Fortschritte in der Biosyntheseforschung der Spirotetronate erreicht worden sind. Aber da der Beweis über die Biosynthese der Tetronsäureeinheit noch immer aussteht, sind Biosynthese-Studien an Spirotetronaten immer noch ein interessantes Forschungsthema.

3.3 Bekannte Totalsynthesen der Abyssomicine

Abyssomicin C (<u>64</u>) ist eine sehr attraktive Leitstruktur für die Entwicklung neuer Inhibitoren von pathogenen Bakterien. An Bedeutung gewann diese ungewöhnliche Substanz durch ihre inhibitorische Aktivität gegen bakterielle *p*-Aminobenzoesäure (*p*ABA) in der Biosynthese von Chorismaten. Viele Arbeitsgruppen der Synthesechemie haben sich auf das Gebiet der Totalsynthese des Abyssomicin gewagt und ihre Anstrengungen waren nicht umsonst. Hier werden drei ausgewählte Totalsynthesen zusammenfassend vorgetragen, die von E. J. SORENSEN, von B. B. SNIDER und von K. C. NICOLAOU.

Totalsynthese von E. J. SORENSEN¹¹⁵

Die Arbeitsgruppe von E. J. SORENSEN schlug anlehnend an biosynthetische Ansätze (siehe A.3.2) eine intramolekulare Diels-Alder-Synthese als Schlüsselschritt der Totalsynthese vor. Die Retrosynthese gibt hier Einblick in die Synthesestrategie (Abbildung 54):

Abbildung 54: Retrosynthetische Analyse von E. J. SORENSEN.

Aufgrund der detaillierten retrosynthetischen Analyse wählte E. J. SORENSEN die Addition von trans, trans-2,4-Hexadienal (<u>93</u>) und dem lithiierten Tetronat (<u>94</u>) als ersten Schritt, der von einer Aldol-Kondensation des synthetisierten Enolats (<u>95</u>) gefolgt war (Intermediat <u>91</u>). In einer Tandem- β -Eliminierung (diastereoselektive Cycloaddition) wurde der Trizyklus <u>91</u> erhalten. Die Epoxidöffnung verlief nicht regioselektiv (Abbildung 55).

Abbildung 55: Der Übergangszustand der Domino-β-Eliminierung (Diels-Alder-Reaktion).

Totalsynthese von B. B. SNIDER¹¹⁶

Die Arbeitsgruppe von B. B. SNIDER erarbeitete eine verwandte Totalsynthese (Abbildung 56). Hier wurde eine Epoxidierung vorgeschlagen, um die Problematik des stereoisomeren Gemisches, das bei E. J. SORENSEN durch die Epoxidöffnung entstanden war, zu umgehen.

Abbildung 56: Die retroynthetische Analyse von <u>64</u> nach B. B. SNIDER.

Eine Dess-Martin Oxidation des synthetisierten Aldehyds $\underline{96}$ bei -100 °C resultierte mit einem *E*- und *Z*-Isomerengemisch von $\underline{92}$. Da das *E,E*-Dien aber reaktiver als sein *E,Z*-Isomer ist, erfolgte der Reaktionszyklus bevorzugt weiter zu $\underline{91}$, was in einer Domino β-Eliminierung (Diels-Alder-Reaktion, katalytische Mengen des [La(OTf)₃], 100 °C) geschieht.

Der Übergangszustand ist in der Abbildung 55 dargestellt worden. Die Umsetzung mit *m*-CPBA oder DMDO zur Bildung des Epoxides führte zu einem komplexen, schwer trennbaren Gemisch.

Totalsynthese von K. C. NICOLAOU¹¹⁷

K. C. NICOLAOU schlug die Ringschluß-Metathese (RCM) des Makrozyklus C-3 bis C-8 ($\underline{57}$) und eine Lithiierung (Alkylierung) der β -Enonkette C-2 bis C-8 vor. Der Aufbau des

Oxabicyclo[2.2.2]octan-Gerüsts wurde über ein Epoxid-Intermediat (<u>99</u>) durch nucleophile Epoxidöffnung erreicht (Abbildung 57).

Abbildung 57: Retrosynthetische Analyse des Abyssomicins C (<u>64</u>) nach K. C. NICOLAOU.

Ein in der Literatur formulierter Reaktionsmechanismus ist bisher nur eine Hypothese, da ein Epoxid-Intermediat nicht beobachtet werden konnte.

Das Verdienst der NICOLAOU-Synthese ist die Entdeckung des Atrop-Abyssomicins C (<u>100</u>). Die röntgenkristallographische Strukturanalyse des Atrop-Abyssomicins C (<u>100</u>) ergab, dass das Keto-Kohlenstoffatom C-6 mehr cisoide Konformation (dihedraler Winkel O=C-C=C 26.4°) als das natürlichvorkommende Abyssomicin C (<u>64</u>) besitzt (mehr transoid ausgerichtet, dihedraler Winkel O=C-C=C 144.8°) besitzt (Abbildung 58).

Abbildung 58: Abyssomicin C (<u>64</u>) und Atrop-Abyssomicin C (<u>100</u>).

Aufgrund seines erhöhten konjugierten Systems besitzt Atrop-Abyssomicin C (<u>100</u>) noch potentere antibiotische Eigenschaften (1.5-fach größere Aktivität gegen MRSA als <u>64</u>). Die Total-Synthesen von Spirotetronaten haben also bisher große Erfolge erzielt und beflügeln die modere Suche nach neuen Naturstoffen.

3.4 Kultivierung des Stammes GT 19961033 und Isolierung des Spirotetrons (22)

Allgemeines

Der Stamm GT 19961033 wurde aus einer Erdprobe aus Ile de Paradis, Senegal isoliert. Von der Arbeitsgruppe von I. SATTLER (HKI Jena) isoliert und dem Arbeitskreis S. GROND für die vorliegende Arbeit zur Untersuchung der Biosynthese zur Verfügung gestellt. Der Stamm fiel durch die Produktion des Metaboliten 22 auf, der sich durch eine neue Struktur ausgezeichnete. Die von AK I. SATTLER vorgeschlagene Struktur beinhaltet vier annelierte Ringe von denen der Ring B ein Tetronsäure-Motiv beinhaltete und an dem sich ein Oxabicyclo[2.2.2]octansystem (C und D) anschließt. Dem Ring A konnte deutlich das gezeigte Michael-System zugeordnet werden (Abbildung 42). Die Verbindung 22 erinnert sehr an die Substanzklasse der Abyssomicine (63-65) (A.3.1), die Strukturmerkmale sind dem Abyssomicin D (65) ähnlich. Die Abyssomicine (63-65) wurden aus den seltenen marinen Actinomyceten-Stämmen der Gattung *Verrucosispora* erstmals von H.-P. FIEDLER (2004) isoliert und identifiziert (Abbildung 59).

Abbildung 59: Vergleich der Strukturen des neu isolierten Spirotetrons <u>22</u> und der Abyssomicine C (<u>64</u>) und D (<u>65</u>).

Eigene Arbeiten

Der Stamm GT 19961033 wurde bei 28 °C und 120 spm in 1 L-Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen in Hafer-Nährmedium (12 L) unter Zusatz von Glycerin (500 mg/L) und Spur 11 (2.5 mL/L) 96 h kultiviert. Die Aufarbeitung der Kulturbrühe erfolgte nach Aufarbeitungsschema 8 (B.5.6.5), wobei der Zell-Extrakt verworfen wurde.

Das Kulturfiltrat wurde nach der optimierten Aufarbeitungmethode auf Amberchrom[®]C161CG-Adsorberharz aufgebracht (10.0 × 10.0 cm) und mit dem folgenden Gradienten eluiert: 100% Wasser, Wasser/Methanol 80:20, Wasser/Methanol 60:40, Wasser/Methanol 40:60, Wasser/Methanol 20:80 und anschließend 100% Methanol (jeweils mit 500 mL).

Durch die Auftragung der Fraktionen auf das Kieselgel[®]RP-Säulenmaterial (Wasser/Methanol 50:50, 7.0 × 15.0 cm) wurden Mischfraktionen vorgereinigt und anschließend vorgetrennt (HPLC 1, Säule 11, Programm 8, B.5.2.IV).

Die Isolierung der Verbindung <u>22</u> erfolgte anschließend an einer gekoppelten HPLC-LC-MS-Anlage des HKI Jena (HPLC 2, Säule 13, Programm 7, B.5.2.IV; Aufarbeitungsschema 9, B.5.6.4) (Abbildung 60).

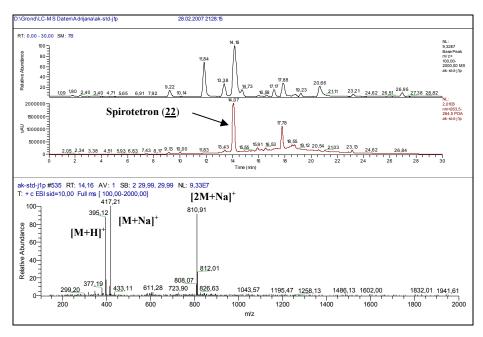


Abbildung 60: Die LC-MS-Analyse des Spirotetrons $\underline{22}$ ($\lambda = 263$ nm, $R_t = 14.2$ min).

Man erhielte 6.9 mg der Spirotetrons <u>22</u> als hellbraunen Feststoff, welches dünnschichtchromatographisch mit Orcin braun anfärbt und bei 254 nm UV-aktiv ist

(Abbildung 61). Die LC-MS-Analyse ergab bei einer Retentionszeit (R_t) von 14.2 min im positiven Modus zwei Molekülionen: $m/z = 395 ([M+H]^+)$ und 417 $([M+Na]^+)$.

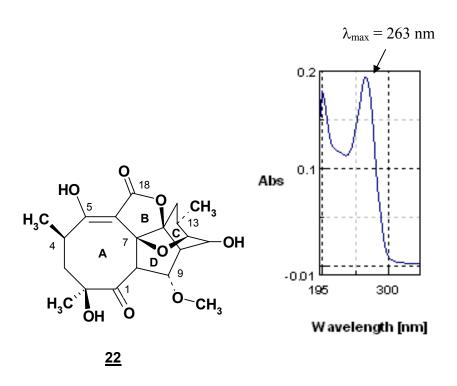


Abbildung 61: UV-Spektrum von <u>22</u> (Absorptionsmaximum liegt bei 263 nm) (HPLC 1, Säule 8, Programm 3, B.5.2.III).

Im ¹³C-NMR-Spektrum konnten folgende Signale der Substanz <u>22</u> mit den Daten der Strukturaufklärung des HKI Jena verglichen werden: zwei der quartären Kohlenstoffatome des Tetronsäure-Motivs (Ring B) finden sich bei $\delta_C = 84.5$ ppm (C-11) und $\delta_C = 97.3$ ppm (C-6) wieder, die Carbonylgruppe das γ-Lactons bei einer chemischen Verschiebung von $\delta_C = 174.1 \text{ ppm}$ (C-18). Das Signal des Kohlenstoffatoms C-7 ist wegen einer Oxo-Verbrückung stärker im Tieffeld bei δ_C = 85.3 ppm zu sehen. Die Kohlenstoffatome bei δ_C = 50.8 ppm (C-10) und δ_C = 65.1 ppm (C-8) konnten dem Ring D zugeordnet werden. Das Kohlenstoffatom C-9 trägt eine Methoxygruppe und erscheint somit bei einer charakteristischen chemischen Verschiebung um $\delta_{\rm C}$ = 76.9 ppm. Das benachbarte Kohlenstoffatom C-10 des annelierten Sechsrings C ist bei $\delta_C = 50.7$ ppm zu sehen, das in dem Kohlenstoffgerüst nachfolgende C-15 trägt einer Hydroxygruppe als Substituenten und ist somit bei $\delta_C = 67.63$ ppm aufzufinden. Kohlenstoffatom C-14 ist durch die Oxo-Verbrückung mit C-7 verbunden, sein Signal tritt bei einer chemischen Verschiebung bei $\delta_{\rm C}$ = 76.1 ppm auf. Die Methingruppe C-13 mit der Methylgruppe als Substituenten (19-CH₃)

liegt bei δ_C = 24.2 ppm, die weitere Methylengruppe C-12 als letztes Glied in der Sechsringkette ist bei δ_C = 32.4 ppm zu finden. Die Ketogruppe des verbleibenden Ringes A (C-1) konnte eindeutig dem Signal bei δ_C = 209.5 ppm zugeordnet werden, das zweite sp²-hybridisierte Kohlenstoffatom C-5 ist folglich dem Signal bei δ_C = 181.9 ppm zuzuordnen. Ein zusätzliches quärteres Kohlenstoffatom im Ring A konnte bei δ_C = 78.4 ppm erkannt und der Position C-2 zugeordnet werden. Die verbliebene Resonanz δ_C = 37.9 ppm ist der Methylengruppe C-3 zugeordnet worden. Die Methingruppe C-4 trägt eine Methylgruppe mit Substituenten und ist somit ebenfalls wie C-3 im Hochfeld bei δ_C = 36.0 ppm zu finden. Die verbliebenen Signale im Hochfeld sind den drei Methylgruppen zuzuordnen. Auf Grund der chemischen Umgebung ist C-19 bei δ_C = 18.7 ppm, C-17 bei δ_C = 19.3 ppm und C-16 bei δ_C = 24.2 ppm im 13 C-NMR-Spektrum zu finden (Abbildung 62).

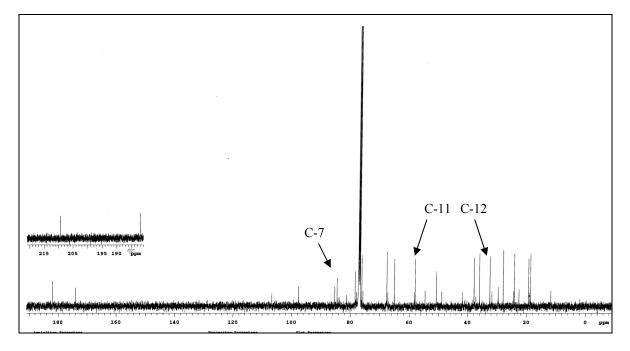


Abbildung 62: ¹³C-NMR-Spektrum (150 MHz) des Spirotetrons mit gekennzeichneten Kohlenstoffatomen der Tetronsäuremotivs in Chloroform-*d*₁.

3.5 Untersuchungen zur Biosynthese des isolierten Naturstoffes

Allgemeines: Regulation von Biosynthesewegen und die Feedbackkontrolle

Die biochemischen Leistungen der Mikroorganismen sind einzigartig. Gerade kleine niedermolekulare Stoffe finden sich im mikrobiellen sekundären Metabolismus, die wahrscheinlich eine Vielzahl von Funktionen für die ökologische Umgebung hatten, die wir bis heute nicht kennen. Sie alle haben ungewöhnliche Strukturmerkmale und ihre Bildung ist durch Nährmedium, Wachstumsrate, "feedback"-Kontrolle, enzymatische Inaktivierung oder Induktion reguliert. Das Variantenreichtum von Sekundärstoffen kann durch Zugabe von limitierenden Vorläufern (dirigierten Biosynthese) verstärkt werden. Dabei ist beobachtet worden, dass die Sekundärstoffe am besten unter suboptimalen Wachstumsbedingungen produziert werden. Aber die schmale Grenze zwischen der Wachstumsphase ("Tropophase") und der Produktionsphase ("Idiophase") ist manchmal nicht eindeutig definiert, die Idiophase überlappt des Öfteren die Thropophase. Die Faktoren, die die Wachstumsrate und den Sekundärmetabolismus beeinflussen wie z. B. der Nährstoffgehalt, sind mechanistisch noch nicht aufgeklärt. Viele antibiotische Wirkstoffe wirken hemmend gegen die eigene Bakterienkultur. Oftmal hat der Produzent eine Resistenz entwickelt gegen seine eigenen antibiotisch-wirkenden Stoffe. Das Fehlen eines bestimmten Wirkstoffes in der Produktionsphase, z.B. in einem nährstoffarmen Medium im Labor wäre eine mögliche Konsequenz, falls der besagte Metabolit als Waffe in dem Wettbewerb oder Abwehr des Produzenten mit den anderen Organismen eingesetzt wird. In nährstoffreicher Umgebung könnte die Produktion von antibiotisch wirksamen Sekundärmetaboliten für die Produzenten eine geringere Rolle spielen als bei anderen Mikroorganismen aus armen Boden- und Meereshabitaten. Das Wachstum ist hier durch das begrenzte Nährungsangebot bestimmt. Nahrungsdefizit induziert häufig morphologische und chemische Differenzierung wie Sporulation und Induktion des Sekundärmetabolismus; beide sollten von essentieller Bedeutung im Überlebenskampf sein. Für viele sekundäre Metabolite (kleiner als 1500 Da) sind die Gene verantwortlich für die Codierung der Enzyme und sind meistens in Clustern angeordnet, die Genexpression unterliegt einem Prozess strenger Kontrolle durch Wachstumsrate, Nahrungsangebot, Fremdsubstanzen, Metallgehalt der Umgebung und anderen ökologischen Parametern.

Glucose als eine sehr gute Kohlenstoffquelle für das Wachstum, kann ein Hemmstoff bei der Bildung von Sekundärmetaboliten sein. Polysaccharide (z. B. die Stärke), Oligosaccharide (unter anderem Lactose), und Öle (Sojaöl) sind dagegen bevorzugt eingesetzt, um Produktionssteigung zu erreichen. Viele Biosynthesewege sind limitierend reguliert durch die bestehenden Stickstoffquellen in dem Nährmedium. Um die metabolischen Abwege auszuschließen, enthalten die meisten komplexen Nährmedien Sojamehl als Proteinquelle, langsam verwertbare Aminosäuren wie Prolin oder Valin werden dagegen den chemisch definierten Nährmedien zugesetzt. Darüber hinaus gibt es noch mehr spezifische Möglichkeiten für die Regulation der Biosynthesewege, in denen z. B. eine bestimmte Aminosäure die Bildung des Metaboliten unterdrückt. Ein gutes Beispiel ist in der Biosynthese des Penicillins (negativer Effekt von Lysin) und in der Synthese von Cephalosporin zu finden. Die Stickstoffquelle ist beim Übergang von der Wachstums- in die Produktionsphase meist aufgebraucht, damit verlangsamt sich das Wachstum. Die Verlangsamung der Wachstumsphase durch einen äußeren Parameter ist also wichtiger für die Produktion des Metaboliten, als die Stickstoffquelle. Viele sekundäre Metabolite hemmen oder inhibieren ihre eigenen biosynthetischen Enzyme oder sogar den gesamten Biosyntheseweg. Diese so genannte "Feedback"-Kontrolle ist schon länger bekannt. Dies bedeutet unterdrückte Bildung des Metabolites während der "Feedback"-Phase sowie das Verschwinden der in der Biosynthese gebildeten Synthasen. 118

Eine alternative oder zusätzliche Betrachtungsweise stellt die These dar, dass die Produktion von Antibiotika den bakteriellen Organismus aus dem Gleichgewicht bringt und somit auch ein Produkt des induzierten Stresses ist. ¹¹⁹ Die Synthese von geringen Mengen an kleinen, diffusionsfähigen Signal-Molekülen scheint ein entscheidender Schritt in der Synthese mancher Antibiotika in den Streptomyceten zu sein.

Diese Moleküle können entweder als Indikator der Zelldichte fungieren, oder sie werden als Antwort auf physiologischen Bedingungen synthetisiert, in denen sich die Antibiotika zugunsten des Wirtorganismus bilden. γ-Butyrolactone wie der A-Faktor (2-Isocapryloyl-3*R*-hydroxymethyl-γ-butyrolacton) aus *Streptomyces*, spielen möglicherweise eine Rolle bei der Auslösung der Antibiotika-Produktion und morphologischen Differenzierung der Spezies. Sie diffundieren leicht durch Membranen und binden hoch spezifisch an das entsprechende Protein im Cytoplasma. Butyrolactone sind sowohl für die Sporulierung und Streptomycin-Produktion in *S. griseus* als auch für die Streptomycin-Resistenz verantwortlich. A-Faktor wird in dem Kulturfiltrat akkumuliert kurz bevor der Stamm mit der Streptomycin-Produktion beginnt. Er bindet an das Rezeptor-Protein (bindendes Protein) und verhindert dadurch die

repressive Wirkung von dem Rezeptor-Protein auf das Gen, das für die Sporulation und Streptomycin-Produktion verantwortlich ist. 120

Im Arbeitskreis von A. ZEECK wurde die als OSMAC-Methode (One-Strain-Many-Compounds) bekannte Verfahrensweise für den Kultivierungs-bedingten Stress angewendet. Diese Methode zielt darauf ab, den Stamm den verschiedenen Stresssituationen auszusetzen durch die veränderten Kultivierungsbedingungen oder den Zusatz von Enzym-Inhibitoren, um so die neue Stoffwechselleistungen im Organismus zu induzieren. ^{21,121,122}

3.5.1 Vorarbeiten

Der Stamm GT 19961033 wurde im HKI Jena in einem 300 L Fermenter bei 200 rpm, 28 °C und 50 L/min Belüftung in Nährmedium SM (Soja-Mannit) kultiviert. Die Kultivierung wurde nach 96 h beendet, das Kulturfiltrat auf Amberlite[®]XAD-Adsorberharz gebracht und mit Methanol eluiert. Das Methanoleluat wurde im Vakuum eingeengt und lyophilisiert. Der

Rückstand wurde in Wasser gelöst und mittels Amberchrom[®]C161CG-Adsorberharz aufgearbeitet. Die Eluierung durch Lösungsmittel-Gradienten: Wasser, Wasser/Methanol 80:20, Wasser/Methanol 60:40, Wasser/Methanol 40:60, Wasser/Methanol 20:80 und anschließend 100% Methanol. Sieben Fraktionen wurden zunächst mit Essigester extrahiert. Nachdem die Fraktion säulenchromatographisch 6 auf

Sephadex LH-20-Säulenmaterial (Methanol) aufgereinigt wurde, wurde das Rohprodukt auf Kieselgel[®] 60- Säulenmaterial aufgetragen (Chloroform und Chloroform/Methanol). Durch mehrfache Rekristallisierung (Wasser/Methanol 1:99), enthielte man 5.0 mg der Verbindung **22** als farblosen Prismen.

3.5.2 Hypothetischer Biosyntheseweg

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Moleküle sollte die Biosynthese des Spirotetrons **22** mit der Biosynthese des Chlorothricins (**57**) oder Abyssomicins C (**64**) verwandt sein. Die Biosynthesewege von Abyssomicin C (**64**) sind bisher nicht aufgeklärt. In Anlehnung an das Kapitel A.3.2 gehört diese Substanzklasse mit dem Tetronsäuren-Motiv zu den Tetrocarcin-verwandten Antibiotika wie Chlorothricin (**57**), synthetisiert von einer iterativen Typ I-Polyketidsynthase. Es wurde erwartet, dass das Kohlenstoffgerüst aus Acetat und

Propionat-Einheiten aufgebaut sein sollte, die Verbrückung der Tetronsäure-Einheit sollte nach analogen Fütterungsexperimenten an dem Chlorothricin (<u>57)</u> aus Glycerin stammen.

Aus bisherigen Überlegungen sollte die Anreicherung von [U-¹³C₃]-Glycerin (<u>70</u>) bei den Kohlenstoffatomen C-7, C-11 und C-12 zu beobachten sein (Abbildung 63).

Abbildung 63: Möglicher Einbau des [U-¹³C₃]Glycerins im Spirotetron <u>22</u>.

Die Startereinheit Phosphoenol-Pyruvat (<u>77</u>) wurde aus dem Biosynthesemodell für Chlorothricin (<u>57</u>) abgeleitet.

<u>22</u>

Ziel der Arbeiten mit dem Stamm 19961033 waren die Untersuchungen des biosynthetischen Ursprungs von Spirotetron <u>22</u>. Für die vorstehenden Biosynthesearbeiten musste die Ausbeute an der Substanz <u>22</u> durch die Optimierung der Kultivierung und Aufarbeitungsmethodik erhöht werden.

3.5.3 Optimierung der Kultivierung

ÓН

Zur notwendigen Erhöhung der Produktion des Spirotetrons <u>22</u> wurde der Stamm GT 19961033 erfolgreich dem OSMAC-Ansatz unterzogen. Es wurde sowohl der Einfluss von Fermentationszusätzen, sowie der Kultivierungsgefäße und damit der Belüftung als auch die

Variation des pH-Wertes untersucht. Die Aufarbeitung der Kulturen wird anschließend in diesem Kapitel besprochen.

• Nährmediumvariation

Zuerst wurde versucht, für den Stamm GT 19961033 über den OSMAC-Ansatz im chemischen Screening ein geeignetes Nährmedium für die Sekundärstoffproduktion zu finden. Man entschied sich, die komplexen Nährmedien wie das Nährmedium S und Nährmedium SM im direkten Vergleich mit dem Haferkleie-Medium einzusetzen. Dazu kamen, anhand der strukturellen Eigenschaften der Verbindung 22, ausgewählte Nährmediumzusätze. Die zu untersuchende Verbindung 22 ist in ihren strukturellen Eigenschaften verwandt mit der Substanzklasse der Abyssomicine, besonders zu dem Abyssomicin C (64). Das Kohlenstoffgerüst enthält eine Tetronateinheit, folglich sollte die Biosynthese der Tetronsäure 66 wie Chlorothricin 57 verwandt sein. Als hypothetische Biosynthesebausteine gelten Acetat, Propionat (und damit Valin) und Glycerin.

Für weitere Vorversuche wurde Haferkleie-Nährmedium mit Zusatz von Valin (300 mg/mL) oder Glycerin (300 mg/mL) genutzt (vgl. Kap. B.5.3.).

Zur Auswertung der Nährmedienvariationen wurde auch die Dünnschichtchromatographie (DC) miteinbezogen. Eine Quantifizierung mit der Referenzsubstanz war nicht möglich, weil keine Farbreaktion mit Anisaldehyd beobachtet werden konnte, nur mit Orcin eine leicht braun anfärbende Zone (Rf-Wert = 0.54) bei stark konzentrierter Auftragung (5 mg/mL). Im Folgenden wurde als Ausweg die HPLC-MS-DAD-Analyse der Kultur- und Zellextrakte angewendet (c = 5 mg/mL). Die UV-Detektion des Spirotetrons 22 verlief nicht optimal, daher wurde nach der bekannten Masse im SIM-Modus (*single ion modus*) (m/z = 395 ([M+H]⁺) und 417 ([M+Na]⁺)) und einer Wellenlänge von 232 nm, 245 nm und 263 nm gesucht. Im negativen Modus konnte die Substanz 22 nicht detektiert werden. Beide positiven Molekülionen konnten in dem Kulturextrakt des Haferkleie-Nährmediums ohne Zusätze sowie Haferkleie-Nährmedium mit Valin-Zusatz bei einer Retentionszeit (R_t) von 12.5 min in Spuren nachgewiesen werden (Abbildung 64). Die Kulturextrakte des Nährmediums S und Nährmediums SM enthielten die Substanz 22 auch in Spuren.

Der Stamm GT 19961033 wurde in den drei oben genannten Nährmedien (SM, S und Haferkleie) unter Zusatz von Valin und Glycin kultiviert. Durch den Zusatz von Valin und Glycerin erhoffte man sich die Biosynthese von <u>22</u> anzuregen.

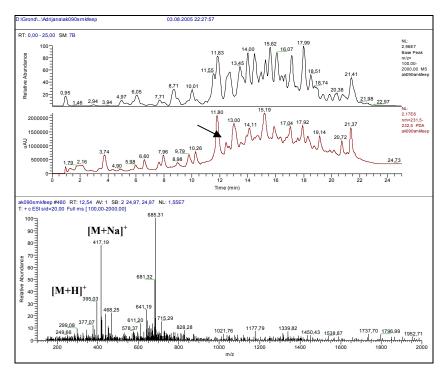


Abbildung 64: In Spuren enthaltene Spirotetron (<u>22</u>) aus Haferkleie-Nährmedium ($\lambda = 263$ nm, $R_t = 12.54$ min).

• Produktionsoptimierung durch Aminosäure-Zugabe

Ein erneuter Kultivierungsversuch in den Schüttelkulturen sollte diese Ergebnisse bestätigen und die Ausbeute an der Substanz <u>22</u> steigern. In dem SM-Nährmedium mit dem Zusatz von Glycerin (500 mg/L) und Spur 11 (Spurenelementenlösung, 2.5 mL/L, vgl. Kap. B.5.3.) wurden Ansätze mit Valin/Glycerin-Gemisch (1:1) und Aminosäuren-Gemisch (AS-Gemisch, B.5.6.4) gemacht. Jedesmal wurde die Substanz produziert (HPLC-MS-DAD). Bei der Kultivierung unter Zusatz der Aminosäure-Mixtur wurde die Produktion an <u>22</u> gesteigert. Ein Versuch, die Substanz durch mehrfache säulenchromatographische Reinigung zu erhalten (Kieselgel[®]60, Chloroform/Methanol 9:1 (CM 9:1), 2.5 × 20.0 cm; anschließend CM 98:2 zu 95:5 1.0 × 20.0 cm) scheiterte. Die Verbindung <u>22</u> konnte nach Chromatographie nicht mehr per HPLC-MS-DAD-Analyse nachgewiesen werden. Das komplexe Nährmedium SM erschwerte die Aufreinigung der Substanz, die durch die Nährmediumkomponenten verdeckt wurde. Eine neue Strategie für die Isolierung der Substanzmenge musste entwickelt werden.

• Variation der Kultivierungsgefäße

Zur Ausbeutesteigerung wurde das Kultivierungsvolumen auf 1.5 L vergrößert und für einen größere Sauerstoffgehalt in der Kultur gesorgt, was durch den Einsatz des

Biostat B-2 Fermenter mit einer Luftzufuhrregulation von 6.0 vvm erfolgen konnte. Der Fermentationsverlauf wurde durch die Kontrolle des pH-Wertes und des Sauerstoffgehaltes verfolgt. Es wurden zwei parallele Ansäzte im Nährmedium S durchgeführt, das weniger komplex ist und kein Soja enthält, um den Fettgehalt der Kulturbrühe zu reduzieren. Zum Nährmedium wurde zusätzlich Spurenelementenlösung Spur 11 gegeben. Das Glycerin war als Nährmedienkomponente im Medium bereits enthalten (vgl. Kap. B.5.3.). Ein Ansatz wurde mit dem Aminosäuren-Gemisch wiederholt, dem zweiten Ansatz gab man Pyruvat (300 mg/mL) zu (vgl. Kap. B.5.6.2.2). Die Kulturbrühe mit den Aminosäuren-Zusatz wies bei Ende der Kultivierung eine schwarze Färbung auf, der pH-Wert stieg bis 7.8-8.0. Die Pyruvat-Beimischung zeigte dagegen eine braune Färbung der Kulturbrühe, der End-pH-Wert betrug 7.1. Im Biostat-B-Fermenter wurde deutlich weniger Biomasse produziert als in der Schüttelkultur. Die HPLC-MS-DAD-Analyse ergab nur in dem "Pyruvat"-Kulturextrakt das Vorhandensein der Substanz 22 in Spuren. Offensichtlich spielte der pH-Wert eine entscheidende Rolle, es musste über die Kultivierungszeit konstant gehalten werden.

• Optimierung des pH-Wertes

Bisher wurde bei verschiedenen Kultivierungsansätzen ein End-pH-Wert von 7.4 bis 7.8 im komplexen Nährmedien (SM und S) und ein End-pH-Wert von 6.8 bis 7.4 im Haferkleie-Nährmedium beobachtet. Eine Produktionssteigerung an Spirotetron 22 wurde in den komplexen Nährmedien erzielt, daher wurde der nächste Kultivierungsansatz in den Nährmedium S (mit Spur 11) im Nährmedium SM (mit Glycerin und Spur 11) gestartet. Um die Hypothese mit dem pH-Wert zu überprüfen, wurde als Puffersystem HEPES-Puffer zugesetzt (300 mg/mL, B.5.6.4), außerdem wurden in verschiedenen Ansätzen Natriumacetat (300 mg/mL), Natriumpropionat (300 mg/mL) und Malonat (300 mg/mL) als unmarkierte Vorläufer ausgewählt sowie das Aminosäure-Gemisch (B.5.6.4). Die Wahl des Kultivierungsgefäßes fiel auf die Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen um eine gute Belüftung der Kultur zu gewährleisten, als auch den Querschüttler (120 spm), da der Biostat B-2 Fermenter nicht wesentlich zur Ausbeutesteigerung beigetragen hat. Nur in dem Nährmedium SM mit dem HEPES-Zusatz konnte eindeutig die gesuchte Masse von 22 gefunden werden (Abbildung 65).

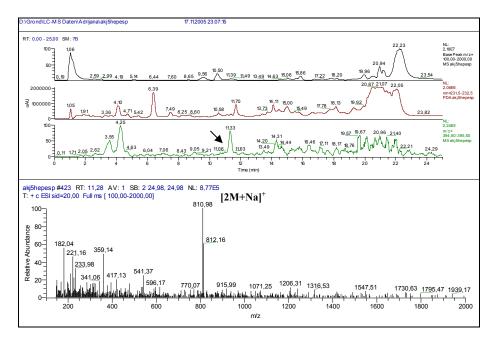


Abbildung 65: Durch HEPES-Puffer konstant gehaltener pH-Wert trug zur besseren Substanzbildung <u>22</u> bei (λ = 263 nm, R_t = 11.33 min).

Die Produktion wurde in wiederholtem Ansatz mit Nährmedium SM und HEPES-Puffer bestätigt, die Problematik der Aufarbeitung wurde hiermit noch nicht gelöst. Im Hinblick auf eine erleichterte Aufarbeitung und Substanzisolierung wurde erneut neben dem bewährten Nährmedium SM auch das Haferkleie-Nährmedium (Glycerin und Spur 11) ausprobiert. Der Anfangs-pH-Wert wurde auf 7.5 eingestellt. Die anschließende LC-MS-Analyse ergab ein positives Ergebnis; die Komponente <u>22</u> sollte unter der Voraussetzung einer Optimierung der Aufarbeitungsstrategie isolierbar sein. Folgende Kultivierungsversuche im 12 L Maßstab auf dem Querschüttler mit Haferkleie-Nährmedium (Glycerin-/Spur 11-Zusatz), verliefen mit zuverlässiger und nachweisbarer Substanzbildung <u>22</u> (HPLC-MS-DAD).

Die besten Ergebnisse wurden in Haferkleie-Nährmedium mit dem Zusatz von Spur 11 und Glycerin erzielt. Die Belüftung der Kulturen sollte in 1 L-Schüttelkolben mit drei Schikanen auf dem Querschüttler (200 spm) mit 150 mL Nährmedium pro Schüttelkolben am besten sein.

Die Optimierung der Kultivierungsparameter ist in der Tabelle 7 zusammenfassend aufgeführt.

Tabelle 7: Veränderung der Kultivierungsbedingungen zur Ausbeutesteigerung

Kultivierungsgefäß/Nährmedium	Nährmedien-Zusatz	Produktion von 100
Schüttelkulturen:		
SGG	Valin und Glycerin 1:1	-
SGG	Spur 11	-
SM	ohne Zusatz	(+)
SM	Spur 11	
SM-Medium mit		+
Spur 11 und Glycerin		
	Natriumacetat	-
	Natriumacetat und Natriumpropionat 1:1	-
	AS-Gemisch	+
	AS-Gemisch ohne Methionin	-
	HEPES	++
	Malonat	-
	Natriumpropionat	-
	Valin und Glycerin 1:1	(+)
Haferkleie	ohne Zusatz	-
	Valin	(+)
	Glycerin	-
Haferkleie	Spur 11 und Glycerin	++
S	ohne Zusatz	(+)
S mit Spur 11		(+)
	Pyruvat-Natriumsalz	-
	Natriumacetat	-
	Natriumacetat und Natriumpropionat 1:1	-
	AS-Gemisch	-
	AS-Gemisch ohne Methionin	-
	HEPES	+
	Malonat	-
	Natriumpropionat	-
Fermenter (1.5 L-Biostat):		
S mit Spur 11	AS-Gemisch	-
	Pyruvat-Natriumsalz	(+)

(+++/++/+ sehr gute/gute/mäßige Produktion, (+) geringe Produktion, - keine Produktion).

3.5.4 Optimierung der Aufarbeitung und Isolierungsstrategie

• Variation des Adsorberharzes

Durch kontinuierliche Überwachung der Chromatographie-Sequenz mittels LC-MS-Analyse ist aufgefallen, dass, obwohl 100 unter gegebenen Bedingungen produziert worden war, offensichtlich große Substanzmengen durch die Aufarbeitungsschritte verloren gingen. Isolierung erfolgte durch die Behandlung des Kulturfiltrates an zwei Adsorberharzen (Amberlite®XAD und Amberchrom®C161CG) und Eluation des Trägermaterials mit Aceton bzw. Methanol. Mit dem Amberchrom®C161CG-Adsorberharz wurde Spirotetron 22 erstmalig HKI Jena isoliert. In eigenen Arbeiten wurde das am Amberlite[®]XAD-Adsorberharz mit Aceton oder Methanol eluiert. das Amberchrom®C161CG-Adsorberharz mit dem Gradientenverlauf Wasser/Methanol von 100 % Wasser auf 100 % Methanol eluiert. Das dünnschichtchromatographische Metabolitenspektrum beider Adsorberharze unterschied sich kaum voneinander. Dennoch adsorbierte Amberchrom®C161CG-Adsorberharz die Substanz 22 besser. Aus direkter Extraktion des Kulturfiltrats mit Essigester resultierte nur einmal ein positives Ergebnis, die Extraktion mit Dichlormethan schien bezüglich der Polarität der Substanz (R_f-Wert = 0.54, CM 91) geeigneter zu sein, brachte aber nicht das gewünschte Ergebnis wie Amberchrom[®]C161CG-Adsorberharz (B.5.6.2.III.a). Folglich wurde das Amberchrom®C161CG-Adsorberharz als die Methode des ersten Aufreinigungsschrittes bestimmt.

• Variation des Säulenmaterials

Auch die Auftrennung an Kieselgel[®] 60 oder Sephadex LH-20 als ersten Reinigungsschritt wurde getestet. Für die Aufreinigung an Kieselgel [®] 60 wurden die Chloroform/Methanol bzw. Dichlormethan/Methanol-Gemische eingesetzt. Die Kontrolle der Fraktionen vor und nach der Trennung wurde mit HPLC-MS-DAD-Analyse durchgeführt und bestätigte den Verlust der Substanz. Ein Einsatz des Sephadex LH-20-Materials (Aceton) erbrachte keine Trennung.

• Optimierung der HPLC-Trennbedingungen

Eine weitere Möglichkeit zur Trennung stellt die Hochdruckflüssigkeitschromatographie dar. Der erste Versuch einer Übertragung der analytisch abgestimmten Bedingungen der HPLC-MS-DAD-Messung (B.5.2.I.A.1.a) auf die präparative Anlage führte aber zu keinem

zufriedenstellenden Ergebnis. <u>22</u> war aus dem Rohextrakt nicht zu trennen. Um Verunreinigungen zu beseitigen, musste noch ein Zwischenschritt in der Aufreinigung entwickelt werden, bevor man die Substanz präparativ mittels HPLC zu trennen vermag. Nach der Gradienten-Eluation mit Wasser/Methanol (von 100 % Wasser auf 100 % Methanol) auf dem Amberchrom[®]C161CG-Adsorberharz (10.0 × 10.0 cm), musste die Substanz auf eine Kieselgel[®]RP-Filtrationssäule gebracht werden. Nach der HPLC-MS-DAD-Untersuchung der Wasser/Methanol-Fraktionen wurde festgestellt, dass das 22 überwiegend in den Fraktionen ab 50 % Methanol enthalten ist.

(Methanolgehalt > 50%) wurden vereinigt, Fraktionen erneute Untersuchung ergab für 22 eine Retentionszeit von 11.6 min (entspricht ca. 50 % Methanol bei dem Programm: von 20 % Methanol (mit 0.1 % Ameisensäure) auf 100 % in 20 min). Anhand dieser Information, wurden die vereinigten Fraktionen Kieselgel®RP-Filtrationssäule aufgetragen $(7.0 \times 15.0 \text{ cm})$ 50:50 und mit einem Wasser/Methanol-Gemisch eluiert (Abbildung 66).

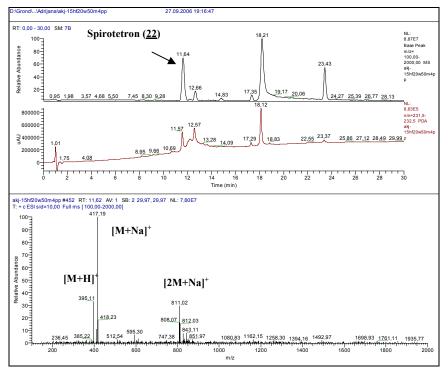


Abbildung 66: HPLC-MS-DAD-Chromatogramm von Extrakt-Fraktionen mit Gehalt an <u>22</u>.

Aufreinigung auf Amberchrom[®]C161CG-Adsorberharz (Fraktion: Wasser/Methanol 20:80), anschließende

Kieselgel[®]RP-Filtrationssäule (50% Methanol) ($\lambda = 263$ nm, $R_t = 11.6$).

Die Auftrennung der vorgereinigten Fraktionen mittels einer Nucleodur C18-Säule (semipräparativ, 8 mm) und Optimierung der Trennbedingungen auf einen isokratischen Lauf führten nicht zu einem optimalem Ergebnis. Die Anwendung eines Phenomenex-Aqua C18-Säulenmaterials sollte zur besseren Trennung im polaren Bereich verhelfen. Ein Gradienten-Programm zeigte sich hierfür geeigneter als isokratische Systeme. Die gewünschte Substanz 22 wurde aber von den anderen Begleitsubstanzen überdeckt, man konnte durch den UV-Abgleich nur vermuten, ob es sich um die Substanz 22 handelt. Die bestehenden HPLC-Anlagen konnten zu keiner weiteren Verbesserung der Arbeitsweise beitragen, daher entschied man sich, die präparative Anlage in dem Arbeitskreis von I. SATTLER am HKI Jena zu nutzen (B.5.2.IV.B.b). Dort stand eine präparative HPLC-MS-DAD-Anlage zur Verfügung, dass die Tennung anhand so Massenspektrometrie erfolgen kann. Die Trennung erfolgte halbautomatisch durch einen Autosampler, extern gesteuert per Trigger. Die Verbindung 22 wies dort eine Retentonszeit von 13.7 min auf. Es wurde nach der Masse von m/z = 395 ([M+H]⁺) gesammelt. Aus einem 12 L-Kultivierungsansatz gewann man 6.9 mg einer mit 22 angereicherten Fraktion. Von diesem Material wurde die Reinheit mittels HPLC-MS-DAD überprüft (s. Abb. 67). Weitere Optimierung stellte die Verkürzung der Aufarbeitungsschritte an dem Amberchrom®C161CG-Adsorberharz dar; die Eluation wurde nur noch mit 100 % Methanol durchgeführt. Der Reinheitsgrad war für Biosynthesestudien zufriedenstellend.

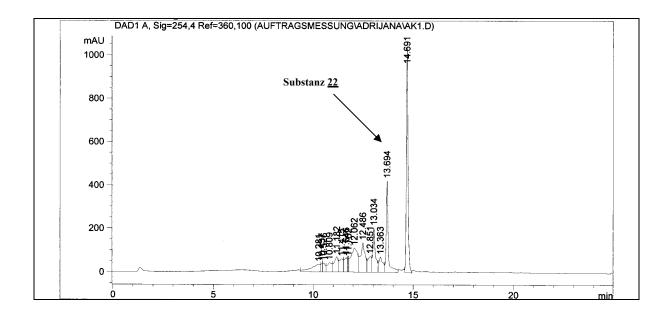


Abbildung 67: HPLC-MS-DAD von Substanz <u>22</u> (λ = 263 nm, Rt = 13.7).

Die beschriebenen Optimierungen der Aufarbeitung des Kulturfiltrats verschiedener Kultivierungsansätze nach erfolgter LC-MS-Untersuchung auf das Spirotetron (<u>22</u>) sind in der Tabelle 8 zusammengefasst. Sie sind die Grundlage für die folgenden Fermentationen.

Tabelle 8: Optimierungsexperimente der Aufarbeitung zur Reindarstellung an den Spirotetron <u>22</u>.

Aufarbeitung	Eluierungs-/Extraktions- Lösungsmittel	100
Amberlite® XAD-2-Adsorberharz	Methanol	+
	Aceton	+
Amberchrom® C161CG-Adsorberharz	WM 100:0	-
	WM 80:20	-
	WM 60:40	(+)
	WM 40:60	+
	WM 20:80	++
	WM 0:100	+++
Extraktion	Essigester	+
Extraktion	Dichlormethan	(+)
Kieselgel [®] RP-Säule	WM 50:50	+++
(nach Amberchrom® C161CG-Adsorberharz; 100 % Methanol)	WM 45:55	+++

(+++/++/+ sehr gute/gute/mäßige Substanzanreicherung, (+) geringe Substanzanreicherung, - keine Substanzanreicherung; WM = Wasser/Methanol).

Mit Amberchrom[®]C161CG-Adsorberharz gelang es aus der Kulturbrühe das Spirotetron <u>22</u> anzureichern. Durch Auftragen auf das Kieselgel[®]RP-Säulenmaterial und Eluierung mit Wasser/Methanol 50:50 wurden die meisten Fette aus dem Rohprodukt entfernt. Das Rohextrakt wurde zuerst mittels präparativer HPLC aufgereinigt und die Fraktion weiterhin säulenchromatographisch getrennt (HPLC 1, Phenomenex-Aqua C18-Säulenmaterial, Programm 8, B.5.6.2.2.b).

3.5.5 Fütterung von [U-¹³C₃]Glycerin

Durch die Optimierung der Kultivierungsbedingungen und Aufarbeitung wurden die Voraussetzungen für Einbauversuche mit markiertem Glycerin erfüllt. Durch eine Fermentationskurve sollte der genaue Zeitpunkt der Sekundärstoffproduktion von <u>22</u> ermittelt werden, um eine gezielte Fütterung und eine möglichst hohe Einbaurate zu gewährleisten.

• Produktionsverlauf

Der Produktionszeitpunkt von <u>22</u> wurde anhand der pH-Wert-Änderung während des Kultivierungszeitraums ermittelt, da dünnschichtchromatographische Detektierbarkeit und zweifelsfreie HPLC-MS-DAD-Analyse aus dem Extrakt der Kulturbrühe von <u>22</u> nicht gegeben war. Dem pH-Verlauf zur Folge, beginnt die Produktion um die 36. Stunde (pH-Wert = 7.2), das Produktionsende wurde ca. bei der 72. Stunde (pH-Wert = 6.8) vermutet (B.5.6.3).

• Fütterungsexperimente mit [U-¹³C₃]Glycerin

Die Fütterung von markiertem [U-¹³C₃]Glycerin (0.5 g/L; 5.5 mmol) fand unter Verwendung des Haferkleie-Nährmediums mit Spur 11 und ohne Glycerin-Zugabe in einem 5 L Kulturansatz statt (B.5.6.4). Der markierte Vorläufer wurde für diesen Zweck mit unmarkiertem Glycerin verdünnt (¹³C₃–Glycerin:Glycerin 1:2) und über einen Zeitraum von 16 h durch das *Pulse-Feeding-Verfahren* der wachsenden Kulturlösung des Stammes GT 19961033, zwischen der 36. und 48. Inkubationsstunde, zugegeben. Nach dem optimierten Aufarbeitungsbedingungen (B.5.6.4, Aufarbeitungsschema 7) wurde das Kulturfiltrat aufgearbeitet (B.5.6.2.2.b), mittels HPLC-MS-DAD-Analyse wurde die Produktion der Substanz <u>22</u> überprüft. Es konnte keine Bildung der Verbindung <u>22</u> festgestellt werden. Eine Mögliche Ursache könnte das Fehlen des Glycerins im Nährmediums sein, dass eine negative Auswirkung auf die Produktion von <u>22</u> ausgeübt hat.

3.6 Weitere Sekundärstoffe aus dem Stamm GT 19961033

Während der Kultivierung unter veränderten Kultivierungsbedingungen nach dem OSMAC-Prinzip wurde die Produktion anderer Metaboliten des Stammes GT 19961033 beobachtet.⁵⁹

Veränderung der Kultivierungsbedingungen:

Der Einfluss einzelner Nährmedienzusätze auf die Sekundärstoffproduktion wurde in den Kapiteln A.3.2 und A.3.5 ausführlich beschrieben. Die Metabolitenproduktion des Stammes GT 19961033 wurde in verschiedenen Nährmedien kontrolliert und bewertet (vgl. Kap.

B.5.3). Während des chemischen Screenings hatte sich gezeigt, dass das mikrobielle Wachstum und die Produktion der Naturstoffe im Hafer-Nährmedium (mit Glycerin-Zugabe), Nährmedium S und Medium S (mit Spur 11-Zugabe) als ausreichend gut für die Sekundärstoffbildung erschien. Der Zusatz von Biosynthesevorläufern zum Kulturmedium wirkte sich auf die Metabolitenvielfalt stark aus. Die Zugabe des Aminosäure-Gemisches mit Methionin, sowie Malonat- und Pyruvat-Zusatz hatte sich in den drei oben genannten Nährmedien als besonders ausbeutesteigernd für die weiteren Verbindungen erwiesen. Die Zugabe von Valin und Glycin führte zu geringeren Ausbeuten, Natriumacetat und Natriumpropionat haben nicht zur erwünschten Produktionssteigerung der Substanzen geführt, die zusätzlichen Verbindungen wurden nur in Spuren produziert.

Es konnten Parallelen zwischen der Biosyntheseleistung des Stammes bei erhöhter und mangelnder Luftzufuhr im Biostat B-Fermenter und in der Schüttelkultur festgestellt werden. Es stellte sich heraus, dass bei mangelnder Belüftung die Sekundärmetaboliten-Produktion merklich zurückgeht.

Einen wesentlichen Parameter in der Kultivierung des Stammes GT 19961033 stellte jedoch die Veränderung des pH-Wertes dar. Durch die Zugabe geeigneter Puffersysteme wie der HEPES-Puffer, wurde der Einfluss eines konstanten pH-Wertes während der Kultivierung untersucht. Ein pH-Bereich am Ende der Fementation von 7.1-7.7 deutete auf eine Ausbeutesteigerung aller dünnschichtchromatographisch detektierbarer Metabolite. Die Einstellung des Anfang-pH-Wertes auf pH = 7.5 hatte sich am besten erwiesen, weiterer Zusatz von den Puffersystemen war nicht notwendig. Der Fermentationsverlauf wurde nach der anfänglichen Einstellung des pH-Wertes verfolgt. Die Ergebnisse der Fermentationsvariationen sind in nachfolgender Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Kultivierung des Stammes GT 19961033 in verschiedenen Nährmedien.

Nährmedium	Nährmedien-Zusatz	Zusätzliche Metabolite
Schüttelkulturen:		
SGG	Valin und Glycerin 1:1	<u>101</u> +, <u>102</u> +, <u>104</u> +
SGG	Spur 11	<u>101</u> +, <u>102</u> +, <u>104</u> +
SM	ohne Zusatz	<u>101(+)</u> , <u>102(</u> +), <u>103(</u> +)
SM-Medium	Spur 11	<u>101</u> +++, <u>102</u> +++, <u>104</u> ++
SM mit Spur 11 und mit		<u>101</u> +++, <u>102</u> +++, <u>104</u> ++
Glycerin		

	Natriumacetat	<u>101</u> +, <u>102</u> +, <u>104</u> +
	Natriumacetat und	<u>101</u> +, <u>102</u> +, <u>104</u> +
	Natriumpropionat 1:1	
	AS-Gemisch	<u>101</u> +++, <u>102</u> ++, <u>104</u> +
	AS-Gemisch ohne Methionin	-
	HEPES	<u>101</u> ++, <u>102</u> ++, <u>104</u> ++
	Malonat	<u>101</u> +++, <u>102</u> +++, <u>104</u> ++
	Natriumpropionat	<u>101(+)</u> , <u>102(+)</u> , <u>104(+)</u>
	Valin und Glycerin 1:1	<u>101</u> +, <u>102</u> +, <u>104</u> +
Haferkleie	ohne Zusatz	<u>101</u> +++, <u>102</u> +++, <u>104</u> ++
	Valin	<u>101(+)</u> , <u>102(+)</u> , <u>104(</u> +)
	Glycerin	<u>101(+)</u> , <u>102(+)</u> , <u>104(+)</u>
Haferkleie	Glycerin und Spur 11	<u>101</u> +++, <u>102</u> +++, <u>104</u> ++
S		<u>101(+)</u> , <u>102(</u> +), <u>104(+)</u>
S mit Spur 11	ohne Zusatz	<u>101</u> +++, <u>102</u> +++, <u>104</u> +++
	Pyruvat-Natriumsalz	<u>101</u> +++, <u>102</u> +++, <u>104</u> +++
	Natriumacetat	<u>101</u> ++, <u>102</u> ++, <u>104</u> ++
	Natriumacetat und Natriumpropionat 1:1	<u>101</u> +, <u>102</u> +, <u>104</u> +
	AS-Gemisch	<u>101</u> +++, <u>102</u> ++, <u>104</u> +
	AS-Gemisch ohne Methionin	-
	HEPES	<u>101</u> +++, <u>102</u> +++, <u>104</u> +++
	Malonat	<u>101</u> +++, <u>102</u> +++, <u>104</u> +++
	Natriumpropionat	<u>101(+)</u> , <u>102(+)</u> , <u>104(+)</u>
<u>Fermenter</u>	I.	<u>I</u>
(1.5 L-Biostat):		
S mit Spur 11	AS-Gemisch	<u>101</u> +++, <u>102</u> +++, <u>104</u> +++,
	Pyruvat-Natriumsalz	<u>107</u> +++ <u>101</u> +++, <u>102</u> +++, <u>104</u> +++

(+++/++ sehr gute/gute/mäßige Produktion, (+) geringe Produktion, - keine Produktion), die Metabolite sind im folgenden Kapitelabsätzen abgebildet.

Variation der Aufarbeitungsmethoden:

Die erfolgreiche Isolierung der Metaboliten aus verschiedenen Kultivierungsansätzen war sehr von der Art der Aufarbeitung abhängig. Die Optimierung der Aufarbeitungsmethodik wurde in dem Kapitel A.3.5 ausführlich beschrieben. Die Sekundärstoffe wurden durch das Aufbringen des Kulturfiltrats auf das Amberchrom[®] C161CG-Adsorberharz (10.0 × 15.0 cm) und Eluation mit Methanol erhalten. Die Extraktion des Kulturfiltrats mit Dichlormethan führte erst zur Verbindung 107 (s. unten). Durch Trennungsgang mit der präparativen HPLC-Anlage (HPLC 1, Säule 11, Programm 8) konnte man die Reinsubstanzen 101 (1.7 mg/L), 102 (1.3 mg/L) und 104 (2.1 mg/L) erhalten. Die Aufreinigung des Kulturfiltrats über ein Amberlite[®] XAD-2 Adsorberharz oder das Extrahieren mit Essigester führte dagegen zu hohen Ausbeuteverlusten.

Analytische Verfahren

Als effektivste analytische Methode zur Auftrennung und Quantifizierung des vorgereinigten Vielkomponentengemischs hat sich die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) erwiesen. Die besten Ergebnisse erreichte man mit "Reversed-Phase"-Bedingungen mit einem Gradientenprogramm aus Methanol-Wasser-Gemischen und der UV-Detektion der Komponenten bei 232 und 245 nm (B.5.2,IV, HPLC 1, Säule 11, Programm 8). Das bei der Untersuchung der Extrakte des Spirotetron-Produzenten sehr hilfreiche Anfärbereagenz Orcin war besonders geeignet und ermöglichte die Detektion der Makrolide 101, 102 und 104 sowie die der Substanz 107 (s. unten).

Spektroskopische Charakterisierung der zusätzlichen Sekundärstoffe

Naphthoquinomycin C (Naphthomycin H) (101)

Naphthoquinomycin C ist ein grüngrauer Feststoff, der mit Orcin dunkelbraun anfärbt (R_f -Wert = 0.71, Kieselgel[®]60, Chloroform/Methanol (CM) 9:1) und UV-Licht der Wellenlänge 232 nm, 245 nm und 263 nm absorbiert. Es wurde nach Adsorbtion an Amberchrom[®] C161CG-Adsorberharz mit einer Mischung von 55:45 Methanol/Wasser als Eluent gewonnen (10.0×15.0 cm) und durch HPLC-DAD-Verfahren in einer Ausbeute von

1.7 mg/L isoliert (B.5.2,IV, HPLC 1, Säule 11, Programm 8, R_t = 17.8 min). Die Identifizierung der Substanz erfolgte durch den Datenabgleich von der gefundene Masse im ESI-MS-Massenspektrum (positive Ionen m/z = 1434 ([2M+Na]⁺) und 728 ([M+Na]⁺); negative Ionen m/z = 704 ([M-H]⁻) für eine Masse von M = 706 g/mol) und UV mit den Einträgen in der AntiBase-Datenbank (Chemical Concepts)¹²³. Die ungerade Masse ließ außerdem auf das Vorhandensein eines Halogenatoms oder eines Stickstoffatoms schließen. Auf eine chlorhaltige Verbindung wies das charakteristische Isotopenmuster im LC-MS-Spektrum. Die Kopplungskonstanten eines Trien-Systems ergaben eindeutig in ¹H-NMR-Spektrum die Konfigurationen von C-2, C-4 und C-12 als Z-konfiguriert $(J_{2,3} = 11.0 \text{ Hz}, J_{4,5} = 11.0 \text{ Hz}, J_{12,13} = 11.0 \text{ Hz})$, C-6, C-16 und C-21 sind dagegen E-konfiguriert ($J_{6,7} = 15.0 \text{ Hz}$, $J_{16,17} = 15.0 \text{ Hz}$, $J_{21,22} = 15.0 \text{ Hz}$). Dem ¹³C-NMR-Spektrum ist die Verknüpfung des amidischen Restes ($\delta_C = 164.6$ ppm für C-1) mit dem 1,4-Benzoquinone bei $\delta_C = 137.5 \text{ ppm}$ (C-29) zugeordnet. In dem ¹H-NMR-Protonenspektrum sind die Resonanzen von sechs Methylgruppen erkennbar. In der Anlehnung an die Strukturen von den bekannten Naphthoquinomycinen 124, konnte das Proton an der Position 2 (C-2) folglich nur einer Doppelbindung zugeordnet werden. Das Dublett bei $\delta_{H} = 5.90 \; ppm$ mit einer Kopplungskonstante von J = 11.0 Hz ist somit als 2-H Proton identifiziert. Die Struktur des literaturbekannten Naphthoquinomycins C (101) (C₃₉H₄₄ClNO₉) wurde hiermit bestätigt (Abbildung 68).

Abbildung 68: Chlorsubstituiertes Ansamycin-Antibiotikum Naphthoquinomycin C (<u>101</u>) aus dem Stamm GT 19961033.

<u>101</u>

¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum wurden in deuteriertem Methanol gemessen und stimmen sehr gut mit der Struktur überein. Die NMR-Daten sind in der Tabelle 9 vergleichend zusammengefasst.

Das Naphthoquinomycin C $\underline{101}$ wirkt als Inhibitor der Fettsäurensynthetase in E.coli (Typ II). 125

Naphthomycin J (102)

Naphthomycin J (102) wurde im hochdruckehromatographischen Verfahren (B.5.2.IV, HPLC 1, Säule 11, Programm 8) bei 232 nm bzw. 245 nm und einer Retentionszeit von 18.7 min neben dem Naphthoquinomycin C (101) detektiert und in einer Ausbeute von 1.3 mg/L isoliert. Es fiel als oranger-farbiger Feststoff an, der dünnschichtchromatographisch mit Orcin anfärbbar ist (R_f-Wert = 0.53, Kieselgel[®]60, CM 9:1). Im EI-Massenspektrum bei m/z = 833.3 detektierte Masse konnte durch HR-EI-MS-Hochauflösung die $C_{44}H_{52}N_2O_{12}S$ zugeordnet werden. Mit der Summenformel wurde eine Suche in AntiBase-Datenbank (Chemical Concepts) und Dictionary of Natural Products (DNP, Chapman & Hall/CNC) 126 durchgeführt. Durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den Literaturwerten¹²⁷ konnte die Reinsubstanz eindeutig als Naphthomycin J 102 (C₄₄H₅₂N₂O₁₂S) identifiziert werden. Die Konfiguration der Doppelbindungen ist identisch mit denen in 101 und konnte analog über Kopplungskonstanten bestätigt werden. Der Austausch des Chloratoms im Naphthoquinomycin C (101) gegen einen N-Acetyl-L-cystein-Rest im Naphthomycin J (102) an Position C-30 ist im ¹H-NMR-Spektrum durch neue Protonenresonanzen deutlich zu belegen. Ein Dublett bei δ_H = 3.24 ppm (32- H_a) und ein breites Multiplett bei δ_H = 3.35 ppm (32-H_b) ist für die Protonen der acetylierten Cysteinseitenkette zu sehen. Die N-Acetylgruppe ist als Singulett bei δ_H = 1.83 ppm zu erkennen. Das Singulett bei δ_H = 4.48 ppm stammt von dem Proton 33-H der Cysteinseitenkette und ist im Spektrum von 101 ebenfalls nicht zu finden (Abbildung 69).

Abbildung 69: Struktur des Thionaphthomycins Naphthomycin J (<u>102</u>) aus dem Stamm GT 19961033.

In der Tabelle 10 wurden die chemischen Verschiebungen der Protonenresonanzen beider Naphthalin-Ansamycin-Antibiotika <u>101</u> und <u>102</u> zum Vergleich aufgelistet.

Tabelle 10: Vergleich der ¹H-NMR-Daten von Naphthoquinomycin C (<u>101</u>) und Naphthomycin J (<u>102</u>) (600 MHz, CD₃OD).

A 4 0	Naphthoquinomycin C (101)	Naphthomycin J (<u>102</u>)	
Atom	δ_{H} [ppm] (Multiplizität)	$\delta_{\rm H} [ppm]/(Multiplizit \ddot{a}t)$	
2-H	5.90 (d)	6.07 (d)	
3-Н	6.98 (t)	6.93 (dd)	
4-H	6.58 (dd)	6.51 (dd)	
5-H	6.26 (t)	6.27 (dd)	
6-H	6.50 (d)	6.47 (dd)	
7-H	5.57 (dd)	5.54 (m)	
8-H	2.31 (m)	2.28 (m)	
8-CH ₃	1.21 (d)	1.17 (s)	
9-H	3.59 (ddd)	-	
10-H _a	2.62 (dd)	2.66 (m)	
10-H _b	3.15 (dd)	3.04 (s)	
12-CH ₃	1.72 (s)	1.69 (s)	
13-H	6.86 (t)	6.66 (dd)	
14-H	2.20 (m)	2.28 (m)	
15-H	4.04 (q)	4.06 (d)	
16-H	5.63 (dd)	5.54 (m)	
17-H	5.47 (m)	5.54 (m)	
18-H	2.20 (m)	2.14 (m)	
18-CH ₃	0.96 (d)	0.94 (s)	
19-H	3.11 (dd)	2.93 (d)	
20-Н	2.70 (m)	2.70 (s _b)	
20-CH ₃	0.82 (d)	0.78 (s)	
21-Н	5.92 (d)	5.87 (dd)	

22-CH ₃	2.03 (s)	2.00 (s)	
26-CH ₃	2.39 (s)	2.32 (s)	
27-Н	7.98 (s)	7.82 (s)	
Substituent am C-30			
NHCOCH ₃	-	1.83 (s)	
32-H _a	-	3.24 (d)	
32-H _b	-	3.35 (m)	
33-Н	-	4.48 (s)	

Addition- bzw. Eliminierungsreaktionen von Thiolen mit Chlornaphthoquinonen sind bereits gut untersucht worden, ¹²⁸ der Prozess findet höchstwahrscheinlich während der Fermentation statt, indem sich *N*-Acetylcysteamin durch Hydrolyse aus schwefelhaltigen Quellen bildet und mit dem bereits entstandenem Naphthoquinomycin (Naphthomycin) eine Reaktion eingeht. Naphthomycin J (<u>102</u>) ist ein Ansa-Kette-Analogon des bekannten Thioansamycins Diastovaricin II (<u>103</u>) (Abbildung 70), das an C-22 eine Ethyl- statt einer Methylgruppe (in <u>102</u>) trägt. ¹²⁹

<u>103</u>

Abbildung 70: Ansamycin-Makrolid Diastovaricin II (<u>103</u>) aus *Streptomyces* sp., ein Stereoisomer von <u>102</u>.

Benzoxazomycin (104)

Das Benzoxazomycin (<u>104</u>) wurde als weisser Feststoff in einer Ausbeute von insgesamt 2.1 mg/L mittels HPLC-Chromatographie bei $R_t = 9.6$ min und einer UV-Absorption bei 232 nm bzw. 245 nm zusammen mit den zwei hier vorgestellten Makroliden <u>101</u> und <u>102</u> isoliert (B.5.2,IV, HPLC 1, Säule 11, Programm 8). In der dünnschichtchromatographischen

Reaktion mit Orcin bei ca. 100 °C entwickelte <u>104</u> eine gelb-braune Färbung (R_f -Wert = 0.65, Kieselgel®60, CM 9:1). Das ESI-Massenspektrum lieferte eine erste Orientierung für die Strukturaufklärung der Verbindung; im positiven Mode wurden die Molekülionen von m/z = 1295.2 ($[2M+Na]^+$) und 659.3 ($[M+Na]^+$) identifiziert, im negativen Mode ergaben sich die Massen: m/z = 1271.2 ($[2M-H]^-$), 681.1 ($[M+CHOO]^-$) und 635.4 ($[M-H]^-$) ([M=633 g/mol). Die *AntiBase*-Datenbankabfrage lieferte nur drei Treffer von denen neben den isolierten und bekannten <u>104</u>, Rifamycine Z (<u>105</u>) und W (<u>106</u>) ebenfalls als mögliche Strukturen vorgeschlagen wurden (Abbildung 71).

$$H_3C$$
 H_3C
 H_3C

Abbildung 71: Rifamycin Z (<u>105</u>) und W (<u>106</u>) als strukturverwandte Verbindungen zu den Naphthoquinomycinen und Naphthomycinen.

Der Verdacht auf Rifamycine (105-106) liegt wegen der Isolierung und Charakterisierung der und 102 nahe. Beide Substanzen gehören Substanz 101 der Gruppe der Naphthoquinon-Ansamycin-Antibiotika und entstehen höchstwahrscheinlich auf dem gleichen Biosyntheseweg. 131,132 Das Vorhandensein eines Naphthoquinon-Chromophors mit drei Doppelbindungen belegen auch die auftretenden Protonensignale in 1 H-NMR-Resonanzspektrum: zwei Multiplets bei δ_{H} = 4.60 ppm (15-H) und δ_{H} = 5.80 ppm (9-H), sowie Dublett von Dublett bei $\delta_{\rm H} = 6.06 \, \rm ppm$ (6-H), $\delta_{\rm H} = 6.47 \, \rm ppm$ (7-H) und $\delta_{\rm H} = 6.32 \; \rm ppm \; (8-H)$. Gegen das Rifamycin spricht die Anzahl von nur drei Methylgruppen wie bei 104, statt sechs wie beim Rifamycin 105 und 106. Die 13C-NMR-Resonanzen bei $\delta = 69.2 \text{ ppm}$ (C-13) und $\delta = 129.9 \text{ ppm}$ (C-22) legen die Anwesenheit von nur zwei statt sechs Hydroxy-substituierter Kohlenstoffatomen nahe. Dem ¹H-NMR-Protonenspektrum zu Folge, befindet sich ein Doppelbindungs-System im Molekül. Chemische Verschiebungen im von $\delta_H = 2.80 \text{ ppm}$ Bereich zeigen für die Alkane typische Multipletts. Das Cyclohexansystem C-31 bis C-36 verbirgt sich im Multiplett bei $\delta_{\rm H}$ = 1.10-2.22 ppm. Die Konnektivität der koppelnden Protonen 2-H bis 6-H konnte dem 1 H- 1 H-COSY-NMR-Spektrum ($^{2,3}J_{\rm H,H}$ -Kopplungen) entnommen werden, ebenso 9-H bis 12-H und die Verknüpfung des 15-H mit 16-H (Abbildung 72).

 $^{2,3}J_{\rm H.H}$ -COSY-Korrelationen

Abbildung 72: ¹H-¹H-COSY-Experiment von Benzoxazomycin (<u>104</u>).

Die beiden amidischen Kohlenstoffatome, C-1 des Pyrrolidinonringes (δ_C = 170.1 ppm) und C-30 des Cyclohexancarbonyl-Aminosäureesters (δ_C = 172.9 ppm) sind im 13 C-NMR-Spektrum zu sehen. Das Signal des Esterkohlenstoffatoms C-27 ist im 13 C-NMR-Experiment bei einer chemischen Verschiebung von δ_C = 171.4 ppm zu erkennen. Damit wurde die Struktur dem Benzoxazomycin <u>104</u> ($C_{36}H_{48}N_2O_8$) eindeutig zugeordnet (Abbildung 73). 133

104

Abbildung 73: Benzoxazomycin <u>104</u> aus dem Stamm GT 19961033, die literaturbekannte Verbindung aus der Familie der Ansamycin-Antibiotika.

Benzoxazomycin (<u>104</u>) gehört einer Untergruppe der Familie der Ansamycin-Antibiotika an. Es inhibiert einige menschliche Tumorzelllinien *in vitro* (Brust-, Lungen-, Ovarien- und Magen-Krebszelllinien). Seine Biosynthese verläuft analog zur Biosynthese des verwandten Rifamycins (<u>105-106</u>), dessen Biosynthesegencluster bereits aufgeklärt wurde.

Dipeptid Prolin-Valin (107)

Die Substanz 107 wurde als weißer Feststoff durch die chromatographische Aufreinigung mittels Sephadex LH-20 (Aceton, 3.0 × 150 cm) in einer Ausbeute von 4.6 mg/L isoliert. Es färbt mit Orcin braun an (R_f-Wert 0.39, Kieselgel[®]60, CM 6:1) und wurde bei UV-Licht der Wellenlänge 232 nm bzw. 245 nm detektiert. Das ESI-Massenspektrum ergab als Molmasse im positiven Mode m/z = 429.5 ($[2M+H]^+$) (M = 214.29 g/mol). Die NMR-Spektren zeigten das Vorhandensein von zwei Methyl-, drei Methylen- und drei Methingruppen sowie von zwei quartären, drei tertiären, drei sekundären und zwei primären Kohlenstoffatomen. Das 13 C-NMR-Spektrum lässt zwei carbonylische C-Atome bei δ_{C} = 164.85 ppm und eine $\delta_{\rm C} = 169.9 \text{ ppm}$ erkennen. Die chemische Verschiebung der **Dubletts** im ¹H-NMR-Protonenspektrum $(\delta_{\rm H} = 0.88 \text{ ppm})$ und $\delta_{\rm H} = 1.05 \text{ ppm}$ einer mit Kopplungskonstante von J = 7.0 Hz sind charakteristisch für eine iso-Propylgruppe und wurden den Protonen der zwei Methylgruppen 11-H₃ und 12-H₃ zugeordnet. Das koppelnde 10-H wurde anhand ${}^{1}\text{H}$ -COSY-Korrelationen als Multiplett bei δ_{H} = 2.61 ppm und einer Kopplungskonstante von $J = 7.0 \,\mathrm{Hz}$ ermittelt. Im $^{1}\mathrm{H}\text{-}^{1}\mathrm{H}\text{-}\mathrm{COSY}\text{-}\mathrm{Experiment}$ sind die Konnektivitäten der Protonen des Pyrrolidinringes 5-H bis 8-H bestimmt worden. Das Proton 2-H mit einer chemischen Verschiebung bei $\delta_{\rm H} = 3.92 \ \rm ppm$ koppelt im ¹H-¹H-COSY-Spektrum mit 10-H. Die Verknüpfung der Fragmente wurde durch die HMBC-Korrelationen ($^{2,3}J_{\text{C.H}}$ -Konnektivitäten) ermittelt. Das amidische Kohlenstoffatom C-4 bei $\delta_C = 169.9$ ppm und das carboxylische Kohlenstoffatom C-1 ($\delta_C = 164.85$ ppm) zeigen Kreuzsignale mit demselben Proton 2-H. Die Konnektivität des tertiären Kohlenstoffatoms C-2 bei $\delta_C = 60.3$ ppm mit dem 10-H konnte im HMBC-Spektrum gefunden werden. Daher konnte man davon ausgehen, dass C-2 die Verbindung für die Fragmente iso-Propylgruppe, Pyrrolydincarbonylrest und Carboxylgruppe ist (Abbildung 74).

Abbildung 74: ¹H-¹H-COSY- und HMBC-Korrelationen der Verbindung <u>107</u>.

Das primäre Kohlenstoffatom C-11 einer der Methylgruppen des *iso*-Propylrestes koppelt mit dem 10-H. Anhand der starken chemischen Verschiebung im Tieffeldbereich des 1 H-NMR-Spektrums des Protons bei δ_{H} = 4.06 ppm wurde angenommen, dass dieses sich an einem Kohlenstoffatom zwischen Stickstoff und Carbonylgruppe befinden muss. Das Dublett von Dublett wurde daher dem 5-H Proton zugeordnet. Hierdurch wurde die Struktur von <u>107</u> ($C_{10}H_{18}N_{2}O_{3}$) eindeutig bewiesen (Abbildung 75).

Abbildung 75: Das Dipeptid Prolin-Valin (107).

3.7 Zusammenfassung und Diskussion

Aus dem Arbeitskreis I. SATTLER aus dem HKI Jena wurde der Produzentenstamm GT19961033 des neuen Spirotetrons $\underline{22}$ für die vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Das Spirotetron $\underline{22}$ ähnelt in seinen Strukturmerkmalen der Verbindungsgruppe der Abyssomicine ($\underline{63}$ - $\underline{65}$), die auch eine Tetronsäure- und eine Oxabicyclo[2.2.2]octaneinheit sowie ein α,β -ungesättigtes Keton enthalten.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die Produktion des Stammes GT 19961033 zu optimieren und eine zum Erfolg führende Isolierungsstrategie für das Spirotetron <u>22</u> für kleine Fermentationen zu entwickeln, da nur Kultivierungen in kleinem Maßstab (0.1-5 L) für Biosynthese-Untersuchungen angemessen sind.

- 1. Für die Biosynthese-Untersuchungen sind folgende Fermenterbedingungen des Stammes GT 19961033 am effektivsten: die Stammhaltung erfolgt mittels Glycerin-Einlagerung bei -20 °C oder auf SM-Agar. Die Vorkultur wird mit 1.5 mL der Glycerin-Einlagerung oder mit 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft. Für die Vorkultur werden Schüttelkulturen mit Erlenmeyerkolben (1 L mit drei Schikanen) eingesetzt, befüllt mit Haferkleie-Nährmedium mit Glycerin- (500 mg/L) und Spurenelementelösung Spur 11-Zusatz (2.5 mL/L). Der Anfangs-pH-Wert wird vor der Sterilisation auf 7.5 eingestellt, und es wird auf dem Querschüttler mit 200 spm, 28 °C, 48 h kultiviert. Die Hauptkultur wird jedenfalls in 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen durchgeführt, in Haferkleie-Nährmedium mit Glycerin-Zusatz (500 mg/L) und Spurenelementelösung Spur 11 (2.5 mL/L). Der Anfangs-pH-Wert wird auf 7.5 eingestellt. Kultivierung erfolgt auf dem Querschüttler bei 200 spm, 28 °C, 96 h.
- 2. Für Reinstoffherstellung wurde als effektivste analytische und auch präparative Methode eine gekoppelte HPLC-MS-DAD-Anlage bestimmt. Somit konnte man die gewünschte Verbindung 22 unmittelbar aus dem vorgereinigten Rohextrakt durch Massenspurverfolgung gewinnen.
- 3. Die Fütterungsexperimente mit [U-¹³C₃]Glycerin wurden im Haferkleie-Nährmedium mit Spur 11 und ohne Glycerin-Zusatz unter optimierten Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Im ersten Fütterungsversuch wurde die Substanz <u>22</u> nicht gebildet. Als mögliche Ursache wurde das fehlende Glycerin in dem Nährmedium betrachtet. Ein weiteres Fütterungsexperiment, in dem Glycerin als Nährmedienbestandteil enthalten

war und wo zusätzlich unmarkiertes Glycerin zugefüttert wurde, hat die Produktion des <u>22</u> bestätigt.

- 4. Es ist mit dem Stamm GT 19961033 bisher nur möglich, aus 5 L-Kulturen verlässliche Mengen an Spirotetron <u>22</u> zu isolieren (6.9 mg). Die Ausbeute für die Fütterungsexperimente im 1 L-Maßstab ist zu gering. Die biosynthetischen Studien müssen daher in 5 L-Kultivierungsansatz erfolgen, damit ausreichende Substanzmenge an <u>22</u> produziert wird.
- 5. Während der Arbeiten zur Produktionsoptimierung des Stammes GT 19961033 wurde das Metabolitenspektrum bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen verfolgt. Dadurch konnten drei bekannte Verbindungen Naphthoquinomycin C (Naphthomycin H) (101), Naphthomycin J (102) und Benzoxazomycin (104) sowie ein Dipeptid Prolin-Valin (107) isoliert und identifiziert werden. Die Biosynthese der Makrolide ist der von den Rifamycinen ähnlich.

4. Derivatisierung eines ausgewählten Naturstoffes

4.1 Chartreusin als potentes Antitumor-Antibiotikum

Chartreusin (23) ist ein aromatisches Polyketid-Glykosid, das erstmals 1953 als grünlich gelber, kristalliner Naturstoff aus *Streptomyces chartreusis* und einem weiteren Streptomyceten beschrieben wurde. ¹³⁵ Ursprünglich erweckte es Interesse aufgrund seiner *in vitro*-Aktivität gegen *Mycobacterium tuberculosis*, andere Gram-positive Bakterien sowie Bakteriophagen. Weitere Studien zeigten eine signifikante antiproliferative Aktivität auf Tumorzelllinien wie z. B. Leukämie-Zellen vom Typ L1210 und P388 (IC₅₀ 0.76 μg/mL, Maus, i.v.: LD₅₀ = 250 mg/kg) und B16 Melanom Zellen (LD₅₀ 160 mg/kg s.c. und p.o.). ¹³⁶ Das ebenfalls von Streptomyceten produzierte Chartreusin-Derivat Elsamicin A¹³⁷ (108) (Abbildung 76) unterscheidet sich von 23 vor allem durch das Vorliegen eines Aminozuckers, der die Wasserlöslichkeit der Substanz und Wirksamkeit *in vivo* positiv beeinflusst. ¹³⁸

Abbildung 76: Strukturen der potenten Antitumor-Antibiotika Chartreusin (<u>23</u>) und Elsamicin A (<u>108</u>).

Die Antitumor-Aktivität dieser Coumarin-verwandten Verbindungen steht im Zusammenhang mit der Hemmung der Synthese von RNA und der Inhibierung der Bildung verschiedener DNA-Proteinkomplexe. Durch die Erkennung und Bindung der Antibiotika 23 und 108 an Transkriptionsfaktoren wird die Transkription von DNA zu RNA unterbrochen. Weiterhin induziert Chartreusin (23) zusammen mit Reduktionsmitteln und molekularem Sauerstoff Doppelstrangbrüche in der DNA, indem es die Bildung von freien Radikalen katalysiert: Das Superoxid-Radikal leitet die Entstehung eines Hydroxy-Radikals ein, das schließlich die DNA spaltet. Coumarin-Verbindungen wie Chartreusin (23) und Elsamicin A (108) sind zudem

bekannte DNA-Topoisomerase I Hemmer. 140 DNA-Topoisomerase I verändert die Topologie von DNA-Molekülen, indem sie die mehrfach gewundene DNA-Superhelix entdrillt und hierdurch Replikation und Transkription der DNA erst ermöglicht. Die DNA interkaliert allgemein mit Naturstoffen, wenn diese DNA-Bindungsdomänen einen Chromophor mit einem glykosidischen Rest oder einen Peptidrest enthalten. 141 Beide funktionellen Bereiche DNA-Erkennungselemente und erklären die selektive Bindung Chartreusin (23) an die DNA, die zur Bildung eines Chartreusin-DNA-Komplexes führt und als Ursache für die Antitumor-Aktivität angenommen wird. 142 Thermodynamische Messungen der Freien Bindungsenthalpie haben einen genauen Einblick in den Bindungsmechanismus gewährt. Die Analyse der multivalenten Bindungen innerhalb des Komplexes zeigte, dass der hydrophobe Transfer des Chartreusin-Aglykons aus der Lösung zur DNA-Bindungsdomäne hauptsächlich für die Erzeugung von Freier Bindungsenthalpie verantwortlich ist. Chartreusin (23) bindet bevorzugt an die Regionen, die benachbarte Guanin- und Cytosin-Basenpaare enthalten (CGC-Traktat). Der genaue Sequenzablauf stellt vermutlich eine Pyrimidin-Purin Abfolge in kleinen Furchen dar (als CpG bezeichnet) (Abbildung 77). 143

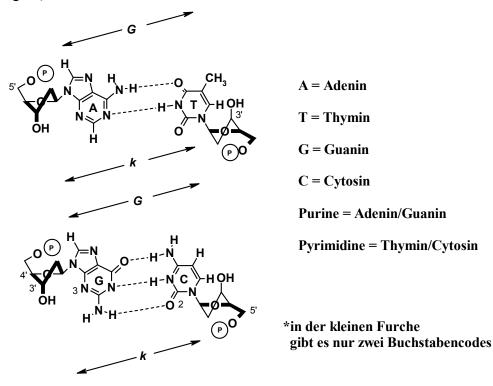


Abbildung 77: Schematische Darstellung der kleinen Furche von DNA: *G* repräsentiert die große Furche, *k* steht hier für die kleine Furche. ¹⁴⁴

Trotz seiner starken Aktivität ist Chartreusin (23) für den klinischen Einsatz eher ungeeignet, da seine Wasserunlöslichkeit ungünstig für seine pharmakokinetischen Eigenschaften ist (15 μg/mL Wasser)¹⁴⁵. Bei intravenöser Verabreichung kommt es zur schnellen biliären Ausscheidung, die Eliminierung führt zu einem Konzentrationsabfall unter die effektive Dosis und die eigentliche Wirkung des Chartreusins (23) wird nicht beobachtet. Bei oraler Einnahme verläuft die gastrointestinale Resorption zu langsam, auch subkutan wurde keine positive antitumorale Aktivität bemerkt. Einzig bei der peritonealen Verabreichung (im Bauchfell) wurde ein positives Ergebnis berichtet. Durch den im Bauchfell gebildeten Niederschlag wurde ein verlängerter Kontakt des Cytostatikums mit den Krebszellen gewährleistet und somit die wirksame Dosis erreicht.

Bei genauerer Betrachtung der Strukturmerkmale beider Moleküle ist auffällig, dass das Elsamicin A (108), im Gegensatz zu Chartreusin (23), eine aminoglykosidische Zuckereinheit besitzt und damit verbesserte Wasserlöslichkeit aufweist. Dabei ist die Präsenz der Aminogruppe entscheidend für die Interaktion von Elsamicin A mit der DNA. Der Zuckerrest tritt in Wechselwirkung der Position von Guanin, und der GC-Basenpaar-Zucker-Komplex bildet den stabilsten Komplex bei der Inhibition von DNAse. Die Formierung der multivalenten Bindungen trägt zur Stabilität der DNA-Komplexe bei (exo-Aminogruppe des Guanins₁₆ und Phosphatgruppe des Cytosins₅–Guanins₆ in kleiner Furche). Außerdem ist der Chromophor mehr in die DNA eingebunden, wenn die vierte Base tatsächlich Guanin und nicht Adenin ist (Abbildung 78). ¹⁴⁶

Abbildung 78: Schematischer Ausschnitt des Elsamicin A-d(GATGCGATAC)-Komplexes als Model für die Interkalation mit DNA.

Diese multivalenten Bindungen erlauben nicht nur die Bestimmung der spezifischen Sequenzregionen längerer DNAs, sondern können auch bestimmte Abläufe moderieren, wie z.B. die DNA-Spaltung durch Topoisomerase II. Diese Erkenntnis wiederum kann im rationalen Drug Design eingesetzt werden. Die Saccarid-Einheiten tragen zur Stabilität des DNA-Antibiotika-Komplexes durch ihre Bindungsaffinität bei, sind aber nicht in die DNA-Strang-Schädigung involviert.

Der Nachteil von aminoglykosidischen Verbindungen als Antibiotika ist der Verlust ihrer biologischen Aktivität bei resistenten Stämmen durch eine so genannte "switch"-Funktion (Abbildung 79). Die Aminogruppe wird dabei enzymatisch acetyliert. Dies hat zu Folge, dass nicht nur die Bindung des Zuckerrestes an die DNA gestört wird, sondern auch die Interkalation sterisch gehindert ist. In diesem Fall ist das Aglykon Chartrarin (109) wirksamer als das acetylierte Elsamicin A (108), ansonsten verläuft die Inhibitionsstärke von DNAse folgend: Elsamicin A (108) > Chartreusin (23) > Chartarin (109).

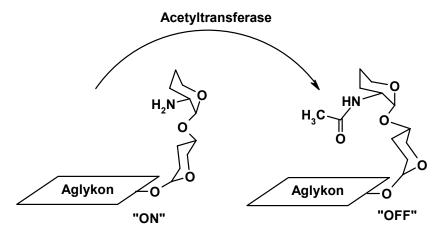


Abbildung 79: Schematische Darstellung für die "Switch"-Funktion von den Aminozuckern.

Die selektive DNA-Spaltung durch die Interkalation der Antibiotika <u>23</u> und <u>108</u> mit dem 3'-Ende der Guanin-2-desoxyribose wurde durch 3'-markierte DNA und anschließende Nukleotid-Sequenzanalyse nachgewiesen. Multivalente Bindungen zwischen DNA und Antibiotika <u>23</u> und <u>108</u> wurden durch thermodynamische Berechnungen und molekulardynamische Modelle charakterisiert. Dennoch würde für eine vollständige Analyse der DNA Bindungsstelle und der spezifischen Bindungen zwischen DNA-Basenpaaren und Disaccharid-Einheiten der Antibiotika eine Kristallstruktur des DNA-Antibiotika-Komplexes benötigt. Die schlechte Löslichkeit des Chartreusins (<u>23</u>) in Wasser und in organischen Lösemitteln wurde versucht durch Derivatisierung des Naturstoffs zu umgehen.

4.2 Bekannte Derivatisierungen von Chartreusin (23) und Analoga

Das Antibiotikum Chartreusin (23) wurde 1953 von B. E. LEACH als grünlich-gelber kristalliner Naturstoff aus dem Kulturfiltrat des Streptomyces chartreusis gewonnen. 147 Anhand der Elementaranalyse und der Molmasse ermittelte man die empirische Formel C₁₈H₁₈O₈ · H₂O. Die ultraviolett und infrarot Analyse der Kristalle deutete auf ein substituiertes 1,2-Naphthoquinon. Die Strukturelemente des Chartreusins (23) wurden zunächst durch den chemischen Abbau und durch saure Hydrolyse von STERNBACH 1958 postuliert. 148 Resultierende Fragmente waren ein wasserunlöslicher, gelber Aglykonkörper C₁₉H₁₀O₆ und zwei Zuckerbausteine, Fucose und Digitalose (an C-3' methylierte Fucose). Die präparative Trennung beider Zucker aus dem Zuckergemisch nach der sauren Hydrolyse gelang durch Derivatisierung zum Osazon der D-Digitalose. Außerdem stellte man das D-Fucose-Diphenylhydrazon und das D-Fucose-Dibenzylmercaptal her. Die Strukturen der Zuckereinheiten wurden anhand UV-Absorptionsspektren und von gemessenen Schmelzpunkten dieser Derivate identifiziert. Durch den Vergleich von optischen Drehwerten der Diethylmercaptal-Derivate von gewonnener D-Fucose und käuflicher L-Fucose wurde die D-Fucose ermittelt. Die *D*-Digitalose wurde durch die Degradation ihres Diethlymercaptal-Derivates mit Quecksilberacetal und anschließender Oxidation zum *D*-Digitalonolakton erhalten.

1964 wurden Anordnung und Art der Verknüpfung beider Zucker von W. EISENHUTH¹⁴⁹ aufgeklärt. Anschließend an die Periodat-Spaltung folgte eine Umsetzung der Zucker mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung zum Methylglyoxal-2,4-dinitrophenyl-dihydrazon. Durch Anwendung der Isorotationsregel wurde gezeigt, dass Fucose in pyranosider Form vorliegt und an C-2 *O*-glykosidisch mit Digitalose verknüpft ist. Dieser Befund stand im Einklang mit dem als Diacetat kristallin erhaltenen 3',4'-*O*-Isopropyliden-Chartreusin (<u>110</u>) (Abbildung 80).

110

Abbildung 80: 3',4'-O-Isopropyliden-Acetalisierung (110) der D-Fucose.

Die Ableitung der Stereokonfiguration der Digitalose an C-1 konnte mit Hilfe der Isorotationsregeln nur vermutet werden, da diese nach der Hydrolyse nicht mehr nachweisbar war. Es wurde postuliert, dass Digitalose wahrscheinlich in α -Konfiguration vorliegt.

4.2.1 Modifikationen der Zuckereinheiten

Allgemeines

Im Streben nach neuen, verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften, wie die bessere Löslichkeit in Wasser oder organischen Lösungsmitteln, wurden verschiedene Versuche unternommen, Chartreusin (23) -ähnliche synthetische oder semisynthetische Derivate zu entwickeln. Dabei bietet sich der semisynthetische Ansatz an. Man geht von dem fermentativ gewonnenen Naturstoff (23) aus. Die chemische Derivatisierung geht von der Überlegung aus, dass ein Naturstoff kein statisches Endprodukt eines Stoffwechselprozesses ist, sondern das Zwischenprodukt eines dynamischen Ablaufs darstellt. Daher unterliegt die isolierte Molekülform der ständigen Weiterentwicklung und wird durch geeignete und zum Teil marginale Strukturmodifikationen in ein Derivat überführt, das seine biologische Wirkung bzw. pharmakologischen Eigenschaften beibehält. Es wurde die neue, Chartreusin-ähnliche Verbindungsklasse der Chrymutasine (111a-111c) aus der Mutante des Chartreusin-Produzenten Streptomyces chartreusis D329 isoliert. 150 Das Aglykon ist dem Chartreusin-Aglykon strukturverwandt, die Hydroxygruppe am C-6 ist lediglich durch eine Aminogruppe ersetzt. Die Zuckerreste sind in verschiedenen Derivaten zu Di- oder sogar Trisacchariden verändert worden (Abbildung 81). 151

Abbildung 81: Strukturanaloga von Chartreusin (<u>23</u>) und Chrymutasin A (<u>111a</u>).

Veränderte Zuckereinheiten hatten leider nicht zur besseren Löslichkeit in vielen organischen Lösungsmitteln und im Wasser beigetragen, Chrymutasin A (111a) zeigte jedoch die stärkste Zytotoxizität *in vivo*.

Der Versuch, die Disaccharideinheit durch die Monosaccharideinheiten wie β -D-Fucose oder α -D-Glucose in synthetischen Derivaten zu ersetzen und dadurch die Antitumor-Aktivität zu

verbessern, gelang nicht. ¹⁵² Keines der gewonnenen Derivate wies eine deutlich höhere Wasserlöslichkeit, Zytotoxizität oder sogar *in vivo* antitumorale Aktivität in direktem Vergleich mit Chartreusin (23) auf. In der Erwartung, mehr über die Struktur-Aktivitäts-Beziehung von Chartreusin-Derivaten zu erfahren, wurden verschiedene Versuche gestartet, die Hydroxylgruppen der Zucker chemisch zu verändern.

Aus der Acetylierung mit Benzaldehyd resultierte ein Gemisch von endo-/exo-Benzylidenchartreusin (<u>115</u>), wobei die endo-Form thermodynamisch bevorzugt gebildet wurde (Abbildung 82).¹⁵³

Abbildung 82: Endo/Exo-Isomere des 3',4'-O-Benzylidenchartreusins (115).

Die bessere Löslichkeit in unpolaren, organischen Lösungsmitteln (Chloroform, Pyridin) wurde hiermit erzielt. Weitere synthetische Umsätze mit aliphatischen und aromatischen Acetalen wurden dadurch erst ermöglicht.

Das gebildete Isomer 3',4'-O-exo-Benzylidenchartreusin (A-132) (<u>115b</u>) wurde als die potenteste Verbindung gegen B16 Tumor-Zelllinien eingestuft. Dabei wurde <u>115b</u> nicht im Gewebe oder Plasma verstoffwechselt, folglich agierte <u>115b</u> nicht als Chartreusin-Prodrug.

4.2.2 Modifikationen am Aglykon in C-6 Position

Um die Struktur-Wirkungs-Beziehung der Chartreusin-Derivate zu untersuchen, wurde die Hydroxygruppe des Chartreusin-Aglykons <u>109</u> in verschiedenen Versuchen modifiziert. Die Einführung lipophiler und hydrophiler Substituenten in der Arbeitsgruppe von K. KON am C-6 führte zu höherer Aktivität im Vergleich zu <u>23</u> gegen P388 Leukämie-Tumorzellen (Abbildung 83).

Derivate Derivate 110 CH₃ CH₃ 125 COCH₂CH(CH₃)₂ 115a H Phenyl 126 COCH₂CH₂COCH₃ 115b Phenyl H 127 COCH₂CCCCCH₃ 116 H CH₃ 128 COCH₂CH₂OCH₂CH₃ 117 H CH₂CH₃ 129 COCH(CH₃)CH₂NHCOCF₃ 118 H (CH₂)₂CH₃ 130 CO(CH₂)γNHCOCF₃ 119 H (CH₂)₃CH₃ 131 COCH₂N(CH₃)₂ · HCl 120 H (CH₂)₃CH₃ 132 COCH₂CH₂NHCH₃ · HCl 121 H (CH₂)₅CH₃ 133 COCH₂CH₂-pyrrolidino · HCl 122 CH₃ CH₂CH₃ 134 CO-2-Furyl 123 CH₂CH₃ CH₂CH₃ 135 CO-N-Methyl-2-pyrrolyl 124 -(CH₂)₅- 136 CO-3-Indolyl 137 COCH₂CH₃ 137 COCH₂CH₃	<u>23</u>	X_a	X_{b}	<u>115</u>	R
115a H Phenyl 126 COCH₂CH₂COCH₃ 115b Phenyl H 127 COCH₂COCCH₃ 116 H CH₃ 128 COCH₂CH₂OCH₂CH₃ 117 H CH₂CH₃ 129 COCH(CH₃)CH₂NHCOCF₃ 118 H (CH₂)₂CH₃ 130 CO(CH₂)γNHCOCF₃ 119 H (CH₂)₃CH₃ 131 COCH₂N(CH₃)₂ · HCl 120 H (CH₂)₄CH₃ 132 COCH₂CH₂NHCH₃ · HCl 121 H (CH₂)₅CH₃ 133 COCH₂CH₂-pyrrolidino · HCl 122 CH₃ CH₂CH₃ 134 CO-2-Furyl 123 CH₂CH₃ CH₂CH₃ 135 CO-N-Methyl-2-pyrrolyl 123 CH₂CH₃ CH₂CH₃ 136 CO-3-Indolyl	Derivate	Λ_{a}	$\Lambda_{\mathfrak{h}}$	<u>Derivate</u>	K
115b Phenyl H 127 COCH₂OCOCH₃ 116 H CH₃ 128 COCH₂CH₂OCH₂CH₃ 117 H CH₂CH₃ 129 COCH(CH₃)CH₂NHCOCF₃ 118 H (CH₂)₂CH₃ 130 CO(CH₂)γNHCOCF₃ 119 H (CH₂)₃CH₃ 131 COCH₂N(CH₃)₂⋅HCl 120 H (CH₂)₄CH₃ 132 COCH₂CH₂NHCH₃⋅HCl 121 H (CH₂)₅CH₃ 133 COCH₂CH₂-pyrrolidino⋅HCl 122 CH₃ CH₂CH₃ 134 CO-2-Furyl 123 CH₂CH₃ CH₂CH₃ 135 CO-N-Methyl-2-pyrrolyl 124 -(CH₂)₅- 136 CO-3-Indolyl	<u>110</u>	CH ₃	CH ₃	<u>125</u>	COCH ₂ CH(CH ₃) ₂
116 H CH₃ 128 COCH₂CH₂OCH₂CH₃ 117 H CH₂CH₃ 129 COCH(CH₃)CH₂NHCOCF₃ 118 H (CH₂)₂CH₃ 130 CO(CH₂)γNHCOCF₃ 119 H (CH₂)₃CH₃ 131 COCH₂N(CH₃)₂⋅HCl 120 H (CH₂)₄CH₃ 132 COCH₂CH₂NHCH₃⋅HCl 121 H (CH₂)₅CH₃ 133 COCH₂CH₂-pyrrolidino ⋅HCl 122 CH₃ CH₂CH₃ 134 CO-2-Furyl 123 CH₂CH₃ CH₂CH₃ 135 CO-N-Methyl-2-pyrrolyl 124 -(CH₂)₅- 136 CO-3-Indolyl	<u>115a</u>	Н	Phenyl	<u>126</u>	COCH ₂ CH ₂ COCH ₃
117 H CH₂CH₃ 129 COCH(CH₃)CH₂NHCOCF₃ 118 H (CH₂)₂CH₃ 130 CO(CH₂)γNHCOCF₃ 119 H (CH₂)₃CH₃ 131 COCH₂N(CH₃)₂ · HCl 120 H (CH₂)₄CH₃ 132 COCH₂CH₂NHCH₃ · HCl 121 H (CH₂)₅CH₃ 133 COCH₂CH₂-pyrrolidino · HCl 122 CH₃ CH₂CH₃ 134 CO-2-Furyl 123 CH₂CH₃ CH₂CH₃ 135 CO-N-Methyl-2-pyrrolyl 124 -(CH₂)₅- 136 CO-3-Indolyl	<u>115b</u>	Phenyl	Н	<u>127</u>	COCH ₂ OCOCH ₃
118 H (CH₂)₂CH₃ 130 CO(CH₂)γNHCOCF₃ 119 H (CH₂)₃CH₃ 131 COCH₂N(CH₃)₂ · HCl 120 H (CH₂)₄CH₃ 132 COCH₂CH₂NHCH₃ · HCl 121 H (CH₂)₅CH₃ 133 COCH₂CH₂-pyrrolidino · HCl 122 CH₃ CH₂CH₃ 134 CO-2-Furyl 123 CH₂CH₃ CH₂CH₃ 135 CO-N-Methyl-2-pyrrolyl 124 -(CH₂)₅- 136 CO-3-Indolyl	<u>116</u>	Н	CH_3	<u>128</u>	COCH ₂ CH ₂ OCH ₂ CH ₃
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	<u>117</u>	Н	CH ₂ CH ₃	<u>129</u>	COCH(CH ₃)CH ₂ NHCOCF ₃
120 H $(CH_2)_4CH_3$ 132 $COCH_2CH_2NHCH_3 \cdot HCl$ 121 H $(CH_2)_5CH_3$ 133 $COCH_2CH_2$ -pyrrolidino ·HCl 122 CH_3 CH_2CH_3 134 $CO-2$ -Furyl 123 CH_2CH_3 CH_2CH_3 135 $CO-N$ -Methyl-2-pyrrolyl 124 $-(CH_2)_5$ - 136 $CO-3$ -Indolyl	<u>118</u>	Н	$(CH_2)_2CH_3$	<u>130</u>	CO(CH ₂) ₇ NHCOCF ₃
121 H $(CH_2)_5CH_3$ 133 $COCH_2CH_2$ -pyrrolidino ·HCl 122 CH_3 CH_2CH_3 134 $CO-2$ -Furyl 123 CH_2CH_3 CH_2CH_3 $CO-N$ -Methyl-2-pyrrolyl 124 $CO-3$ -Indolyl	<u>119</u>	Н	$(CH_2)_3CH_3$	<u>131</u>	$COCH_2N(CH_3)_2 \cdot HCl$
122 CH_3 CH_2CH_3 134 $CO-2$ -Furyl 123 CH_2CH_3 CH_2CH_3 $CO-N$ -Methyl-2-pyrrolyl 124 $CC-2$ -Furyl 125 $CO-N$ -Methyl-2-pyrrolyl 126 $CO-3$ -Indolyl	<u>120</u>	Н	$(CH_2)_4CH_3$	<u>132</u>	COCH ₂ CH ₂ NHCH ₃ ⋅HCl
	<u>121</u>	Н	$(CH_2)_5CH_3$	<u>133</u>	COCH ₂ CH ₂ -pyrrolidino ·HCl
124 -(CH ₂) ₅ - 136 CO-3-Indolyl	<u>122</u>	CH_3	CH ₂ CH ₃	<u>134</u>	CO-2-Furyl
	<u>123</u>	CH_2CH_3	CH ₂ CH ₃	<u>135</u>	CO-N-Methyl-2-pyrrolyl
<u>137</u> COCH ₂ CH ₃	<u>124</u>	-(CH	2)5-	<u>136</u>	CO-3-Indolyl
				<u>137</u>	COCH ₂ CH ₃

Abbildung 83: Aliphatische und aromatische 3',4'-*O*-Derivate des Chartreusins (<u>23</u>).

Dafür wurden zuerst die fucosidische 3'- und 4'-Hydroxygruppe durch Acetal geschützt, worauf die Veresterung der 6-Hydroxygruppe folgte. Die Acetalschützung der gewünschten Chartreusin-Derivate (110, 116, 117, und 124) erfolgte im absoluten Chloroform unter Zugabe des entsprechenden Acetals zu Chartreusin (23), Aldehyds oder Ketons (115, 118-121, 122-123 jeweils 30 äq), mit katalytischer Menge von *para*-Toluolsulfonsäure. Die Veresterung zu 125-130 und 134-137 wurde in Chloroform/Pyridin-Gemisch (1:1) unter Zugabe von der entsprechenden Carbonsäure (3 äq) und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zur Aktivierung von der Carbonsäure durchgeführt. Die Derivate 131-133 wurden durch die Zugabe der entsprechenden Amine zu 115 hergestellt.

Lipophile Derivate <u>126</u>, <u>127</u>, <u>134</u>, <u>136</u> zeigten eine bessere Aufnahme durch den gastrointestinalen Trakt. Offensichtlich hing die Bioverfügbarkeit und damit die zytotoxische Aktivität gegen das B16-Melanom dieser Derivate mit der Art der Substituenten an C-6-*O*-Position zusammen. Hydrophile Reste wurden rasch im Cytoplasma hydrolysiert, was für eine intravenöse Verabreichung sprach und eine Verwendung dieser Derivate als Prodrug postulierte (<u>131</u> und <u>132</u>). Das 6-*O*-(3-Ethoxypropionyl)-3',4'-*O*-exo-benzylidenchartreusin (IST-622) (<u>128</u>) erwies sich als wirksamste lipophile Modifikation von <u>115</u> in Tests gegen B16-Karzinomzellen (Abbildung 84).

6-*O*-(*N*,*N*-Dimethylglycyl))-3',4'-*O*-exo-benzylidenchartreusin Hydrochlorid (<u>131</u>), wies eine beeindruckende Aktivität im Tests gegen P388 und L1210 Leukämie-Zelllinien auf (Abbildung 84). Die Stereoisomeren mit verzweigen Substituenten <u>121</u> und <u>123</u> waren weniger aktiv in den ausgewählten Testsystemen gegen B16-Melanomazellen als die Derivate mit nicht-verzweigten Substituenten. Die sterische Hinderung störte offensichtlich die Interaktion des Alkylidens mit dem Target in den Testreihen.

Abbildung 84: Ausgewählte Strukturmodifikationen der Verbindung 115.

4.2.3 Problemstellung und Aufgabenstellung

Die antitumorale Aktivität beruht, wie im Kap. A.4.1, Abb. 67 besprochen, auf der Wechselwirkung zwischen den DNA-Basenpaaren und den Disacchariden. Um die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen endgültig zu entschlüsseln, bedarf es einer Kristallstruktur. Es ist auffällig, dass bisher keine der genannten Studien eine klare Aussage über die Konfiguration der Monosaccharide macht. Man nahm bisher an, dass eine 1'-O- β -D-Fucose in einer (2' \rightarrow 1'')-Verknüpfung mit der α -D-Digitalose in der Disaccharid-Einheit vorliegt. In der Veröffentlichung (2003) der Arbeitsgruppe von S. KAMITORI über die Kristallstruktu des Chartreusin-Derivats 3',4'-O-Exo-benzylidenchartreusin (A132) (115b) wurden die dargestellten Zuckereinheiten als β -D-Fucose und α -D-Digitalose diskutiert. Es ist der hier abgebildeten Struktur aus der Publikation zu entnehmen, dass das Chromophor Chartrarin (109) als Ring A, D-Fucose als Ring B, Digitalose als Ring C und die phenylische Schutzgruppe als Ring D abgebildet sind (Abbildung 85).

Abbildung 85: Vorgeschlagene Kristallstruktur von A-132 (<u>115b</u>) nach S. KAMITORI (die Abbildung ist direkt aus der Veröffentlichung zur Verdeutlichung übernommen). ¹⁵⁷

Die Röntgenbeugungsanalyse der Kristallstruktur zeigte, dass zwei Moleküle in eine asymmetrische Einheit eingebunden sind. Die planaren Chromophore sind übereinander positioniert und durch die Wasserstoffbindung der 6-Hydroxygruppe mit der pyranosidischen

4"-Hydroxygruppe fixiert. In der Veröffentlichung sollte die Hydroxy-Gruppe an C-6 statt mit "OH-7" besser mit "OH-6" bezeichnet werden (siehe abgebildete Kristallstruktur). Viel interessanter an der Strukturdarstellung ist, dass die Zuckerkonfiguration der chemischen Strukturformel anders abgebildet ist, als es die ermittelte Röntgenstruktur vorgibt. Zur Verdeutlichung werden die vergrößerten und nummerierten Teilstrukturen hier erneut abgebildet (Abbildung 86).

Folgendes fällt auf: *D*-Digitalose ist im Molekül 1 (mitte) und in dem Molekül 2 (ganz rechts) α -glykosidisch an die *D*-Fucose gebunden.

Vergleich von α-glukosidischer Verknüpfung mit *D*-Glucose

Abbildung 86: Verschiedene Perspektiven der Betrachtung von Digitalose als Strukturformel und im Kristall A-132 (<u>115b</u>) nach S. KAMITORI.

Der "Klyne-Regel" besagt aber, dass Desoxyzucker meist in α -L-Form und β -D-Form in natürlich vorkommenden Verbindungen vorliegen. Die Frage ist, ob im Kristall eine ganz andere Struktur der Digitalose vorliegt, als es in der chemischen Struktur der Publikation präsentiert wurde.

Seit Arbeiten von 1964 wurde die Überlegung über die Stereochemie der Disaccharideinheit des Chartreusins (23) nicht mehr untersucht. K. KON haben in der Suche nach besseren pharmakokinetischen Eigenschaften des Chartreusins mit ihren verschiedenen Chartreusinderivaten intensiv die exo-/endo-Strukturisomeren untersucht und sich der Veresterung der 6-Hydroxygruppe gewidmet. Eine frühere X-Ray-Struktur existiert nicht. Die Konfiguration beider Zucker wurde nicht im Detail überprüft. Letztendlich beschäftigten sich S. KAMITORI mit der Interkalation der beiden Zuckerreste mit Basenpaaren 5'-(CG)-3' der kleinen Furche von DNA. Die Verbindung A-132 (115b) wurde von ISHIHARA SANGYO KAISYA LTD. COMPANY entwickelt, deren chemische Struktur wurde von bestehenden Quellen übernommen und mit der Röntgenstruktur öffensichtlich nicht im Detail verglichen. Besonders bei der Digitalose wäre es aber durchaus vorstellbar, dass diese Pyranose in anderer Konfiguration aufzufinden ist. Ziel dieser Arbeit war, durch einen geeigneten Kristall, die Fragestellung über die Zuckerkonfiguration zu klären.

4.3 Zum biosynthetischen Ursprung von Chartreusin (23)

Außer der bis heute bei uns bestehenden Zweifel an der richtigen Strukturzuordnung sorgte das Chartreusin (23) in jüngerer Zeit auch mit seiner ungewöhnlichen Biosynthese für aktuelle Forschungsarbeiten. Schon 1977 wurden die ersten Untersuchungen zur Biosynthese von Chartreusin (23) von CANHAM ET AL. vorgenommen. Fütterungsexperimente mit isotopen-markiertem [1-13C]Acetat, [2-13C]Acetat und [1,2-13C]Acetat bestätigten die Annahme, dass das Aglykon aus einem gänzlich aus Acetateinheiten aufgebauten Polyketid mit 22-Kohlenstoffatomen (138) entsteht. Als postulierter Biosyntheseweg wurde eine Zyklisierung zu einem benzpyrenähnlichen Intermediat (139) vorgeschlagen, gefolgt von einer oxidativen Ringspaltung. Nach Verlust von drei Kohlenstoffatomen und Rotation um den Phenylring (140) bildet sich das Dilacton Chartrarin (109) (Abbildung 87).

Abbildung 87: Biosynthese von Chartrarin (<u>109</u>).

Durch die Klonierung und Sequenzierung der Gene, die verantwortlich für die Formierung des Bislactonsystems sind, gelang es, die biosynthetischen Vorläufer dieses polyketidischen Rückgrates zu entschlüsseln. Der aromatische Multienzymkomplex Polyketidsynthase II hat eine sogenannte "minimale PKS" als Grundlage. Diese besteht wiederum aus den Enzymfunktionalitäten Ketosynthase (KS β , das Einfügen der einzelnen Verlängerungseinheiten an längere Ketten) und Acyl Carrier Protein (ACP, der Träger der wachsenden Kette). In dem Zentrum des Genclustes wurden demzufolge folgende Gene erwartet: KS α , KS β und ACP. Die Biosynthese sollte durch Decarboxylierung des an das Acyl Carrier Protein gebundene Malonat initiiert werden (Abbildung 88).

A Initiation

B Elongation -

Abbildung 88: Schema zum Aufbau aromatischer Polyketide.

Die Biosynthese verläuft weiter mit dem Transfer der Verlängerungseinheit (Malonat) zur ACP. Die KS_{α} -Domäne katalysiert zunächst die decarboxylative Kondensation zum Diketid. Die verlängerte Kette durchläuft mehrfach den Zyklus, bis die entsprechende Kettenlänge erreicht wird (Abbildung 88, b).

Die molekularbiologischen Untersuchungen zur Biosynthese des Chartreusins von C. HERTWECK¹⁵⁷ spiegeln die oxidative Ringspaltung (<u>141</u>) des aromatischen Aglykons sehr gut wider. Nach diesem Postulat haben die ersten biosynthetischen Schritte des Chartreusins (<u>23</u>) große Ähnlichkeiten mit denen von Antracyclinen (Abbildung 89).

Abbildung 89: Biosynthetische Modell des Chartreusin-Aglykons (Chartrarin (<u>109</u>)) postuliert durch molekularbiologische Studien von C. HERTWECK.³

Nach der Hypothese aus molekularbiologischen Studien startet die Biosynthese mit der Reduktion des Dekaketids an der Position C-13 mittels einer Ketoreduktase (Schritt 1). Der erste Ringschluss ist höchstwahrscheinlich durch die Ketoacylsynthase eingeleitet (Schritt 2). Durch putative Aromatase wird das erste aromatische System A aufgebaut (Schritt 3). Nach der Oxidation mit einer putativen Anthron-Oxygenase (Schritt 4) wird die Methylierung der Carboxylgruppe von einem Protein katalysiert, das mit einer S-adenosyl-L-methionin-abhängigen Methyltransferase eng verwandt ist (Schritt 5). Der vierte Ring wird durch eine Aldolreaktionsartige Zyklisierung gebildet (Schritt 6). Die Reduktion der Ketogruppe C-17 durch eine putative Ketoreduktase (Schritt 7) und vermutliche Dehydratation des Intermediates (141) führen zu dem Zwischenprodukt (142), das identische Strukturmerkmale wie das kürzlich in der Arbeitsgruppe H. LAATSCH¹⁵⁸ isolierte Resomycin C aufweist (Schritt 8). Der oxidative Bindungsbruch des Intermediates <u>141</u> könnte nach der Baeyer-Villiger-Typ Oxidation verlaufen. Entsprechend der Fütterungsversuche wird die neue Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung zwischen der Carbonylgruppe und dem unsubstituierten, aromatischen Kohlenstoffatom gebildet (Schrit 9). Die Hydroxygruppe könnte entweder während der Ringspaltung oder während der Hydroxylierung eingeführt werden. Das entstandene Quinon-Enolat greift im Schritt 9 den Methylester an und bildet den ersten Lactonring unter Methanolfreisetzung aus. Das somit intramolekular gebildete Intermediat (<u>143</u>) wird mittels einer putativen Dioxygenase oxidativ gespalten. Anschließende Lactonbildung beendet die Biosynthese des Chartrarin-Aglykons (<u>109</u>).

In der gleichen biosynthetischen Studie von C. HERTWECK wurde versucht, die Herkunft beider 6-Deoxyhexosen (Fucose und Digitalose) im Chartreusin (23) zu klären. Aktivierung des Glucose-6-phosphates zur entsprechenden NDP-Hexose NDP-D-Glucose (144) ist wahrscheinlich durch eine NDP-Hexose-Synthase katalysiert (Schritt 1). NDP-D-glucose-4,6-dehydratase ist für die Umwandlung zu NDP-4-Keto-6-deoxy-D-glucose (145) verantwortlich (Schritt 2) (gehört zur Familie der NDP-Epimerasen/Dehydratasen). Konversion von 145 zu NDP-D-Fucose (146) wird von einer NDP-4-Keto-6-deoxy-D-glucose-Reduktase vermittelt (Schritt 3). Die NDP-D-Digitalose (147) kann dann im letztem Schritt durch eine O-Methyltransferase gebildet werden (Schritt 4) (Abbildung 90).

Abbildung 90: Vorgeschlagener Biosyntheseweg für die 6-Deoxyzucker <u>146</u> und <u>147</u> nach HERTWECK ET AL. ¹⁶⁵

4.4 O,O-Acetalbildung

Allgemeines

Die Synthese der Endo- und Exo-Form des 3',4'-O-Benzylidenchartreusins (<u>115</u>) aus Chartreusin (<u>23</u>) und Benzaldehyd wurde 1990 von der Arbeitsgruppe κ. κον publiziert. Sie versetzten Chartreusin (<u>23</u>) (10.0 g) mit Benzaldehyd (30 äq) in absolutem Chloroform bei Raumtemperatur und erhielten nach wiederholter chromatographischer Aufreinigung 3',4'-O-endo-Benzylidenchartreusin (<u>115a</u>) (48 %) und 3'4'-O-exo-Benzylidenchartreusin (<u>115b</u>) (27 %) in kristalliner Form. Die Umsetzung wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt.

Eigene Arbeiten

Chartreusin (23) (≥91 %iger Reinheitsgrad, 2 g) hat die Arbeitsgruppe von A. ZEECK freundlicherweise für die semisynthetischen Arbeiten zur Verfügung gestellt. Die ersten Versuche der Schützung der 3'- und 4'-Hydroxygruppe des Chartreusins (23) nach der angegebenen Literaturvorschrift von K. KON mit frisch destilliertem Benzaldehyd schlugen fehl. Chartreusin (23) ließ sich sehr schlecht in Chloroform lösen, auf dem Dünnschichtchromatogram (DC) wurde keine Umsetzung beobachtet. Die nächste Reaktion wurde in Chloroform/Dimethylformamid (1:1) versucht. Chartreusin (23) hat sich hier gelöst, *para*-Toluolsulfonsäure vollständig gab man portionsweise über kontinuierlichen Zeitraum von 3.5 h stetig zu. Man konnte die Entstehung mehrerer, neuer UV-löschender Zonen beobachten (R_f= 0.68/0.66, Kieselgel[®] 60, Chloroform/Methanol (CM) 9:1) (Abbildung 91).

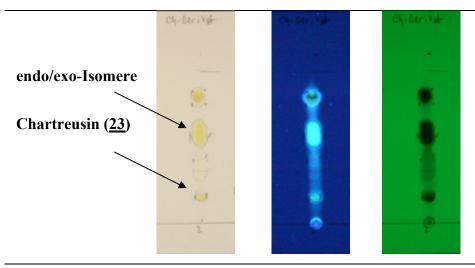


Abbildung 91: Dünnschichtchromatographische Detektion der Reaktionsmischung mit 23.

Dennoch war die Ausbeute zu gering (3 %), die erhaltene Produktmenge reichte nur für die $m/z = 751.2 [M+Na]^+$ ESI-MS-Bestätigung für 115: (M = 728 g/mol).Reaktionsaufarbeitung fiel auf, dass die überschüssige Menge am Benzaldehyd (30 äq) die Aufarbeitung erheblich erschwert. Eine mehrfache Extraktion des chromatographische Benzaldehyds mit kaltem Pentan (-20 °C) hat nicht zu seiner vollständigen Entfernung geführt. Die Versuche einer Reaktionsversetzung mit weniger Benzaldehyd (1, 2, 3, 5, 10, 18.5 und 20 äq) hat zu keiner Kupplung geführt. Um das entstehende Wasser aus dem Reaktionsgleichgewicht zu entfernen, setzte man Orthoessigsäuretriethylester (1.1 äq) zusätzlich zu dem Molsieb (4 Å) dem Reaktionsgemisch zu. Es führte zu keiner Verbesserung der Reaktionsbedingungen. Das Benzaldehyddimethylacetal (148) wird häufig zur Acetalbildung der Diolen zu 1,2-Diacetalen eingesetzt. 160 Es hat außerdem den Vorteil, sich leicht unter vermindertem Druck (28 °C und 20 mbar) aus dem Reaktionsgemisch entfernen zu lassen (Sdp. 87-89 °C bei 24 hPa). Ausgang für die Synthese war käufliches Benzaldehyddimethylacetal (148) als Reagenz, das nach B.5.5.AAV1 unter optimierten Bedingungen mit Chartreusin (23) (100 mg) umgesetzt wurde (Abbildung 92).*

Abbildung 92: Umsetzung des Chartreusins (<u>23</u>) mit Benzaldehyddimethylacetal (<u>148</u>) zum 3',4'-*O*-Benzylidenchartreusin (<u>115</u>).

Die Umsetzung wurde dünnschichtehromatographisch verfolgt. Man beobachtete die Entstehung zweier neuer UV-löschenden Zonen für die endo- bzw. exo-Isomere, die man durch zweifache chromatographische Reinigung nicht voneinander trennen konnte.

^{*} Wir danken dem Arbeitskreis ZEECK für die Überlassung des Chartreusins 23.

Abbildung 93: Mechanismus der *O,O*-Acetal-Bildung eines 1, 2-Diols.

Proton liefert aus katalytisch Wirkenden *para*-Toluonsulfonsäure Das (Abbildung 93). Das Produkt 115 wurde mittels ESI-MS identifiziert. Im positiven die Ionen $m/z = 751.3 ([M+Na]^+) und$ Ionen-Modus waren 1479.3 $([2M+Na]^+)$ (M = 728 g/mol) aufzufinden. In dem negativen Modus wurde die Masse von 727.1 ([M-H]⁻) gefunden. Das Reaktionsgemisch von den zwei Isomeren 115a, 115b wurde von den Edukten säulenchromatographisch getrennt (Kieselgel®60, CM 85:15, 1.0 × 40.0 cm), man erhielt des Endo/Exo-Gemisches (115a/115b) als blassgelbe Nadeln (Ausbeute: 78.4 mg, 69 %) $(R_f-Wert = 0.66/0.68, Kieselgel^{\$}60, CM 9:1).$

Die Stereoisomere konnten deutlich durch 1 H-NMR-Spektroskopie unterschieden werden. Die Protonen der beiden Monosaccharide aus der Dihexose-Zuckereinheit waren zwischen 3.70 ppm und 4.60 ppm aufzufinden. In dem Multiplett bei δ_H = 4.12-4.18 ppm fand man drei Protonen (5'-H, 5''-H und 4'-H). Beide anomere Protonen konnten sicher bei δ_H = 5.28 ppm (1'-H) und δ_H = 5.77 ppm (1''-H) als Dubletts eingeordnet werden. Die Signale des 16-H des Endo- (δ_H = 5.64 ppm, Dublett) und Exo-Isomers (δ_H = 5.94 ppm, Dublett) konnten zugeordnet werden.

Zur besseren Übersicht sind die Resonanzsignale der Literaturwerte der Endo/Exo-Strukturisomerer im Vergleich mit den gemessenen Werten in der Tabelle 11 eingetragen.

Tabelle 11: Der Vergleich der Literatur- mit den gemessenen NMR-Daten für 115.

Atome	3', 4'- O -endo/exo-Benzylidenchartreusin/CDCl ₃ δ_{H} [ppm] (Multiplizität)	3', 4'- O -endo-Benzylidenchartreusin (Literaturwerte)/CDCl ₃ δ_{H} [ppm] (Multiplizität)	3', 4'- O -exo-Benzylidenchartreusin (Literaturwerte)/CDCl ₃ $\delta_{H} \ [ppm] \ (Multiplizität)$
1- CH ₃	2.78 (s)	2.79 (s)	2.87 (s)
1'-H	5.28 (dd)	5.24 (d)	5.28 (d)
1''-H	5.77 (d)	5.76 (d)	5.94 (d)
2'-Н	4.25 (t)	4.25 (dd)	4.41 (dd)
2"-Н	3.81 (m)	3.75 (ddd)	3.81 (ddd)
2"-ОН	2.16 (s)	2.2 (d)	2.26 (d)
3'-Н	4.43 (t)	4.39 (dd)	4.58 (dd)
3"-Н	3.75 (dd)	3.35 (dd)	3.39 (dd)
3"-OCH ₃	3.41 (s)	3.34 (s)	3.40 (s)
4'-H	4.18 (m)	4.15 (dd)	4.31 (q)
4"-H	3.84 (m)	$3.77 (s_b)$	3.89 (s _b)
4''-OH	2.98 (s _b)	2.16 (s _b)	2.19 (d)
5'-H	4.12 (m)	4.07 (dq)	4.03 (dq)
5"-Н	4.15 (m)	4.12 (q)	4.17 (dd)
5'- CH ₃	1.26 (d)	1.41 (d)	1.46 (d)
5"-CH ₃	1.04 (d)	1.01 (d)	1.29 (d)
PhCHO-	5.64 (d) und 5.94 (d)	6.35 (s)	6.35 (s)
Aromat	7.31-8.31 (m)	7.31-8.19 (m)	7.37-8.28 (m)
Ar-OH	11.42 (s)	11.53 (s)	11.64 (s)

Das gewonnene Isomerengemisch wurde in weiteren Derivatisierungsversuchen eingesetzt (B.4.5 und B.4.6).

4.5 Benzoylierung

Die Umsetzung zum 3',4'-O-Benzyliden-6-O-Benzoylchartreusin (<u>149</u>) wurde als weiterer Reaktionsschritt in der Derivatisierung von 3',4'-O-Benzylidenchartreusin (<u>115a/115b</u>) vorgenommen. Hierbei wurde das zuvor synthetisierte 3',4'-O-Benzylidenchartreusin (<u>115</u>) in einer Benzoylierungsreaktion mit Benzoylcyanid (<u>150</u>)¹⁶¹ nach den, im Laufe der hier vorgestellten Arbeiten, optimierten Reaktionsbedingungen, eingesetzt (B.5.5.AAV3, Abbildung 94).

Abbildung 94: Umsetzung des 3',4'-*O*-Benzylidenchartreusins (<u>115</u>) mit Benzoylcyanid (<u>150</u>) zum 6-*O*-Benzoyl-3',4'-*O*-benzylidenchartreusin (<u>149</u>).

Benzoylcyanide werden in der selektiven Umsetzung mit Nucleosiden verwendet. Hier wurde eine umgewandelte Reaktion ausprobiert, bei der nicht die Hydroxygruppe der Nucleoside verestert wird, sondern die Phenolgruppe an C-6. Dafür wurde β -Naphtol (151) (100 mg) mit Benzoylcyanid (150) in einer Modellreaktion nach AAV3 versetzt.

Die Reaktion erlaubt die Anwendung des Acetonitrils bzw. des Dimethylformamids (DMF) als Lösungsmittel im Gegensatz zu gewöhnlichen Acetylierungs-Solventien wie Pyridin oder *N*-Methylpyrrolidinon (NMP). Indem man das Reaktionsgemisch nach dem Reaktionsablauf auf das Eiswasser gießt, gewinnt man das Produkt durch Extrahieren mit Essigester wieder und arbeitet nach dem B.5.5.AAV3 weiter auf. ^{165, 163}

Der Mechanismus der Reaktion wird mit der Abb. 95 kurz erläutert.

Abbildung 95: Der Mechnistische-Ablauf der Benzoylierung des β -Naphtols (<u>151</u>) mit Benzoylcyanid (<u>150</u>).

Der nukleophile Angriff von DMAP (<u>152</u>) auf die carbonylische Gruppe von Benzoylcyanid (<u>150</u>) und die Abspaltung der Cyanogruppe als gute Abgangsgruppe führt zu Intermediat <u>160</u>. Durch die Elektronen-Resonanzstabilisierung ist viel von <u>153</u> im Gleichgewicht vorhanden. Interaktion zwischen β -Naphtol (<u>151</u>) und Intermediat (<u>153</u>) bildet das benzoylierte Produkt 154 und regeneriert DMAP (152).

Das Reaktionsprodukt β-Naphtylbenzoat (<u>154</u>) ergab im ESI-MS die Massen $m/z = 518.8 \ [2M+Na]^+$ und 271.0 $[M+Na]^+$ als positive Ionen und 247.3 $[M-H]^-$ als negative Ionen ($M = 248 \ g/mol$). Es wurde als gelbliches, angenehm riechendes und mit Anisaldehyd violett anfärbendes Öl isoliert (Ausbeute: 151.0 mg, 88 %, R_f -Wert = 0.6, Kieselgel[®] 60, CM 98:2). Im 1 H-NMR-Spektrum sieht man die zwölf aromatischen Protonensignale in dem Bereich von $\delta_H = 7.37$ -8.4 ppm. Im 13 C-NMR-Spektrum ist die carbonylische Gruppe des Esters bei $\delta_C = 165.47 \ ppm$. Die Verbindung ist von A. K. PRASAD 2005 veröffentlicht, allerdings haben sie die Reaktion in ionischen Lösungsmitteln wie 1-Methoxyethyl-3-methylimidazolium-methansulfonat (MoeMIM.Ms) durchgeführt. 166

Nachdem die Modellreaktion unter den gegebenen Bedingungen funktionierte, wurde das 3',4'-O-Benzylidenchartreusin (50 mg) (115) unter den gleichen Reaktionsbedingungen

(B.5.5.AAV3) mit Benzoylcyanid (<u>150</u>) zum 6-*O*-Benzoyl-3',4'-*O*-benzylidenchartreusin (<u>149</u>) versetzt.

Die resultierende Reaktionsmischung wurde säulenchromatographisch gereinigt (Kieselgel $^{\$}$ 60, Acetonitril/Cyclohexan 1:1, 1.5×30.0 cm). Durch ESI-Analyse wurde das erwartete Reaktionsprodukt bestätigt: m/z (positive Ionen): 855.3 ([M+Na] $^{+}$) und 1687.6 ([2M+Na] $^{+}$), (M = 832 g/mol); negative Ionen m/z = 831.5 ([M-H] $^{-}$). Das Gemisch der Isomere wurde als gelbes Öl erhalten (Ausbeute 22.6 mg, 40 %, Kieselgel $^{\$}$ 60, CM 9:1, R_f-Wert = 0.46).

Dem 1 H-NMR-Spektrum konnte entnommen werden, dass sich die Zahl der aromatischen Protonensignale, verglichen mit der Ausgangssubstanz $\underline{115}$ verändert hatte. Die Intensität des Multipletts bei $\delta_{\rm H}=7.31\text{-}8.31$ ppm blieb unverändert in Bezug auf die Ausgangssubstanz, jedoch sind neue Resonanzsignale bei $\delta_{\rm H}=6.68$ ppm, 6.98 ppm und 7.10 ppm deutlich zu erkennen. Mittels der HMQC-Korrelationen ($^1J_{\rm C,H}$ -Kopplungen) konnten diese aromatischen Verschiebungen eindeutig dem Aglykon-Kern bzw. den beiden phenylischen Schutzgruppen, der 3',4'-O-fukosidischen und 6-O-Benzoylgruppe, zugeordnet werden. Die Signale der Benzoylgruppe bei $\delta_{\rm H}=6.68$ ppm (27-H), $\delta_{\rm H}=6.98$ ppm (26/28-H) und $\delta_{\rm H}=7.10$ ppm (25/29-H) konnten somit identifiziert werden. Die COSY-Korrelationen ($^{2,3}J_{\rm H,H}$ -Kopplungen) bestätigten des Protoneneinordnung eines aromatischen Systems.

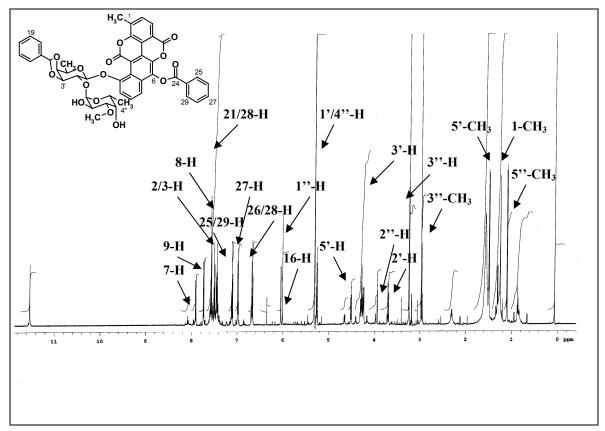


Abbildung 96: 1 H-NMR-Spektrum (600 MHz) von <u>149</u> in Dichlormethan- d_2 (<u>149</u>).

Das ¹H-¹H-COSY-Experiment und HMBC-Korrelationen des Chartarin-Aglykons sind hier erläutert:

Die Dubletts bei einer chemischen Verschiebung im 1 H-NMR-Spektrum von $\delta_H = 7.74$ ppm (9-H) und $\delta_H = 7.91$ ppm (7-H) ergeben im COSY-Experiment mit dem Proton bei $\delta_H = 7.50$ ppm (8-H) ein Spinsystem. Das Kohlenstoffatom bei $\delta_C = 157.0$ ppm (C-6) korrelierte im HMBC-Spektrum mit dem Protonensignal bei $\delta_H = 7.91$ ppm (7-H). Die COSY-Korrelationen zeigten das aromatische Spinsystem der Protonen 7-H, 8-H und 9-H. Außerdem beobachtete man die Kopplung der Protonen der Methylgruppe bei $\delta_H = 1.33$ ppm (1-CH₃) mit 2-H und 3-H bei $\delta_H = 7.56$ ppm. Eine $^3J_{C,H}$ -Kopplung der Protonen dieser Methylgruppe (C-1) mit dem benachbarten Kohlenstoffatom C-2 bei $\delta_C = 133.2$ ppm ist im HMBC-Experiment zu finden. Die Kopplungen sind in Abbildung 97 dargestellt.

Abbildung 97: Das Kopplungsmuster des aromatischen Chartrarin-Aglykons (109).

Nachdem die aromatischen Spinsysteme zugeordnet werden konnten, konnten durch weitere Kopplungen in der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie (HSQC-NMR, HMBC-NMR, COSY-NMR) die Protonen des Disaccharid-Gerüstes bestimmt werden. Ausgehend von der Annahme, dass es sich hier um β -D-Fucose und α -D-Digitalose handelt, werden folgende Ergebnisse zusammengefasst:

Die Zuordnung der Protonen der D-Fucose:

Das COSY-Experiment ergab folgende Spinsysteme: die Protonen 5'-H ($\delta_{\rm H}$ = 4.28), 4'-H ($\delta_{\rm H}$ = 4.51) und 3'-H ($\delta_{\rm H}$ = 4.30) stehen durch vicinale Kopplungen in Konnektivität zueinander (Abbildung 98). Das Kohlenstoffatom C-16 bei $\delta_{\rm C}$ = 105.34 ppm koppelte im HMBC-Spektrum mit dem 4'-H, das Kohlenstoffatom C-1' $\delta_{\rm C}$ = 99.11 ppm korrelierte mit dem 2'-H ($\delta_{\rm H}$ = 4.24 ppm). Das Kohlenstoffatom des Chartrarin-Aglykons C-10 ($\delta_{\rm C}$ = 153.81 ppm) korreliert im HMBC-Spektrum mit dem anomeren Proton 1'-H ($\delta_{\rm H}$ = 5.25 ppm). C-3' ($\delta_{\rm C}$ = 69.47 ppm) steht in der Korrelation mit 4'-H. Das anomere Proton erscheint als Dublett vom Dublett (J = 3.0 Hz). Die vicinale Kopplungskonstante zwischen 3'-H und 2'-H (J = 7.0 Hz) deutet auf eine axial-axiale Anordnung der Protonen zueinander.

Abbildung 98: COSY- und HMBC-Korrelationen der β-D-Fucose-Zuckereinheit.

Die Zuordnung der Protonen der D-Digitalose:

Anhand der COSY-Korrelationen konnten das Spinsystem 1"-H ($\delta_{\rm H}$ = 6.05) / 2"-H ($\delta_{\rm H}$ = 3.94) / 3"-H ($\delta_{\rm H}$ = 3.67) / 4"-H ($\delta_{\rm H}$ = 5.27) zugeordnet werden. Das Proton 5"-H ($\delta_{\rm H}$ = 4.24) zeigt eine vicinale Kopplung mit der Methylgruppe 6"-H₃ ($\delta_{\rm H}$ = 1.10). Dem HMBC-Spektrum konnten Korrelationen zwischen C-5" ($\delta_{\rm C}$ = 66.1) bzw. C-3" ($\delta_{\rm C}$ = 77.8) zum anomeren Proton entnommen werden. Die große Kopplungskontante zwischen 2"-H und 3"-H (J = 12.0 Hz) belegt die axial-axiale dieser Protonen. Die weiteren

Kopplungskonstanten zwischen den Methinprotonen ließen auf äquatorial-axiale oder äquatorial-äquatoriale Anordnungen schließen (Abbildung 99).

Abbildung 99: Die Korrelationsverhältnisse des α–*D*-Digitalose-Skeletts.

Die Verknüpfung der beiden Monosaccharide wurde durch eine HMBC-Korrelation zwischen C-2' (δ_C = 79.1) der Fucose und dem anomeren Proton 1''-H (δ_H = 6.05) der Digitalose bestätigt.

Das gewonnene Naturstoffderivat 3',4'-O-Benzyliden-6-O-benzoylchartreusin (<u>149</u>) ist neu und somit noch nicht literaturbeschrieben.

4.6 Weitere Derivatisierungsmethoden

Es wurden außer erfolgreicher Acetylierung und Benzoylierung an 3',4'-O-benzylidenchartreusin (115) weitere chemische Umsetzungen vorgenommen. Hierbei war das Ziel, durch effiziente Synthese einen Kristall eines Derivates für die Bestimmung der Zuckerkonfigurationen zu erhalten. Angesichts der schlechten Löslichkeit von 23 wurden mehrere Versuche durchgeführt, ein geeignetes Lösungsmittel für Kristallisations-Ansätze für Chartreusin (23) mittels Flüssig/Flüssig-Diffusion zu finden (Tabelle 12). Bei dieser Methode macht man sich den Umstand zunutze, dass eine Substanz in verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedlich gut löslich ist. Die Lösungsmittel müssen unterschiedliche Dichten aufweisen und miteinander mischbar sein. Die Kristalle bilden sich bevorzugt an der Phasengrenze beider Lösungsmittel. Man versuchte mit folgenden Lösungsmittelgemischen einen Kristall zu züchten:

Lösungsmittel	Fällungsmittel	Konzentration [mg/mL]
Aceton	<i>n</i> -Hexan	20
Methanol	Dioxan	20
Aceton/Ethanol (1:1)	<i>n</i> -Heptan	5
Ethanol	Cyclohexan	5
Essigester	Cyclohexan	5
Essigester	Methanol	5

Tabelle 12: Verschiedene Kristallisations-Ansätze für Chartreusin (<u>23</u>).

Chartreusin (23) wurde dafür jeweils in der entsprechenden Konzentration in dem Lösungsmittel aufgelöst und langsam bis zur klaren Lösung erhitzt. Die Lösung wurde langsam abgekühlt (2 h bei 60 °C, 24 h bei 40 °C, anschließend bei Raumtemperatur) und mit Fällungsmittel überschichtet (1 μ L Substanzlösung auf 1 μ L Fällungsmittel). Die Lösung wurde zu Kristallisation bei 4 °C im Flachbodenglas (0.4 × 4.0 cm) erschütterungsfrei stehengelassen und regelmäßig auf Kristallwachstum kontrolliert.

Da mehrere Experimente zu keiner Kristallisation führten, entschied man sich für chemische Derivatisierungen. Das Ziel hierbei war:

- a) eine bessere Löslichkeit des Chartreusins (23) zu erzielen
- b) einen auf diese Weise modifiziertes Molekül zu erhalten, das geeigneter für die Kristallisation wäre.

Durch Veresterungsreaktionen von Naturstoffen mit *ortho*-Benzoesäure bzw. *para*-Brombenzoesäure wurden bisher sehr gute Ergebnisse in der Kristallzucht erzielt. Mittels Veresterung mit *ortho*-Benzoesäure (<u>155</u>) hat man Agistatine erfolgreich zum kristallisierenden Derivaten umgesetzt. Ein weiteres Beispiel für die Veresterung mit *para*-Brombenzoesäure (<u>156</u>) ist die Veresterung des Okaspirodiols aus dem Arbeitkreis S. GROND.

Die Versuche einer Umsetzung des reinen Chartreusins (<u>23</u>) am tertiären Alkohol 6-OH haben keine positive Ergebnisse gebracht. Die größte Anfangsschwierigkeit stellte die schlechte Löslichkeit des Chartreusins (<u>23</u>) dar. Als geeignete Lösungsmittel haben sich Chloroform/Dimethylformamid (1:1) bewährt. Für die Kupplungsreaktionen wurden Benzoesäure (<u>157</u>), *ortho-*Brombenzoesäure (<u>155</u>) und *para-*Bromobenzoesäure (<u>156</u>) eingesetzt. Durch Einführen eines Schweratoms wie z.B. Brom in ein Molekül sollte man aufgrund der höheren Auflösung der auftretenden Streueffekte die absolute Stereokonfiguration eines Kristalls ableiten können.

Als Carbonsäure aktivierendes Reagenz wurde *N*-Acetyl-*N*'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid (EDCI · HCl) verwendet, 4-*N*,*N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) wurde als zusätzlicher Katalysator eingesetzt (10⁴-mal aktiver als Pyridin). EDCI · HCl wird häufig statt Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) für die Aktivierung der eingesetzten Carbonsäuren in der Kupplungsreaktionen eingesetzt. ¹⁶⁰

Die dünnschichtehromatographische Reaktionskontrolle fiel in allen drei Fällen negativ aus (Abbildung 100). Denn man konnte die Entstehung vier neuer Zonen bei den R_f -Werten von 0.46, 0.72, 0.78 und 0.86 beobachten. Nach der Reaktionsaufarbeitung B.5.5.AAV2 und flashchromatographischer Auftrennung (Kieselgel 60, Chloroform/Methanol (CM) 9:1, 0.5×15 cm) stellte sich im ESI-MS heraus, dass nur Zersetzungsprodukte vorhanden waren.

Abbildung 100: Versuche einer Veresterung des Chartreusins (23).

Nach den optimierten Reaktionsbedingungen (B.5.5.AAV2) wurden an dem Benzyliden-Acetal <u>115</u> neben der erfolgreichen Umsetzung mit Benzoylcyanid (<u>150</u>) (s. A.4.5) auch verschiedene Veresterungsansätze durchgeführt.

Die Reaktionen sind in der Tabelle 13 zusammengefasst und deren Ergebnisse nachfolgend aufgeführt.

Tabelle 13: Weitere Derivatisierungsversuche mit <u>115</u>.

-	R ₂	Name	zusätzliches Reagenz	-
a) <u>155</u>	Br	<i>ortho-</i> Benzoesäure		-
b) <u>156</u>	Br	<i>para-</i> Brombenzoesäure		
c) <u>159</u>	O ₂ N NO ₂	3,5-Dinitrobenzoesäure		
d) <u>160</u>	NH NH	3-Indoyl-essigsäure	OH OH	<u>163</u>
<u>161</u>	Br N H	5-Brom-3-Indolylessigsäure	OH OH	<u>163</u>
e) <u>162</u>	Fe —	Ferrocencarbonsäure	[_N^+ _ Br"	<u>164</u>

DMAP: 4-N,N-Dimethylaminopyridin EDCI: N-Acetyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid Hydrochlorid

DMF: Dimethylformamid

a) Die Veresterung des <u>115</u> mit *ortho*-Benzoesäure (<u>155</u>) führte zur keinem gewünschtem Produkt. Keine signifikante Änderung der Edukte wurde festgestellt. Nach 48 h wurde die Reaktion abgebrochen und nicht aufgearbeitet. Mögliche

- Ursache war, dass die *ortho*-Stellung des Bromatoms in *ortho*-Benzoesäure (<u>155</u>) eventuell sterisch zu anspruchsvoll gewesen seien könnte und somit eine Veresterung nicht durchführbar war.
- b) In der nächsten Veresterung wurde versucht, die sterisch weniger hindernde *para-*Brombenzoesäure für die Derivatisierung einzusetzen. Die Umsetzung von <u>115</u> mit *para-*Brombenzoesäure (<u>156</u>) erfolgte analog der Brombenzoylierung mit <u>155</u>. Auch hier konnte man keine Umsetzung feststellen, der Reaktionsablauf glich dem der Veresterung mit <u>155</u>. Das Reaktionsgemisch wurde daher nicht weiter aufgearbeitet.
- c) Die Kupplungsreaktion wurde mit <u>115</u> und 3,5-Dinitrobenzoesäure (<u>159</u>) vorgenommen. Die 3,5-Dinitrobenzoate werden häufig in der metallorganischen Chemie erfolgreich für die Röntgenstrukturanalyse eingesetzt. 167 Auch bei der Strukturbestimmung von Naturstoffen haben sie sich als Kristallisationsmethode bewährt. 168 Der Reaktionsverlauf wurde dünnschichtehromatographisch verfolgt, es hat sich eine neue UV-löschenden Zone gebildet (R_f-Wert = 0.79, Kieselgel[®]60, CM 95:5). Die nach B.5.5.AAV2 aufgearbeitete und flashchromatographisch aufgereinigte, dritte Fraktion (Kieselgel[®]60, CM 95:5, 1.0 × 15.0 cm) ergab in der massenspektrometrischen Untersuchung für die höchste Masse erneut $m/z = 471 [2M+Na]^+$ bei positiven Ionen (M = 224 g/mol). Die Veresterung war also nicht erfolgreich.
- d) Wie in Kapitel A.4.3 vorgestellt, haben ihren YAMADA ET AL. in pharmakodynamischen Studien über Chartreusin (23) verschiedene Derivate des 3',4'-O-Benzylidenchartreusins synthetisiert, (115)darunter auch 6-O-(3-Indolylcarbonyl)-3',4'-O-exo-benzylidenchartreusin (136). Diese Reaktion hat im Zuge der vorliegenden Arbeit unter den angegebenen Bedingungen nicht funktioniert. Zur Überprüfung hat man in einer Modellreaktion β-Naphthol (151) (100 mg) mit 3-Indolessigsäure (160) nach optimierten Reaktionsbedingungen B.5.5.AAV2 erneut umgesetzt. Eine neue, mit Anis leuchtend-orange färbende Zone (R_f = 0.73, Kieselgel[®]60, CM 98:2) konnte beobachtet werden. Die erste flasch-chromatographisch (Kieselgel[®]60, aufgereinigte Fraktion Essigester/Cyclohexan 1:1, 1.5×20.0 cm) ergab den gewünschten (1*H*-Indol-3-yl)essigsäure-naphthalen-2-yl-ester (165) (M = 301 g/mol) als angenehmriechendes. leicht gelbliches Öl (Ausbeute: 101.0 mg; 48 %) (Abbildung 101).

Abbildung 101: Die Modellreaktion des β-Naphtols (<u>151</u>) mit 3-Indolylessigsäure (<u>160</u>) zum (1*H*-Indol-3-yl)-essigsäure-naphthalen-2-yl-ester (**165**).

Im ESI-Spektrum bei positiven Ionen konnte man folgende Ionen zuordnen: m/z=625.3 amu $[2M+Na]^+$, 324.1 amu $[M+Na]^+$ und 302.1 amu $[M+H]^+$. Bei den negativen Ionen sind die Massen: m/z=345.8 $[M+HCOO]^-$ und 300.1 $[M-H]^-$ zu finden. In dem 1H -NMR-Spektrum sieht man in dem aromatischen Bereich von $\delta_H=7.14$ -7.26 ppm ein Multiplett von den Protonen 5-H, 6-H und 5'-H. Es folgt ein aufgespaltenes Singnal von 2-H bei $\delta_H=7.31$ ppm. In dem Bereich von $\delta_H=7.38$ -7.53 ppm folgen die Protonensignale von 1'-H, 3'-H, 7'-H, und 7-H. Die Signale von 6'-H und 4-H sind im Bereich von $\delta_H=7.70$ -7.78 zu sehen. Die beiden Protonen 4'-H und 8'-H erscheinen bei $\delta_H=7.87$ ppm und $\delta_H=7.89$ ppm. Die Methylengruppe liegt bei $\delta_H=4.20$ ppm. Ein breites Singulett vom 1-NH ist bei $\delta_H=8.31$ ppm zu sehen. Das 13 C-NMR-Spektrum deutet auf das Vorliegen einer Carbonylgruppe bei $\delta_C=31.6$ ppm. Es konnte die Verknüpfung mit dem Naphtolring bei $\delta_C=147.1$ ppm zugeordnet werden.

Die Umsetzung von <u>160</u> mit <u>115</u> nach den gleichen Reaktionsbedingungen konnte anhand der dünschichtehromatographischen Kontrolle und ESI-Spektrum nicht festgestellt werden. Auch schlug der Versuch einer Veresterung des <u>115</u> mit 5-Brom-3-indolylessigsäure (<u>161</u>) fehl. Aus dem ESI-MS bei positiven Ionen sind folgende Massen zu entnehmen gewesen: m/z = 471.0 amu $[2M+Na]^+$, 449.1 amu $[2M+H]^+$ und 225.2 amu $[M+H]^+$ (M = 224 g/mol).

Um die Reaktionsbedingungen für die Umsetzung mit 3',4'-O-Benzylidenchartreusin (115) mit 160 und 161 zu verbessern, wurde die Modellreaktion mit β-Naphtol (151) mit 160 und 1-Hydroxybenzotriazol (163) wiederholt. 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) (163) ist ein aus der Peptidsynthese bekanntes Hilfsreagenz, das den Aktivester *in situ* generiert und die Verbindung vor Nebenreaktionen wie z.B. Racemisierung schützt. 169 Als gute Abgangsgruppe wird es im Anschluss durch nucleophilen Angriff an der

Carbonylgruppe des Esters freigesetzt. Die Kupplung findet in Anwesenheit von <u>163</u> als Katalysator schneller statt (Abbildung 102).

Abbildung 102: Mechanismus einer nucleophilen Katalyse mit HOBt <u>163</u>.

Die Reaktion hat erneut (1*H*-Indol-3-yl)-essigsäure-naphthalen-2-yl-ester (<u>165</u>) als gelbliches Öl ergeben. ESI-MS-Analyse ergab die dazugehörigen Massen bei positiven Ionen bei m/z 624.9 amu [2M+Na]⁺ und 324.1 amu [M+Na]⁺ für M = 301.1 g/mol. Die Zugabe von 1-Hydroxybenzotriazol (<u>163</u>) zu der Reaktion mit <u>115</u> trugen zu der Verbesserung der Reaktionsbedingungen nicht bei, die gewünschte Veresterung des tertiären Alkohols (6-OH) konnte nicht erzielt werden (DC-Kontrolle).

e) Eine weitere effiziente Umesterung substituierter Phenole versprach die Reaktion mit Ferrocencarbonsäure (162). 170 Die Umsetzung fand in ionischen Reagenzien wie N-Butyl-Pyridiniumbromid (164) unter identischen Reaktionsbedingungen wie bisherige Veresterungen statt (B.5.5.AAV2) und ergab Produkte in Kristallform. Bei der ersten Umsetzung mit 115 wurde das Reaktionsgemisch trotz zusätzlicher Erwärmung bei 35 °C zu einem festen, nicht weiter bearbeitbarem Harz. Die zweite Umsetzung fand in Dichlormethan/Pyridin (1:1) als Lösungsmittel statt und konnte dünnschichtchromatographisch verfolgt werden. Das Reaktionsgemisch wurde wie bisher aufgearbeitet und zur massenspektrometrische Analyse (ESI-MS) gegeben. In keiner der fünf Fraktionen konnte das gewünschte Produkt identifiziert werden. Die höchste Masse in der ersten Fraktion war m/z = 459.2 amu, die Masse von m/z = 471.2 amu [2M+Na]⁺ für M =224 g/mol wurde erneut gefunden. Die Massen konnten wieder keinem Fragment zugeordnet werden.

Die selektive Umsetzung primärer, sekundärer und tertiärer Alkohole durch Benzyl-2,2,2-trichloroacetimidat (<u>166</u>) wurde in der Arbeitsgruppe von C. SCHMECK¹⁷¹ erfolgreich gezeigt und wurde zur Standardmethode für Benzoylierungs-Reaktionen

besonders bei basenempfindlichen Alkoholen. In dem postulierten Reaktionsmechanismus wird das Benzyltrichloroacetimidat (<u>166</u>) in einem ersten Reaktionsschritt durch die Säure (z.B. *para*-Toluolsulfonsäure, *p*TSA) protoniert. Die hoch reaktive Spezies (<u>167</u>) reagiert rasch mit dem Alkohol zu dem Benzylether (<u>168</u>) und Trichloroacetamid (<u>169</u>). In dem letzten Schritt wird das Proton freigesetzt und kehrt zu dem katalytischen Zyklus zurück (Abbildung 103).

Abbildung 103: Die mechanistischen Überlegungen zu der Benzoylierung von Alkoholen nach C. SCHMECK.

Die Veresterung des Chartreusins ($\underline{23}$) mit 2,2,2-Trichloroacetimidat ($\underline{166}$) wurde mittels DC-kontrolliert und nach B.5.5.AAV2 aufgearbeitet und chromatographisch aufgereinigt. Eine gezielte Umsetzung hat nicht stattgefunden und ergab nur ein Zersetzungsprodukt (Rf-Wert = 0.75).

Durch die Umsetzung Aromaten mit elementarem Brom (Br₂) gelang des röntgenstrukturanalytisch die absolute Stereokonfiguration des Luisols A. Benzoisochromaguinons, zu bestimmen. ¹⁷² Die Versuche einer Bromierung des Chartreusins 5 %iger Bromlösung in Dichlormethan oder mit NBS (N-Bromosuccinimid) schlugen fehl. Dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle zeigte keine Umsetzung. Eine andere Möglichkeit der Veresterung von tertiären Alkoholen stellt die Umsetzung mit den Biokatalysatoren. Die Lipasen (E.C. 3113) und Carboxyesterasen (E.C. 3.1.1.1) sind häufig eingesetzte Agenzien mit einer breiten Akzeptanz von nicht-natürlichen Substraten. Sie können ausreichend stabil in organischen Lösungsmitteln sein und besitzen eine gute bis sehr gute Stereoselektivität. Besonders die Lipasen haben einen festen Platz in der organischen Synthese errungen; die meisten Enzyme verlieren ihre Aktivität in organischen Solventien oder benötigen für die Umsetzung die Zugabe von Puffern. ¹⁷³ Daher spielt dieser Nebeneffekt in den organischen Lösungsmitteln keine Rolle. 174, 175 Für die Zwecke der hier angewendeten enzymatischen Veresterung der Substrats 115 wurden zwei Enzyme aus der großen Lipase-Familie ausgewählt, die Porcine pancreatic Lipase (PPL) und Candida

antartica Lipase B (CAL B). Candida antartica Lipase B schien besonders für die Umsetzung polyhydroxylierte Naturstoffe, wie Steroide und Glykoside geeignet zu sein. Ihre strukturelle Besonderheit ist es, dass es für die CAL B in der Primärsequenz (DNA und Aminosäuren) bisher keinen Homologen bei den anderen bekannten Lipasen gibt. Zum Vergleich: Hinsichtlich der Aminosäurensequenz ist CAL A mit der Lipase aus Candida rugosa (CRL) verwandt, in der bilden Serin-Histidin-Glutamin die Bindungsstelle bilden. In der aktiven Seite des CAL B's dagegen ist Serin-Histidin-Asparagin als katalytische Einheit eingebunden. Die Struktur besitzt in der offenen Form eher einen eingeschränkten Zugang zur aktiven Seite. CAL B besitzt eine hohe Substratspezifität für tertiäre Alkohole und einen hohen Grad an Stereospezifität für chirale, tertiäre Alkohole und deren Estern bei (α-Terpineol, Linalool). Inalool).

Abbildung 104: Vorgeschlagenes Reaktionsmechanismus von CAL B und des Alkohols von <u>119</u> (6-OH).

Candida antartica Lipase B gehört der Klasse der Serin α/β -Hydrolasen an, die reversible Spaltungen von Estern in Alkohole und Carbonsäuren katalysiert. Dabei nimmt das aktive Zentrum $\underline{170}$ bevorzugt eine tetrahedrale Konformation an $(\underline{171})$. Das negativ geladene

Sauerstoffanion ist durch Wasserstoffbrücken innerhalb des Enzyms fixiert. Die synthetische Aktivität und Stabilität der α -Helix und des β -Stranges der Lipase B bleiben im Toluol bzw. Hexan erhalten. 180

In dem parallelen Ansatz wurden die Modellreaktionen von β-Naphtol (<u>151</u>) und *L*-Rhamnose durchgeführt. Mit 3',4'-*O*-Benzylidenchartreusin (<u>115</u>) als Alkohol und Benzoesäure nach den Reaktionsbedingungen in B.5.5.AAV4 hat es auch nach 5 d keine Reaktion ergeben. Mittels dünnschichtchromatographischen Kontrolle wurden keine neu entstandenen Verbindungen detektiert. Die aufgearbeiteten Reaktionsansätze ergaben die eingesetzten Edukten wieder. Der wiederholte Veresterungsversuch mit PPL resultierte mit gleichem negativen Ergebnis.

4.7 Zusammenfassung und Diskussion

Chartreusin (23) ist ein potentes Antitumor-Antibotikum. Eine klinische Anwendung wurde auf Grund seiner schlechten Resorbierbarkeit bisher nicht weiter verfolgt. Versuche einer strukturellen Veränderungen durch semisynthetische Ansätze von KON ET AL. führten zu weiteren potenten Derivaten. Jedoch konnte nur für 6-O-(3-Ethoxypropionyl)-3',4'-O-exobenzylidenchartreusin (128), 6-O-(N,N-Dimethylglycyl)-3',4'-O-exo-benzylidenchartreusin (131) und 3'4'-O-exo-Benzylidenchartreusin (115b) eine reproduzierbare, antitumorale Aktivität erzielt werden. Diese Befunde deuteten auf eine mögliche klinische Anwendung des Derivats 115 in der Zukunft. KAMITORI ET AL. untersuchten die Struktur des Chartreusinderivats <u>115</u> röntgenkristallographisch im Bezug auf die Interkalation mit DNA. Dabei stellte sich heraus, dass die Disaccarid-Einheit eine entscheidende Rolle für die sequenzspezifische Basenpaarerkennung von 115 in der DNA spielt. Die 2003 veröffentlichte Kristallstruktur von 115 zeigt jedoch ein glykosidisches Gerüst, das nicht mit der bisher bekannten Struktur übereinstimmte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die Struktur des Chartreusins (23) durch eine erneute Kristallisation des Reinstoffs oder eines semisynthetischen Derivats zu überprüfen. Eine genaue Strukturanalyse des glykosidischen Teils von **23** sollte zu einem besseren Verständnis der Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) beitragen. Im Laufe dieser Arbeit wurden diverse Beiträge zur Aufklärung des Zuckerrestes unternommen und folgende Erkenntnisse gewonnen:

1. Das semisynthetische Derivat 6-O-Benzoyl-3',4'-O-benzylidenchartreusin (<u>149</u>) ist noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Zunächst wurde Chartreusin

- (23) in 3',4'-O-Benzylidenchartreusin (115) umgewandelt. Das Problem der schlechten Löslichkeit des isolierten Naturstoffes wurde durch die Anwendung bekannter Synthesereaktionen unter hier optimierten Bedingungen gelöst. Die Schützung der 3'- und 4'-Position an der D-Fucose führte zur besseren Handhabbarkeit der Substanz und dadurch zu einem praktikablen Ausgangspunkt für Derivatisierungen. Die weitere nachfolgende Reaktion von 3',4'-*O*-Benzylidenchartreusin (115) zum 6-*O*-Benzoyl-3',4'-*O*-benzyliden-Derivat 149 wurde als einfache, effiziente und unter milden Bedingungen durchführbare Reaktion in organischen Lösemitteln optimiert. Die Umsetzung verlief zufriedenstellend (40%). In den angewandten Synthesemethoden zeigten sich die hergestellten Isomere des 3',4'-endo/exo-Benzylidenchartreusins (115a/b) durch Einsatz üblicher analytischer Methoden als schwer voneinander trennbar. Dies führte zur Hypothese, dass sich die thermodynamisch günstigere endo-Form bei der weiteren Umsetzung mit aliphatischen und aromatischen Carbonsäuren bildet. Daher wurde 115 in den weiteren Reaktionen als Gemisch beider Isomere eingesetzt mit der Annahme, dass sich ausschließlich oder zumindest im Überschuss das bevorzugte Derivat bildet. Anhand des Vergleichs mit den publizierten ¹H-NMR-Daten konnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob sich der endo- oder exo-Zustand gebildet hat. Die Protonenintensitäten des Derivats 115 sprechen für die Bildung eines Isomers. Den auffälligste Unterschied stellt die chemische Verschiebung des anomeren Protons der D-Digitalose dar (1"-H); wo das Signal der endo-Form im Protonenresonanzspektrum bei $\delta_{\rm H} = 5.76$ zu erwarten ist, findet es sich bei der exo-Form bei $\delta_H = 5.94$ wieder. Das anomere Proton wurde anhand der ¹H-NMR-, ¹³C-NMR-, HMQC-, HMBC- und COSY-Spektren bei $\delta_H = 6.05$ zugeordnet, was folglich einem exo-Isomer entspricht.
- 2. Die zweidimensionale Korrelationen der COSY-/HMBC-Spektren konnten eindeutig beweisen, dass die Benzoylierung nicht an der Zucker-Einheit passierte, sondern ausschließlich am Chartrarin-Aglykon (109).
- 3. Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Derivatisierungsversuche an Chartreusin (23) bzw. 3',4'-O-Benzylidenchartreusin (115) durchgeführt. Die verschiedenen Kristallisationsansätze mit Chartreusin (23) sind wegen schlechter Löslichkeit der Subtanz nicht erfolgreich gewesen. Durch Einführung eines Schweratoms wie Brom kann man aufgrund der höheren Auflösung der auftretenden Streueffekte die

absolute Stereochemie eines Moleküls im Kristall ableiten. Aus diesem Grund wurde die Kupplung der aglykonischen 6-Hydroxygruppe von Chartreusin (23) mit ortho- (155) bzw. para-Brombenzoesäure (156) angestrebt, die jedoch ebenso wie eine Veresterung mit Benzoesäure (157) sich als nicht erzielbar herausstellte. Die mangelnde Löslichkeit des Chartreusins (23) ist immer wieder eines der Hauptprobleme gewesen. Aufgrund der besseren Löslichkeitseigenschaften von 3',4'-O-Benzylidenchartreusin (115) wurden weitere Umsetzungen mit diesem Derivat vorgenommen. Jedoch zeigten sich die Veresterungen mit *ortho-* (155) und para-Benzoesäure (156), 3,5-Dinitrobenzoesäure (159), 3-Indoyl-essigsäure (<u>160</u>), 5-Brom-3-indoyl-essigsäure (<u>161</u>), Ferrocencarbonsäure (<u>162</u>) und Benzyl-2,2,2-trichloracetimidat (166) als nicht realisierbar. Auch die Gabe des Zusatzkatalysators 1-Hydroxybenzotriazol (163) führte nicht zur gewünschten Umsetzung zu einem 6-O-geschützten 3',4'-O-Benzylidenderivat. Nach Versetzen des Aromaten mit elementarem Brom (Br₂) oder mit N-Bromosuccinimid (NBS) waren lediglich Zersetzungsprodukte nachweisbar. Schließlich führten auch die Versuche zur enzymatisch katalysierten Veresterung mit Candida antartica Lipase B (CAL B) und *Porcine pancreatic* Lipase (PPL) nicht zu positiven Ergebnissen. Die Suspension, die sich während der Reaktion bildete, konnte bei den kleinen 150 mg) möglicherweise ausreichend Reaktionsansätzen (unter nicht durchgemischt werden. Es ist auch vorstellbar, dass die angewendeten Enzyme das Substrat nicht akzeptiert haben.

4. Durch 2D-NMR-Spektroskopie ist es nicht möglich, eine genaue Aussage über Zuckerkonfiguration zu treffen. Für eine eindeutige Aufklärung des Disaccharid-Rests bedarf es einer Kristallstruktur, die noch in Arbeit ist.

Das Chartreusin (23) bleibt somit weiterhin eine Herausforderung für die synthetische Chemie. Die Entwicklung eines effizienten semisynthetischen Ansatzes könnte zu Fortschritten auf dem Weg zur Chemoaktivierung und dadurch zu klinisch einsetzbaren Derivaten helfen. Dabei muss auch die Struktur des Disaccharidteils von 23 neu überdacht werden.

4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Wirkstoffproduktion aus extremophilen Mikrorganismen

Im Rahmen des DBU-Verbundprojektes zur Untersuchung extremophiler Mikroorganismen auf ihr biologisches und chemisches Potential, wurden 93 Isolate und Stämme kultiviert und auf ihre biologische Wirksamkeit getestet. Die Wirkstoffsuche wurde durch den Einsatz heterologer Expressionssysteme unterstützt. Das wichstigste Auswahlkriterium war die reproduzierbare Aktivität der Extrakte gegen einen oder mehrere Indikatororganismen sowie eine ausgeprägte zell-toxische Wirkung auf CHO-K1 Tumorzellen und ein auffälliges chemisches Metabolitenmuster. Aus den Ergebnissen der Extraktprofilierung wurden zehn Stämme ausgewählt. Diese wurden einer intensiven Bearbeitung unterzogen, um ihre Wirkstoffproduktion zu erschließen.

In die Priorisierungsrunde wurden die Stämme aufgenommen, die eine signifikante biologische Aktivität aufweisen und sich von den verbleibenden Stämmen bezüglich ihrer interessanten chemischen Profilierungsdaten unterscheiden.

CH₃
O
24

In dem aktivitätsbasierten Extraktscreening fiel der Stamm 3-001 (*Streptomyces sp.*) durch seine sehr gute biologische Aktivität und leichte Zytotoxizität auf. Die Verbindung wurde als N^b -Acetyltryptamin (24) identifiziert.

Ebenfalls konnten Strukturfragmente einer Verbindung zugeordnet und eine alternative Verknüpfungsmöglichkeit dieser Molekülfragmente vorgeschlagen werden. Abschließende Strukturaufklärung war bisher nicht möglich.

Vorschlag I: Das Molekül mit Dipeptid-Einheit Phe-Lys sowie Valin als endstehende Aminosäure.

Vorschlag II: Das Molekül mit Dipeptid-Einheit Glu-Lys sowie Valin als entstehende Aminosäure oder mit einem Verknüpfungsfragment zwischen Dipeptid Phe-Lys und Valin.

Der Stamm 3-002 (*Streptomyces* sp), der als potentester Produzent eingestuft wurde, zeichnete sich durch eine besonders hohe zytotoxische Aktivität und ein auffälliges Metabolitenmuster aus. Aus dem Kulturextrakt dieses Stammes ließen sich vier bekannte Metabolite nachweisen: Adenosin (<u>33</u>), Cytidin (<u>34</u>), 1*H*-Indol-3-carbonsäure (<u>38</u>) und Indol-3-milchsäure (<u>39</u>).

Der Stamm 3-015 (unspezifiziertes Bakterium) wurde hinsichtlich einer spezifischen antimikrobiellen Wirksamkeit gegen gram-positive Bakterien untersucht. Ein auffälliger Metabolit befand sich in den Kulturextrakt mit den positiven Testergebnissen. Bei dem isolierten Stoff handelte es sich wieder um den N^b -Acetyltryptamin (24).

Insgesamt konnten sechs bekannte Metabolite isoliert werden. Die untersuchten Produzenten 3-001 und 3-002 stammen aus der Familie der Streptomyceten, einer der größten Quelle vieler Naturstoffe.

Aus den weiteren untersuchten Stämmen und Extrakten zweier Priorisierungsrunden, 0-024 (Acidianus ambivalens), 0-029 (Thermoplasma acidophilum), 0-047 (Acidithiobacillus caldus), 1-004 (Fervidobacterium pennivorans) und 3-018 (unspezifiziertes Bakterium) konnten die Stoffe trotz großen Fermentationsansatzen (5 L, 10 L, 13 L, 20 L) nicht isoliert werden, da sie entweder in zu kleinen Mengen produziert wurden oder sie einen besonders schwierigen chromatographisches Trennungsgang erforderten.

Studien zur Biosynthese einen neuen Polyketides mit Spirotetron-Struktur

Der von I. SATTLER (HKI Jena) erhaltene Stamm GT 19961033 wurde einem intensiven chemischen Screening und Vorläufer-dirigierter Biosynthese unterzogen, mit dem Ziel die Ausbeute an dem neuen Spirotetron 22 zu steigern und seinen biosynthetischen Ursprung zu erforschen. Mittels Produktionsoptimierung in Haferkleie-Nährmedium mit Glycerin- und Spurenelementlösung 11-Zusatz und der Optimierung der Isolierungsstrategie mittels moderner Trennverfahren (präparative HPLC-MS-DAD) ist es gelungen, schwer detektierbares Spirotetron 22 zu isolieren.

Aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften gehört das Spirotetron 22 zu der Substanzklasse der Abyssomicine und damit der Familie Tetrocarcin-verwandten Antibiotika (wie z.B. Chlorotricin (57)). Den Überlegungen zur Biosynthese des

Spirotetrons $\underline{22}$ zufolge, sollte sein Kohlenstoffgerüst analog zur Chlorotricin ($\underline{57}$) aus Acetatund Propionat-Einheiten aufgebaut werden, die Verbrückung der Tetronsäure-Einheit sollte aus Glycerin stammen. Die ersten Fütterungsexperimente mit Isotopen-markierten Glycerin ([U- 13 C₃]Glycerin) haben suppressiv auf die Produktion des Spirotetrons $\underline{22}$ gewirkt. Weitere Biogenese-Untersuchungen sind eingeplant.

Das Metabolitenspektrum des Stammes GT 19961033 wurde während der biosynthetischen Studien analysiert. Es konnten vier literaturbekannte Verbindungen Naphthoquinomycin C

(Naphthomycin H) (<u>101</u>), Naphthomycin J (<u>102</u>) und Benzoxazomycin (<u>104</u>) sowie das Dipeptid Pro-Val (<u>107</u>) isoliert und identifiziert werden.

6.

Derivatisierung ausgewählter Naturstoffe

Zur Aufklärung der Disaccharid-Konfiguration wurde in dieser Arbeit die Züchtung eines Kristalls von Chartreusin (23) oder seines Derivats für eine Röntgenstrukturanalyse angestrebt. Die Versuche eines Kristallisationansatzes mit Lösungsmittelgemischen wie Aceton/Hexan, Methanol/Dioxan, Aceton/Ethanol (1:1)/ n-Heptan, Ethanol/Cyclohexan, Essigester/Cyclohexan und Essigester/Methanol mit Chartreusin (23) blieben wegen schlechter Löslichkeit des Chartreusins (23) ohne Erfolg. Die Kupplungen von 23 mit den ortho- (155), para- (156) und Benzoesäure (157) sind nicht erfolgreich gewesen.

Um die Kristallisationsfähigkeit der Verbindung zu erhöhen, wurde Chartreusin (23) erfolgreich mit Benzaldehyddimethylacetal (148) zum 3',4'-O-Benzylidenchartreusin (115) umgesetzt.

Die Veresterungen von 115 mit ortho- (155) und para-Benzoesäure (156), sowie mit 3,5-Dinitrobenzoesäure (159), 3-Indoyl-essigsäure (160), 5-Brom-3-indoyl-essigsäure (161), Benzyl-2,2,2-trichloroacetimidat Ferrocencarbonsäure (162)und (166)mit 1-Hydroxybenzotriazol 6-O-substituierten (163)haben nicht weiteren zu 3',4'-O-Benzylidenderivaten geführt.

In einer Benzoylierungsreaktion von 3',4'-O-Benzylidenchartreusin (<u>115</u>) mit Benzoylcyanid (<u>150</u>) gelang es ein neues, bis dato nicht beschriebenes Derivat zu synthetisieren, 3',4'-O-Benzyliden-6-O-benzoylchartreusin (<u>149</u>). Das Kristallisationsansatz des Derivats <u>149</u> in Aceton (150 μ L) mit D₂O (20 μ L) wurde vorgenommen.

B. Experimenteller Teil

5.1 Instrumentelle Analytik

Massenspektren: EI-MS: *Finnigan* MAT 95, 70 eV, Hochauflösung mit Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz aufgenommen; ESI-MS: *Finnigan* LC-Q; DCI-MS: *Finnigan* MAT 95, 200 eV (Reaktandgas: NH₃).

Infrarotspektren (IR): Alle IR-Spektren wurden mit einem FT-IR-Spektrometer der Firma *Perkin-Elmer* Modell 1600 als KBr-Preßlinge gemessen, sh = Schulter.

Elektronen Spektren (UV): Alle Elektronenspektren wurden mit einem Spektrometer der Firma *Varian* Modell Cary 3E gemessen. Die Wellenlänge λ ist in [nm] angegeben, der molare Extinktionskoeffizient ε hat Dimension [1000 cm² mol¹¹], sh = Schulter; Methanol/HCl bzw. Methanol/NaOH: zu 2 mL methanolischer Lösung wurde jeweils ein Tropfen 1 m HCl bzw. 1 m NaOH gegeben.

¹H-NMR-Spektren: Varian Inova 600 (600 MHz), Varian Inova 500 (500 MHz), Varian Mercury 300 (300 MHz), Varian Unity 300 (300 MHz), Bruker AMX 300 (300 MHz). Chemische Verschiebungen sind in δ-Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internen Standard angegeben, Kopplungskonstanten J sind in Herz [Hz]. Alle ¹H-NMR-Spektren wurden als Spektren erster Ordnung angesehen und interpretiert, soweit das Signalaufspaltung und Kopplungskonstanten angegeben sind. Es wurden folgenden Abkürzungen benutzt:

s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dublett, dd = Dublett von Dublett von Dublett, t = Triplett, q = Quartett, q = Quar

¹³C-NMR-Spektren: Varian Inova 600 (150.8 MHz), Varian Inova 500 (125.7 MHz), Varian Mercury 300 (75.5 MHz), Varian Unity 300 (75.5 MHz), Bruker AMX 300 (75.5 MHz), Varian Mercury 200 (50.3 MHz). Alle chemischen Verschiebungen sind in δ-Werten (ppm) bezüglich des jeweiligen Lösungsmittels als internen Standard angegeben. Multiplizitäten wurden aus J_{CH} -Korrelationen oder APT-Experimenten abgeleitet. Die folgenden Abkürzungen wurden benutzt:

 $APT = \underline{A}ttached \underline{P}roton \underline{T}est$, s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett.

2D-NMR-Spektren: ¹H-¹H-COSY (¹H, ¹H-<u>Correlated Spectroscopy</u>), HSQC (<u>Heteronuclear Single Quantum Coherence</u>), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), HMBC

(<u>Heteronuclear Multiple Bond Conectivity</u>), **NOESY** (<u>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</u>), **TOCSY** (<u>Total Correlation Spectroscopy</u>).

5.2 Chromatographische Methoden

Lösungsmittel: Die Lösungsmittel für die Dünnschicht- und Säulenchromatographie wurden im Labor destilliert. Für HPLC-Untersuchungen dienten analysenreine Lösungsmittel (*Acros*, *Merck*) sowie bidestilliertes Wasser. Dieses wurde zuvor mit Helium (20 min) und anschließend im Ultraschallbad (15 min) entgast.

Dünnschictchromatographie: *Merck* HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254} (10 × 10 cm), Schichtdicke 0.25 mm; *Merck* DC-Alufolien KG 60 F_{254} (20 x 20 cm), Schichtdicke 0.2 mm, *Merck* DC-Alufolien RP-18 F_{254} (20 × 20 cm), Schichtdicke 0.2 mm.

Sprühreagentien: Nach *Merck*, Anfärbereagentien für die Dünnschichtchromatographie^[Lit.]. Die DC-Platten wurden nach dem Ansprühen auf ca. 100 °C erwärmt.

Anisaldehyd (Nr. 21): Zu 1.0 mL Anisaldehyd wurde eine Lösung aus 85 mL Methanol, 10 mL Eisessig und 5 mL konz. Schwefelsaure gegeben.

Erlich-Ragenz (Nr. 91): 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wurde in einer Lösung aus 25 mL Salzsäure (36%) und 75 mL Methanol gelöst.

Orcin-Sprühreagenz (Nr. 120-122): 1 g Eisen(III)-chlorid wurde in 100 mL Schwefelsäure (10%) gelöst und im Verhältnis 1:1 mit einer Orcinlösung (6% in Ethanol) gemischt.

Adsorberharz: *Serva* Amberlite[®] XAD-2, *Merck* und *Rohm und Haas* Amberlite[®] XAD-16, Amberchrom[®]CG161C, *Rohm und Haas*.

Säulenchromatographie: Für die Schwerkraftsäulen wurde *Macheray-Nagel, ICN* Kieselgel Körngröße 60, 200-50 μm, *Merck* Kieselgel RP-18 Körngröße 60, 40-63 μm und *Fluka* Sephadex[®] LH-20 verwendet; Flash-Säule wurde mit *Macheray-Nagel* Kieselgel Korngröße 60, 40-63 μm aufbereitet.

Mitteldruckchromatographie: Knauer Pumpe, *Merck* Lober[®] B Säule RP-18 Körngröße 40-63 μm.

I. Gekoppeltes HPLC-MS-DAD-Verfahren:

A. HPLC-MS-DAD: *Flux Instruments* Rheos 4000 Pumpe und Mischkammer; *Flux Instruments* ERC 3415α Entgaser; *Jasco* 851-AS Autosampler mit variabler Aufgabeschleife 0-100 μL; *Finnigan* Surveyr PDA-Detektor; *Finnigan* LC-Q Massendetektor; *Flux*

Instruments Janeiro Steuersoftware; *Finnigan* XcaliburTM Version 1.3 Chromatographie-und Steuersoftware PDA.

- **1. Säule 1**: *Grom* Superspher-100 RP-18 endcapped, 4 μ m, 100 \times 2 mm, mit integrierter Vorsäule; Flussrate: 0.3 mL/min.
- a) **Programm 1** (Standardprogramm für HPLC-MS-DAD): Laufmittelsystem: Wasser (A)/Methanol (B), jeweils mit 0.1% Ameisensäure; Gradient: von 20% B auf 100% B in 20 min, 5 min bei 100% B, von 100% auf 20% B in 2 min, 5 min bei 10% B, Flussrate: 0.3 mL/min.

II. Analytisches HPLC-Verfahren:

- **A. HPLC 1**: *Jasco* Pumpe PU-2080plus; *Jasco* Mischkammer LG-2080-02; *Jasco* Entgaser DG-2080-53; *Jasco* PDA-Detektor MD-210plus; *Jasco* Autosampler AS-2055plus mit *Rheodyne* 100 μL Auftragsschleife; *Jasco* Säulenofen CO-2065; *Jasco* Fraktionssammler SF-3120; *Jasco* BorwinTM Chromatographiesoftware mit *Jasco* BorwinTM PDA Version 1.50; *Jasco* BorwinTM Steuersoftware HSS-2000 Version 3.5.2.
- **B. HPLC 2**: *Kontron* 322 Pumpe; Mischkammer: *Kontron* HPLC 360; *Kontron* 440 Dioden-Array-Detektor; *Kontron* 360 Autosampler mit analytischer Auftragsschleife; *Kontron* Kromasystem 2000TM Software Version 1.60.
- **1. Säule 2**: *Phenomenex*[®] Aqua 5μ C18, 200 Å, 5μ m, 250×4 mm; Flussrate: 0.8 mL/min.
- **2. Säule 3**: *Knauer* Nucleosil C8, 5 μ m, 250 \times 3 mm, mit integrierter Vorsäule; Flussrate: 0.5 mL/min.
- 3. Säule 4: Phenomenex® Ultracarb 5µ ODS, 250 × 4.6 mm; Flussrate 0.8 mL/min.
- **4. Säule 5**: *Macheray-Nagel* Nucleodur 5 μ C18 EC endcapped, 100 Å, 5 μ m, 250 \times 3 mm, Flussrate: 0.5 mL/min.
- **5. Säule 6**: *Waters* XTerra[®] MS C18 endcapped, 5 μ m, 50 \times 3 mm, mit integrierter Vorsäule; Flussrate: 1.0 mL/min.
- **a) Programm 2** (Standardprogramm für die Analytik): Laufmittelsystem: Wasser (A)/Acetonitril (B), jeweils mit 0.1% TFA; Gradient: von 10% B auf 100% B in 20 min, 5 min bei 100% B, von 100% auf 10% B in 2 min, 5 min bei 10% B, Flussrate 0.3 mL/min.

III. Semipräparatives HPLC-Verfahren:

A. HPLC 1: Jasco Pumpe PU-2080plus; Jasco Mischkammer LG-2080-02; Jasco Entgaser

- DG-2080-53; *Jasco* PDA-Detektor MD-210plus; *Jasco* Autosampler AS-2055plus mit *Rheodyne* 100 μL Auftragsschleife; *Jasco* Säulenofen CO-2065; *Jasco* Fraktionssammler SF-3120; *Jasco* BorwinTM Chromatographiesoftware mit *Jasco* BorwinTM PDA Version 1.50; *Jasco* BorwinTM Steuersoftware HSS-2000 Version 3.5.2.
- **1. Säule 7**: *Grom* Superspher-100 RP-18 endcapped, 4 μ m, 100 \times 8 mm; Flussrate: 2.5 mL/min.
- **2. Säule 8**: *Phenomenex*® Aqua 5μ C-18, 200 Å, 5μ m, 250×10 mm; Flussrate: 4.0 mL/min.
- **3. Säule 9**: *Macheray-Nagel* Nucleodur 5μ C18 endcapped, 100 Å, 5 μ m, 250×8 mm; Flussrate 2.5 mL/min.
- **a) Programm 3**: Laufmittelsystem: Wasser (A)/Methanol (B), jeweils mit 0.05% Ameisensäure; Gradient: von 20% B auf 100% B in 20 min, 5 min bei 100% B, von 100% auf 20% B in 2 min, 5 min bei 10% B, Flussrate 2.5 mL/min.
- **b) Programm 4**: Laufmittelsystem: Wasser (A)/Acetonitril (B), jeweils mit 0.05% Ameisensäure; Gradient: von 20% B auf 100% B in 20 min, 5 min bei 100% B, von 100% auf 20% B in 2 min, 5 min bei 10% B, Flussrate 2.5 mL/min.
- **c) Programm 5**: (isokratisch): Laufmittelsystem: Wasser (A) mit 0.05% Ameisensäure /Methanol (B) mit 0.05% Ameisensäure; Gradient: isokratische Trennung mit 75% B in 30 min.; UV-Detektion bei 220 nm; Flussrate 2.5 mL/min.

IV. Präparatives HPLC-Verfahren:

- **A. HPLC 1**: *Jasco* Pumpe PU-1587; *Jasco* Mischkammer 1000 μL; *Jasco* UV-Detektor UV/VIS 1575; *Rheodyne* manuelles Probenaufgabeventil mit 2000 μL Aufgabenschleife; *Jasco* BorwinTM Software Version 1.50; *Jasco* Steuersoftware HSS-2000 Version 3.5.2.
- **B. HPLC 2**: *Waters Aquity* UPLCTM 2996 PDA Detektor; *Wates* 2690D/2695D Separations Module Performance; *Waters* 515 Pumpe; *Waters* 2525 Binary Gradientenmodul; *Waters* PrepTM 2000 Pumpe; *Waters* FractionLynxTMMS mit 2767 Autosampler für Inject/Collect/Re-Inject; *Waters* ZQTM Massendetector; *MassLynx* Mass Spectrometry Software.
- **1. Säule 10**: *Grom* Superspher-100 RP-18 endcapped, 4 μ m, 100 \times 20 mm, Vorsäule: *Grom* Saphir C18 110 2/pc, 5 μ m, 20 x 10 mm; Flussrate: 20 mL/min.
- **2. Säule 11**: *Phenomenex* Aqua 5μ C-18, 200 Å, $5\mu m$, 250×20.21 mm; Flussrate: 20 mL/min.
- 3. Säule 12: *Macheray-Nagel* Nucleodur 5 μ C18 VP endcapped, 100 Å, 5 μ m, 250 \times 21 mm; Flussrate: 20 mL/min.

- **4. Säule 13**: *Waters* XTerra[®] MS C18, 5 μ m, 50 \times 19 mm, mit integrierter Vorsäule; Flussrate: 20 mL/min.
- **a) Programm 6**: (isokratisch): Laufmittelsystem: Wasser (A) mit 0.05% Ameisensäure /Methanol (B) ohne Säure; Gradient: isokratische Trennung mit 65% B in 38 min.; UV-Detektion bei 232 und 271 nm; Flussrate 10 mL/min.
- **b) Programm** 7: (Trennung des Spirotetrons (<u>9</u>)): Laufmittelsystem: Wasser (A) mit 0.05% Ameisensäure /Methanol (B) ohne Säure; Gradient: von 5% B in 6 min auf 30% B, 3 min auf 30%, in 9 min auf 40% B, 3 min auf 40%, in 12 min auf 50% B, 3 min auf 50%, in 20 min auf 100% B, 5 min auf 100% B, in 3 min auf 5% B, 5 min auf 5%; UV-Detektion 232 nm; Flussrate 17 mL/min.
- **c) Programm 8**: Laufmittelsystem: Wasser (A)/Methanol (B), jeweils mit 0.05% Ameisensäure; Gradient: von 20% B auf 100% B in 20 min, 5 min bei 100% B, von 100% auf 20% B in 2 min, 5 min bei 10% B, Flussrate 10 mL/min.

5.3 Mikrobielle Methoden

Schüttler: *Braun* Inkubationsschüttelschrank BS4; *Braun* Certomat[®] RM; *Braun* Certomat[®] BS1.

Fermenter: Airlift-Fermenter (10 L), Quelle: *Uni Dortmund, Fischer & Porter* Gasflowmeter (45711M), *The Analytical Development Co. Ltd.* CO₂-Analysator, *Ingold* O₂-Elektrode. *Braun* Biostat E (1.5 L), *Braun* Biostat E (10 L), Belüftung 1 vvm.

Verwendete Nährmedien:

Allgemeines: Die Nährmedien wurden 30 min bei 121 °C autoklaviert. Die Angaben von Nährmedienbestandteilen beziehen sich auf 1 L Medium. Es wurde Leitungswasser verwendet ("Göttinger-Bedingungen"). Die pH-Wert wurde vor der Sterilisation mit 0.5 N NaOH bzw. 1 N HCl eingestellt.

Nährmedienbestendteile: Agar: *Difco*; Bacto Tryptone-Pepton; *Difco*; Calciumcarbonat: *Merck*; Caseinpepton: *Merck*; Cornsteep powder: *Marcor*; Fleischpepton: *Merck*; *D-*(+)-Glucose: *Merck*; Glycerin: *AppliChem*; Hafermehl (Holo® Hafergold): *Neuform*; Hefe-Extrakt: *Gibco*; Malzextrakt: *Merck*; *D-*Maltose: *Fluka*; *D-*Mannit: *Riedel-deHaën*; Stärke: *Merck*; Stärke aus Kartoffeln: *Roth*; Sojamehl (fettarm): *Henselwerk GmbH*.

Nährmedien für Bakterienkulturen:

M2-Medium (NM 1): Malzextrakt 10 g, Hefeextrakt 4 g, D-(+)-Glucose 4 g, CaCO₃ 0.3 g; pH = 7.0.

SGG-Medium (NM 2): D-(+)-Glucose 10 g, Glycerin 10 g, Stärke 10 g, Cornsteep Powder 2.5 g, Caseinpepton 5 g, Hefextrakt 2 g, NaCl 1 g, CaCO₃ 3 g, pH = 7.3.

SGG-Medium mit Spur 11 (NM 3): D-(+)-Glucose 10 g, Glycerin 10 g, Stärke 10 g, Cornsteep Powder 2.5 g, Caseinpepton 5 g, Hefextrakt 2 g, NaCl 1 g, CaCO₃ 3 g, Spur 11 2.5 mL, pH = 7.3.

SM-Medium (NM 4): Sojamehl (entfettet) 20 g, D-Mannit 20 g, pH = 7.0.

SM-Medium mit Spur 11 (NM 5): Sojamehl (entfettet) 20 g, D-Mannit 20 g, Spur 11 2.5 mL, pH = 7.0.

SM-Medium mit Spur 11 und mit Glycerin (**NM 6**): Sojamehl (entfettet) 20 g, *D*-Mannit 20 g, Glycerin 0.5 g, Spur 11 2.5 mL, pH = 7.5.

Hafer-Medium (NM 7): Haferkleie 20 g, Spur 11 2.5 mL, pH = 7.5.

Hafer-Medium mit Glycerin und Spur 11 (NM 8): Haferkleie 20 g, Spur 11 2.5 mL, Glycerin 0.5 g, Spur 11 2.5 mL, pH = 7.5.

Medium S (NM 9): Stärke 10 g, Glycerin 4 g, Caseinpepton 4 g, Hefeextrakt 0.5 g, Fleischextrakt 0.5 g, Leberextrakt 0.5 g, NaCl 1 g, pH = 7.0.

Medium S mit Spur 11 (NM 10): Stärke 10 g, Glycerin 4 g, Caseinpepton 4 g, Hefeextrakt 0.5 g, Fleischextrakt 0.5 g, Leberextrakt 0.5 g, NaCl 1 g, Spur 11 2.5 mL, pH = 7.5.

Isotopenmarkierte Verbindungen: [U-¹³C₃]Glycerin wurde von der Firma *Chemotrade* von der Chemiehandels-Gesellschaft MGbH Leipzig bezogen. ¹³C-Anreicherung mit markiertem Kohlenstoff betrug 99%.

Spurenelementlösung (**Spur 11**) für 1 L: $ZnSO_4$ 0.1 g, $CuSO_4 \times 5 H_2O$ 25 mg, $Na_2B_4O_7 \times 10 H_2O$ 20 mg, $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$ 10 mg, $CoCl_2$ 4 mg, $CaCl_2 \times 2 H_2O$ 3.0 g, Fe(III)-citrat 1.0 g, $MnSO_4$ 0.2 g, pH = 6.8.

Stammhaltung auf Agarplatten durch Verdünnungsausstrich: Die Stammhaltung erfolgte auf Agarplatten SM-Nähremediumedium und M2-Nährmediumedium. Die Platten wurden mittels einer sterilen Impföse zunächst mit wenig Sporen beimpft. Die Agarplatten wurden für 4-7 Tage bei 28 °C inkubiert. Durch erneutes Überimpfen auf neue Agarplatten wurden Kolonien vereinzelt und beim abgeschlossenen Wachstum bei 4 °C aufbewahrt.

Langzeithaltung in flüssigen Stickstoff: Zur Langzeitaufbewahrung dienten beiderseitig zugeschweißte, mit einem Bleistück beschwerte, sterile Polypropylen-Halme, die mit gut bewachsenen Agarstückchen befüllt und bei -196 °C zum Konservieren eingefroren wurden.

Langzeithaltung durch Einlagern in Glycerin: Zu den 500 μL einer gut gewachsenen Flüssigkultur wurde 1 mL steriles Glycerin (99.99 %) zugefügt und in einem Kryo-Röhrchen bei -20 °C aufbewahrt.

Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Metaboliten: Die Extrakte von Kulturfiltrat und von Zellen wurden in 2 mL Methanol/Wasser (bidest) 9:1 aufgenommen. 10 μL Lösung wurden auf eine HPTLC-Nanoplatte aufgetragen (Kieselgel[®] 60 F₂₅₄, 10 × 10 cm; Kieselgel[®] RP-18 F₂₅₄, 10 × 10 cm). Die Dünschichtchromatogramme wurden wahlweise im Laufmittelgemisch Chloroform/Methanol 9:1, *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 5:1:4, Methanol/Wasser 7:3 oder Aceton/Wasser 4:1. Bevor ein DC mit Anisaldehyd, Ehrlich und Orcin als Anfärbereagenz angesprüht wurde, wurde das Metabolitenmuster im UV-Licht (245 nm) und Fluoreszenz (366 nm) analysiert. Nach dem Ansprühen wird auf 100 °C bis zur maximalen Intensität der betrachteten Zonen erwärmt.

Isolierung und Reinigung der Metaboliten sowie chemische Charakterisierung:

Die Isolierung und Reinigung der Sekundärmetaboliten wurde mittels säulenchromatographischer Methoden (Kieselgelchromatographie, Mitteldruckflüssigkeitschromatographie, sowie Hochdruckflüssigkeitschromatographie) durchgeführt, die chemische Charakterisierung der Metaboliten ist durch Massenspektrometrie, NMR-Spektroskopie und IR-Spektroskopie sowie UV-Messung belegt worden.

5.4 Extremophille Mikroorganismen

5.4.1 Stammhaltung

- a) Stammhaltung auf Agarplatten: Für die Stammhaltung von extremophilen Mikroorganismen aus BRAIN-Archiven wurden Nährmedium M1 und SM-Nährmedium Agarplatten beimpft und 7 d bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurden die bewachsenen Agarplatten mit Verschlussfolie (Parafilm® M, *Brand*) abgedichtet und bei 4 °C für maximal vier Wochen gelagert.
- b) Langzeithaltung in flüssigem Stickstoff: Zur Langzeitaufbewahrung von extremophilen Mikroorganismen aus BRAIN-Archiven dienten beidseitig zugeschweißte, mit einem

Bleistück beschwerte sterile Polypropylen-Halme, die mit gut bewachsenen Agarstückchen gefüllt und bei -196 °C zum Konservieren eingefroren wurden.

5.4.2 Kultivierung und Aufarbeitung

Kultivierungsbedingungen von Stämmen der Projektpartner TUHH, ZEB Darmstadt und BRAIN AG

Die Kultivierungsbedingungen für Stämme von den Kooperationspartnern sind für jeden Stamm neu ausgewählt, in den Laboren der Projektpartner durchgeführt und protokolliert worden:

0-024 (Acidianus ambivalens)

Das Extrakt des Stammes **0-024** wurde aus Darmstadt geschickt, die Kutivierungsbedingungen lauteten wie folgt: Medium Oeiras als Schwefelquelle, aerob/anaerob, der Anfang-pH-Wert betrug 2.0-2.5, der End-pH-Wert 1.0-3.0, bis zur eine optischen Dichte von 0.25 gezüchtet, Anzuchtemperatur 80 °C.

<u>0-029 (Thermoplasma acidophilum)</u>

Die Anzucht wurde in Darmstadt unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Medium 158, End-pH-Wert = 1.4, optische Dichte 0.3, Dauer des Kultivierungsvorgangs 696 h, bei 55 °C.

0-047 (*Acidithiobacillus caldus*)

Das Kultivierungsprotokoll dieses Darmstäder-Stammes enthielte folgende Angaben: DSM Medium 150a; der Anfang-pH-Wert = 2.5, End-pH-Wert = 0.0, Wachstum bis zu einer Optischen-Dichte von 2.8, Kultivierungsdauer 288 h, Wachstumstemperatur 45 °C.

1-004 (Fervidobacterium pennivorans)

Eine 20 L Fermenter des Stammes **1-004** wurde in den speziellen Fermentationsanlagen des Technischen Universitäts Hamburg-Harburg für diesen Zweck vorbereitet, das mitgeteilte Fermentationsprotokoll lautete: Medium 740, Anfang-pH-Wert = 6.5, End-pH-Wert = 6.8, 14.5 h Kultivierungsdauer, bei 65 °C.

1. Chemisches Screening von extremophilen Mikroorganismen

1 Kultivierungsbedingungen von Stämmen in Göttingen

1.1 Erste Stammanzuht für das chemische und biologische Screening

Vorkulturen: Die verschiedenen Stämme wurden in vier unterschiedlichen Nährmedien (**NM1**, **NM2**, **NM3**, **NM4**) kultiviert, ausgehend von 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte (B.5.4.1), mit denen 100 mL der Flüssigkultur beimpft wurden. Es wurde 48 h bei 180 rpm und 50 °C inkubiert wurden. Die Kultivierung erfolgte in 250 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, die mit einer Schaumstoffkappe verschlossen wurden. Es wurden je zwei Erlenmeyerkolben pro Stamm und Medium eingesetzt (pH-Wert = 7.4-7.8).

Hauptkultur: Als Inokulum für die Hauptkulturen diente 5 Vol-% einer gut gewachsenen 48 h alten Vorkultur. Für die Kultivierung in Schüttelkolben wurden 250 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen verwendet und mit jeweils 100 mL des sterilen Nährmediums befüllt (20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck). Nach der Sterilisation wurden diese mit der Vorkultur (5 Vol-%) angeimpft. Die Wachstumsphase dauerte 96 h bei 180 rpm und 50 °C. Es wurden je zwei Kolben pro Stamm und Medium eingesetzt, um eine Kontrolle der Ergebnisse zu gewährleisten. Die Kulturen mit vergleichbarem pH-Wert (pH-Wert = 7.8-8.0) gleichen Stammes wurden bei der Aufarbeitung vereinigt.

1.2 Zweite Stammanzucht

2. Kultivierung in Schüttelkulturen:

Vorkulturen: Die Kultivierung der zu untersuchenden Stämme erfolgte in 250 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, die jeweils mit 100 mL entsprechender Nährlösung gefüllt waren. Die Kolben wurden jeweils mit 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte (**B.5.4.1**) beimpft und 48 h bei 50 °C und 180 rpm auf einem Rundschüttler gerührt (pH-Wert = 7.4-7.8).

Hauptkultur: Je 150 mL des vorbereiteten, sterilen Hauptkultur-Nährmediums in 300 mL Erlenmeyerkolben (20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck), wurden mit 5 Vol-% der Vorkultur beiimpft und 96 h bei 50 °C, 180 rpm aus dem Rundschüttler inkubiert. Im Zeitpunkt der Ernte betrug der pH-Wert = 7.8-8.0.

3. Kultivierung im Airlift-Fermenter (10 L-Maßstab):

Vorkulturen: Das sterile Nährmedium (20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck) wurde mit 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte des Stammes angeimpft (**B.5.4.1**) und in 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen (150 mL SGG-Medium) 48 h bei 50 °C und 180 rpm kultiviert (pH-Wert = 6.9).

Hauptkultur: Der Airlifter wurde mit 9.5 L Nährmedium SGG und 4 g Entschäumer befüllt, autoklaviert und mit einem Liter einer zwei Tage alten Vorkultur beimpft (10% des Fermentationsvolumens). Die Kultivierung im Airlifter erfolgte 96 h bei 50 °C mit einer Belüftung von 1.0 vvm, 200 rpm, einer pH-Sperre von 6,5 (+/- 1.5). Die Fermentation wurde durch Probenentnahme überwacht und nach vier Tagen bei einem pH-Wert von 7.9 beendet.

4. Aufarbeitung der Schüttelkulturen:

Die Schüttelkulturen (je 100 bis 150 mL Nährlösung) wurden auf einen pH-Wert = 5.6 mit 1 N HCl eingestellt und mit Celite versetzt. Anschließende Zentrifugation (4500 U/min, 15 min, 4 °C) trennte das Kulturfiltrat von den Zellen. Das abdekantierte Kulturfiltrat wurde auf ein Adsorberharz (Amberlite® XAD-2) gegeben (30 mL).

Dieses wurde mit 100 mL demineralisierten Wasser gewaschen und mit 100 mL Methanol eluiert. Anschließend wurde im Vakuum das Lösungsmittel entfernt (20 mbar). Das Zellpellet wurde mit Aceton/Methanol 1:1 (3 × 200 L) 10 min im Ultraschallbad extrahiert. Die organische Phase wurde im Vakuum eingeengt. Die Detektion der Metaboliten erfolgte dünnschichtehromatographisch.

5. Aufarbeitung der Fermentationsansätze:

5.4.2.5.I: Aufarbeitung durch Adsorberharz Amberlite® XAD-2: Die Kulturbrühe wurde nach dem abgeschlossenen Wachstum auf einen pH-Wert von 5.6 eingestellt und mit Celite versetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifungieren bei 3000 U/min, 4 °C 20 min. von dem Kulturüberstand abgetrennt. Die vereinigten Kulturüberstände wurden auf das Amberlite® XAD-2 adsobiert (1000 mL), das Adsorberharz wurde mit 2000 mL demineralisierten Wasser gewaschen und mit 2000 mL Methanol eluiert. Das Eluat wurde im Vakuum eingeengt. Das Zellpellet wurde 15 min. mit einem Ultraschallbad mit Aceton/Methanol 1:1 (3 × 200 mL) extrahiert, das Myzel durch Filtration abgetrennt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

5.4.2.5.II: Aufarbeitung durch Extraktion mit Essigester: Der Fermentationsansatz wurde nach der beendeten Kultivierungsphase auf einen pH-Wert von 5.6 gebracht und mit Celite

versetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 3000 G und 3000 U/min, 4 °C 20 min. von der Kulturbrühe abgetrennt. Der Überstand wurde im Ultrathurax mit 15 L Essigester extrahiert, das Extrakt im Vakuum (20 mbar) bis zur Trocknung eingeengt und anschließend über Nacht an der Gefriertrocknung lyophilisiert. Das Zellpellet wurde mit Aceton/Methanol 1:1 (3 × 200 mL) aufgeschlossen und 15 min im Ultraschallbad extrahiert. Die Biomasse wurde durch Filtration abgetrennt und das Lösungsmittel aus dem Filtrat beim verminderten Druck (20 mbar) entfernt.

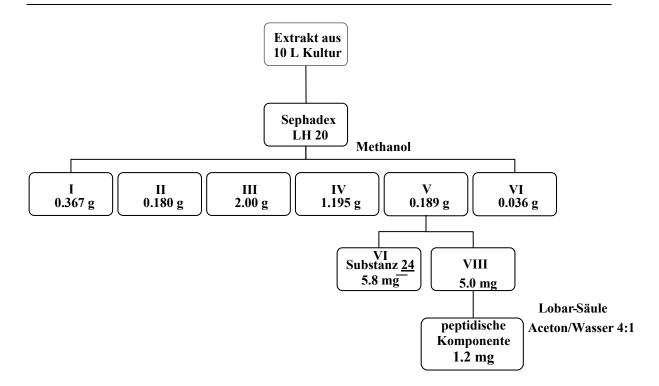
5.4.3 Isolierung der Metaboliten

Metabolite aus dem Stamm 3-001 Streptomyces sp. B1017B

Kultivierung und Aufarbeitung

Mit dem Ziel die bioaktiven Substanzen zu isolieren, wurde folgende Fermentation im Großmaßstab durchgeführt.

Der Stamm 3-001 wurde in dem SGG-Nährmedium 10 L (Airlift-Fermentationsanlage, B.5.4.2.3) kultiviert, der pH-Wert wurde mit 0.5 m HCl auf 5.6 gebracht und mit Celite versetzt. Die Zellen wurden von dem Kulturüberstand mittels zentrifugieren abgetrennt (3000 U/min, 4 °C, 20 min.). Die Kulturbrühe wurde auf Adsorberharz Amberlite[®] XAD-2 aufgetragen und mit 2000 mL Methanol eluiert (B.5.4.2.5.II) aufgearbeitet. Zum Erntezeitpunkt hatte die Kulturbrühe eine braune Färbung angenommen und wies einen pH-Wert von 7.4 auf. Das in Methanol lösliche Rohprodukt wurde zunächst an der Sephadex LH-20 (Methanol, 3.0 x 150 cm) chromatographisch aufgereinigt. Die Fraktion V mit der Substanz 24 wurde weiter aufgetrennt (Kieselgel® 60, Chloroform/Methanol 95:5, 2.0 x 30.0 cm), die Verbindungen befanden sich in den Fraktionen VI (5.8 mg) (21) und VIII (5.0 mg). Fraktion VIII wurde zusätzlich per Mitteldruckflüssigkeitschromatographie (Säule: Kieselgel® RP-18 (Lobar®B, Aceton/Wasser 4:1, 1.0 × 30.0 cm, Flussrate 0.5 mL/min) aufgereinigt, um die unbekannte Komponente (1.2 mg) zu erhalten. Die Isolierung ist in der Aufarbeitungsschema 3 abgebildet.

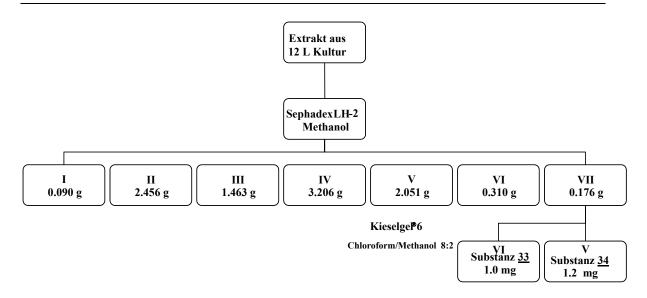


Aufarbeitungsschema 3: Die Isolierung des N^b -Acetyltryptamins ($\underline{24}$) und noch nicht aufgeklärter Substanz.

Metabolite aus dem Stamm 3-002 Streptomyces sp. 1014C

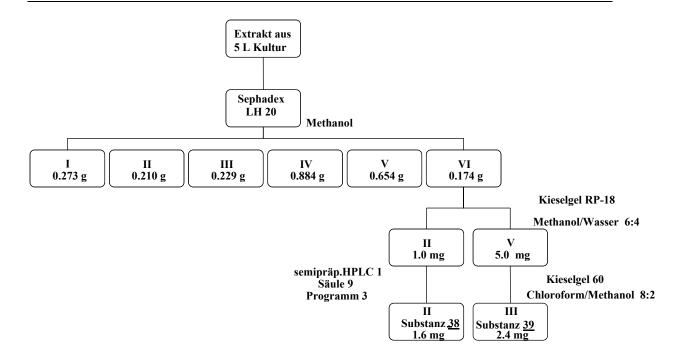
Kultivierung und Aufarbeitung

Die Verbindung <u>33</u> sowie die Verbindung <u>34</u> wurden aus einen 12 L-Fermentation SGG-Nährmediums isoliert (B.5.4.2.2). Nachdem der pH-Wert wurde mit 0.5 m HCl auf 5.6 gebracht und mit Celite versetzt wurde, wurden die Zellen von der Kulturbrühe mittels Zentrifuge abgetrennt (3000 U/min, 4 °C, 20 min.). Die Kulturbrühe wurde auf Adsorberharz Amberlite[®] XAD-2 aufgetragen und mit 2000 mL Methanol eluiert. Nach der Kultivierungsdauer von 96 h zeigten die Kulturen eine dunkelbraune Färbung und wiesen einen pH-Wert von 7.6 auf. Die Fraktion VII mit den gewünschten Metaboliten wurde säulenchromatographisch a Kieselgel[®] 60 (Chloroform/Methanol (CM) 8:2, 2.0 x 30.0 cm) aufgereinigt. Die abgeschlossene Trennung ergab schließlich die Substanz <u>33</u> (1.0 mg) und <u>34</u> (1.2 mg) als Reinsubstanzen (Aufarbeitungsschema 4).



Aufarbeitungsschema 4: Trennungsgang für Adenosin (33) und Cytidin (34).

Die Verbindung <u>38</u> wurd in einer 5 L Fermentation des Stammes im SGG-Nährmedium (B.5.4.2.2) isoliert. Zum Zeitpunkt der Ernte wies die Kulturbrühe eine dunkelbraune Färbung und hatten einen pH-Wert von 7.8. Das Kulturextrakt wurde nach der Eluierung mit Methanol (2000 mL) von den Adsorberharz Amberlite[®] XAD-2 (B.5.4.2.4) auf dem Sephadex LH-20 (Methanol, 3.0 × 150.0 cm) fraktioniert, die Fraktion **VII** weiterhin auf einer Kieselgel-RP-Säule (Methanol/Wasser (MW) 6:4, 2.0 × 30.0 cm, Flussrate 0.5 mL/min) chromatographisch aufgereinigt. Die Substanz <u>38</u> wurde in reiner Form durch erneute chromatographische Auftrennung an Kieselgel[®] 60 (CM 8:2, 1.5 × 30.0 cm) in der **III**. Fraktion erhalten (1.6 mg). Abschließende Chromatographie an der semipäparativen HPLC (B.5.2.III.A.3.b) führte zu einer weiterer Reinverbindung <u>39</u> in einer Ausbeute von 1.6 mg (Fraktion **II**).

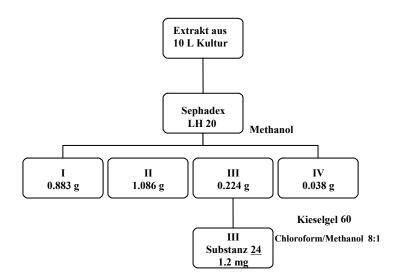


Aufarbeitungsschema 5: Isolierungsstrategie für den 1*H*-Indol-3-Carbonsäure (<u>38</u>) und Indol-3-milchsäure (<u>39</u>).

Metabolite aus dem Stamm 3-015 (unspezifiziertes Bakterium)

Kultivierung und Aufarbeitung

Ein 10 L-Ansatz in Airlift-Fermenter wurde in SGG-Nährmedium gemäß der Kultivierungsvorschrift B.5.4.2.3 durchgeführt. Zum Ende der Produktion hatten die Kulturen eine dunkelbraune Färbung und der End-pH-Wert betrug 7.8. Die Kulturbrühe wurde mit 0.5 m HCL auf einen pH-Wert von 5.6 gebracht und mit Celite versetzt. Die Zellen wurden mittels der Zentrifuge von dem Kulturüberstand getrennt (3000 U/min, 4 °C, 20 min). Der Kulturüberstand wurde nach der Eluierung mit Methanol (2000 mL) von den Adsorberharz Amberlite® XAD-2 auf dem Sephadex LH-20 (Methanol, 3.0 × 150.0 cm) aufgereinigt (B.5.4.2.5.I). Das im Vakuum eingeengte (20 mbar) und an der Gefriertrocknung lyophilisierte Kulturextrakt wurde nach dem Aufarbeitungsschema 6 fraktioniert. Die zu interessierende Fraktion III wurde zuletzt mittels Kieselgel-Säulenchromatographie gereinigt (Kieselgel® 60, Chloroform/Methanol 8:1, 2.5 × 30.0 cm). Es wurde die Substanz 24 in einer Ausbeute von 1.2 mg als gelbes Öl erhalten.



Aufarbeitungsschema 6: Trennungsgang für die Gewinnung des N^b -Acetyltryptamins ($\underline{24}$).

5.4.4 Probenbereitstellung

Probenvorbereitung für die Biotestreihen:

Rohextrakte der Screening-Experimente: Bei den Streptomyceten wurde das Extrakt von 50 mL Kulturbrühe in 2 mL Methanol (reinst)/Wasser (bidest.) 9:1 unter der sterilen Bedingungen aufgenommen und bei -20 °C für die Wirkstoffuntersuchengen aufbewahrt/transportiert.

Rohextrakte der Fermenter: Jede Fraktion wurde in 2 mL Methanol (reinst)/Wasser (bidest.) 9:1 unter sterilen Bedingungen aufgenommen. Davon wurden 100 μL abgenommen (5 Vol-% Aliquot, dh. 50 mL Kultur) und mit 900 μL Methanol (reinst)/Wasser (bidest.) 9:1 in einem Eppendorf-Cap verdünnt.

5.5 Chartreusin

Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV1: 0,0-Acetalbildung

Der Alkohol <u>23</u> (1.0 eq) wurde in einem 1:1 Lösungsmittelgemisch aus trockenem Chloroform/DMF gelöst und mit einer fünffachen Menge Molsieb bei Raumtemperatur versehen. Zu dieser Lösung wurde über einen Zeitintervall von 3 h das Acetal <u>148</u> (20.0 eq) und p-Toluolsulfonsäure (1.0 eq) kontinuierlich zugesetzt. Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch kontrolliert. Nach Abschluss der Reaktion wurde das Gemisch mit Chloroform verdünnt, über Celite filtriert und bei vermindertem Druck (20 mbar) eingeengt. Das Rohprodukt wurde über Flasch-Chromatographie (Kieselgel[®]60, CM 85:15, 1.0 × 40.0 cm) gereinigt.

AAV2: Veresterung

Der Alkohol <u>23/115/151</u> und DMAP (<u>152</u>) (3-4 eq) wurden in trockenem Chloroform/Pyridin Gemisch (5:1) bei Raumtemperatur vorgelegt. Dazu gab man EDCI (3.0-4.0 eq) und die Säure (3.0-4.0 eq) kontrolliert über eine Zeitspanne (2.5 h) hinzu. Die Zusammensetzung wurde dünnschichtchromatographisch überprüft. Nachdem die Reaktion beendet war, wurde das Reaktionsgemisch zuerst mit 2 M NH₄Cl-Lösung ausgeschüttelt, mit 40%iger NaHSO₃-Lösung aufgearbeitet und anschließend mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach der Trocknung über wasserfreiem MgSO₄ wurde der gewonnene Reaktionsansatz per Kieselgel-Säulenchromatographie gereinigt (Kieselgel[®] 60, CM 98:2, 1.5 × 20 cm).

AAV3: Benzoylierung

Der Alkohol <u>23/115/151</u> wurde in trockenem DMF bei Raumtemperatur gelöst. Dann wurden trockenes DMAP (<u>152</u>) (8.0 eq) und das Benzoylcyanid (<u>150</u>) (8.0 eq) portionsweise zugegeben. Die Reaktion verlief unter dünnschichtchromatographischer Kontrolle. Das Gemisch wurde zur Aufarbeitung auf Eis gegossen, anschließend mit Essigester extrahiert und mit 2 m NH₄Cl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde erneut mit 40%iger NaHSO₃-Lösung extrahiert und mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde über wasserfreien MgSO₄ getrocknet und das Lösungmittel wurde dem Produkt unter

verminderten Druck entzogen (20 mbar). Das eingeengte Produkt wurde an Kieselgel säulenchromatographiert (Kieselgel®60, Acetonitril/Cyclohexan 1:1, 1.5 × 30.0 cm).

AAV4: Enzymatisch katalysierte Veresterung

Der Alkohol 23/115/151 und die Säure (20.0)eq) wurden trockenem in Toluol/Heptan-Gemisch (2:1) bei Raumtemperatur gelöst. Es wurde Candida antartica Lipase B (Novozym[®] 435, CAL B) dazugegeben (80 mg/mmol pro Alkohol). Die Reaktion wurde dünnschichtchromatographisch kontrolliert. Die Suspension wurde nach dem Reaktionsende bei vermindertem Druck (20 mbar) eingeengt und anschließend über Flashchromatographie gereinigt (Kieselgel[®] 60, CM 9:1, 1.5 × 20.0 cm).

5.5.1 Derivatisierung und Charakterisierung

3',4'-O-endo/exo-Benzylidenchartreusin (115)

50 mg Chartreusin (23) wurde gemäß AAV1 mit Benzaldehyddimethylacetal (148) umgesetzt. Das als Gemisch aus Endo-/Exo-Benzylidenchartreusin erhaltene Reaktionsprodukt 3',4'-O-endo/exo-Benzylidenchartreusin (115a/115b) wurde wie in AAV1 beschrieben aufgearbeitet (Ausbeute: 69% Gemisch, Lit.: 48 % (endo), 27 % (exo)).

3',4'-O-Benzyliden-6-O-Benzoylchartreusin (149)

3',4'-O-endo/exo-Benzylidenchartreusin (<u>115</u>) wurde gemäß **AAV3** mit den Benzoylcyanid (<u>150</u>) umgesetzt. Es wurde das Exo-Produkt (<u>115b</u>) nach **AAV3** säulenchromatographische Aufreinigung erhalten (**Ausbeute**: 40%).

5.6 Spirotetron-Stamm GT 19961033

5.6.1 Stammhaltung

- a) Stammhaltung auf Agarplatten durch Verdünnungsausstrich: Die Stammhaltung des Spirotetron-Produzenten erfolgte auf Nährmedium M2 und SM-Nährmedium Agarplatten. Die Agarplatten wurden mittels einer sterilen Impföse zunächst mit wenig Sporen beimpft. Sie wurden für 4 d bei 28 °C inkubiert. Durch erneutes Überimpfen auf neue Agarplatten wurden die Kolonien vereinzelt. Die bewachsenen Agarplatten wurden bei 4 °C gelagert.
- **b)** Langzeithaltung durch Einlagern in Glycerin: Zu 5 mL einer gut gewachsenen Flüssigkultur des Spirotetron-Produzenten SM-Nährmedium bzw. SGG-Nährmedium wurden 10 mL Glycerin (steril, 99.99%) hinzugegeben und in einem 15 mL Falcon-Tube bei -20 °C aufbewahrt.

5.6.2 Kultivierung und Aufarbeitung

1. Chemisches Screening:

a) Rundschüttler:

Vorkulturen: Die Kultivierung des Stammes 19961033 erfolgte in 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, die mit einem Schaumstoffstück verschlossen wurden. Man kultivierte in fünf verschiedenen Nährmedien (**NM1**, **NM2**, **NM3**, **NM6**, **NM8**) zu denen die entsprechenden Vorläufer gegeben wurden (B.5.6.4). Jeder Kolben wurde mit 150 mL Nährmediums befüllt und nach Sterillisation (30 min, 121 °C und 1 bar Überdruck) mit 1/10 einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft (B.5.6.1.a). Die Vorkultur wurde 48 h bei 28 °C und 225 rpm auf einem Rundschüttler angezogen (End-pH-Wert = 6.8-7.1).

Hauptkultur: 1 L Erlenmeierkolben mit drei Schikanen wurden mit 150 mL sterilem Nährmedium mit 5 Vol-% Vorkulturlösung inokuliert. Die Kultivierung erfolgte 96 h bei 28 °C und 225 rpm mit einem End-pH-Wert von 7.4.

b) Querschüttler:

Vorkulturen: 1 L Erlenmeyerkolben mit Schikanen wurden mit 150 mL sterilen Nährmediums befüllt (30 min, 121 °C und 1 bar Überdruck) und mit 1/10 einer gut bewachsenen Agarplatte

angeimpft (B.5.6.1.a). Es wurde 48 h bei 120 spm und 28 °C kultiviert, der pH-Wert am Ende betrug 7.1.

Hauptkultur: 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen wurden mit 150 mL steriles Medium beschickt und mit 5 Vol-% einer 48 h alten Vorkultur (pH-Wert = 7.1) angeimpft und 96 h bei 28 °C und 120 rpm bis zu einem pH-Wert von 7.6 kultiviert.

2. Kultivierung und Aufarbeitung

I. Kultivierung in den Schüttelkulturen (1 L, 5 L und 12 L-Maßstab)

Vorkulturen: Die Kultivierung erfolgte in 1 L Schüttelkolben mit drei Schikanen, die mit 150 mL sterilen Nährmediums (30 min, 121 °C und 1 bar Überdruck) befüllt und mit einem Zellstopfen verschlossen wurden. Nach dem Autoklavieren wurden die Kulturen mit einer der Variationen der Stammhaltung beimpft (B.5.6.1.) und 48 h bei 28 °C und 120 spm auf dem Querschüttler bis zu einem pH-Wert von 6.8 angezogen.

Hauptkultur: Das Nährmedium für die Hauptkulturen wurde in 1 L Schüttelkolben mit drei Schikanen vorbereitet. 150 mL sterile Nährlösung wurden mit 5 Vol-% einer gut bewachsenen Vorkultur (pH-Wert = 6.8) beimpft und weitere 96 h bei 28 °C und 120 spm kultiviert. Nach dem die Wachstumsphase abgeschlossen worden ist, wiesen die Kulturen eine hell-braune Farbe auf und hatten einen pH-Wert von 7.4.

II. Kultivierung in 5L-Fermenter (1.5 L-Maßstab) (Biostat B2)

Vorkulturen: Die Vorkulturen wurden 450 mL Nährmedium mit 1.5 mL Glycerineinlagerung des Stammes GT 19961033 in 1 L Erlenmeyerkolben beimpft (**B.5.6.1.b**) und auf dem Querschüttler für 48 h bei 28 °C und 120 spm angezogen.

Hauptkultur: Die Fermentation erfolgte im Braun Biostat B. Dazu wurden 1.5 L Nährmedium sterilisiert, pH-Wert 7.0 vor der Sterilisation eingestellt und mit 450 mL einer 48 h alten Vorkultur (pH-Wert = 6.8) beimpft. Die Kultivierung erfolgte 96 h bei einer Temperatur von 28 °C, 6.0 vvm, 200 rpm, einer pH-Sperre von 8.6 (+/- 1.0). Am Erntezeitpunkt betrug der pH-Wert 6.8-7.4.

III. Variation der Aufarbeitungsmethoden:

Die Aufarbeitung verschiedener Kultivierungsansätze wurde wie folgt durchgeführt:

a) Die Aufarbeitung der Schüttelkulturen des chemischen Screenings: Die vereinigten Kulturbrühen des gleichen Nährmedienansatzes wurden mit 0.5 N NaOH auf pH 5.6 gebracht und mit Celite versetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren (4500 U/min, 20 min, 4 °C) von der Kulturbrühe getrennt und wurde anschließend mit Aceton bzw. Methanol (2 × 200 mL) 10 min im Ultraschallbad behandelt.

In den nachfolgenden Schritten wurde das Kulturfiltrat mit fünf verschiedenen Methoden aufgearbeitet:

- i) mit Dichlormethan ausgeschüttelt (3 × 50 mL), die vereinten organischen Phasen wurden unter verminderten Druck eingeengt (20 mbar)
- ii) mit Essigester extrahiert $(3 \times 50 \text{ mL})$, das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt (20 mbar)
- iii) am XAD-2 adsorbiert (Amberlite[®], Methanol, 2.0×50.0 mL), dem Rohextrakt wurde das Lösungsmittel im Vakuum entzogen (20 mbar)
- iv) an Amberlite[®] XAD-2-Adsorberharz gegeben (Aceton, 2.0 × 50 mL), das Lösungsmittel wurde von dem Extrakt im Vakuum entfernt (20 mbar)
- v) auf Amberchrom[®] C161CG-Adsorberharz (2.0 × 5.0 cm) gebracht und mit den Gradienten 100% Wasser, Wasser/Methanol 8:2, Wasser/Methanol 6:4, Wasser/Methanol 4:6, Wasser/Methanol 2:8 und anschließend 100% Methanol eluiert. Die Eluate wurden im Vakuum (20 mbar) eingeengt.
- b) Aufarbeitung der Kultivierung der Schüttelkulturen: In der Aufarbeitung der Schüttelkulturen wurde das Kulturfiltrat auf eine Amberchrom®-Adsorberharz Säule aufgetragen, nachdem der pH-Wert auf 5.6 reguliert wurde und das Zellpellet von dem Kulturfiltrat zentrifugal bei 4500 U/min, 20 min auf 4 °C abgetrennt wurde. Die Substanz wurde von dem Amberchrom®C161CG-Adsorberharz (10.0 × 10.0 cm) mit dem Lösungsmittelgemisch Wasser/Methanol von 100 % Wasser bis 100 % Methanol eluiert. Dem Eluat wurden im Vakuum (20 mbar) und über Gefriertrockne die Lösungsmittel entzogen. Das Lyophilisat in Wasser/Methanol-Gemisch 50:50 aufgenommen und auf eine Kieselgel®RP-Säule (Wasser/Methanol 50:50, 7.0 × 15.0 cm) gebracht. Die Lösungsmittel wurden im Vakuum (20 mbar) evaporiert und die Extrakte lyophylisiert.

c) Die Aufarbeitung der Fermentationsansätze:

- i) Extraktion mit Essigester: Der pH-Wert der Kultur wurde mit 2 N NaOH auf 5.6 korrigiert und mit Celite versetzt. Nach dem die Kulturbrühe vom den Zellen abfiltriert worden ist, wurde das Kulturfiltrat mit Essigester extrahiert (2 × 1.5 L). Der Essigester wurde im Vakuum unter vermindertem Druck entfernt (20 mbar) und das Extrakt weiterhin chromatographisch bearbeitet.
- **ii)** Extraktion mit Dichlormethan: Nach der Einstellung des pH-Wertes auf 5.6 wurde die Kulturbrühe mit Celite versetzt und die Zellen abfiltriert. Das Kulturfiltrat wurde mit Dichlormethan ausgeschüttelt (2 ×1.0 L) und das Lösungsmittel im Vakuum eingeengt (20 mbar).

5.6.3 Wachstumskurve und Ausbeutebestimmung

Zur Ermittlung des Produktionsanfangs des Spirotetrons (22) und somit zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes für die Zugabe von isotopen-markierten Verbindungen, wurde die Fermentationskurve markierten zuerst ohne Vorläufer (Glycerin wurde als Nährmediumbestandteil eingesetzt, 0.5 g/L) aufgenommen. Dafür wurde auf dem Querschüttler unter den oben angegebenen Bedingungen 5 L einer Kulturlösung über Zeitraum kultiviert (B.5.6.2.2.II). Die Vorkulturen wurden begrenzten mit Glycerineinlagerung des Stammes GT 19961033 beimpft (B.5.6.1.b). Der Verlauf der Kultivierung wurde mittels der Verfolgung des pH-Verlaufs während der Kultivierung ermittelt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Die Produktionszeitbestimmung des Spirotetrons (<u>22</u>) ermittelt durch den pH-Werten.

Entnommene Probe (50 mL)	Zeitverlauf [h]	Zeitinterwalen [h]	pH-Verlauf
1.	0	0	7.5
2.	12	12	7.5
3.	24	12	7.2
4.	36	12	7.2
5.	40	4	7.2
6.	44	4	6.8

7.	48	4	6.8
8.	52	4	6.4
9.	56	4	6.4
10.	60	4	6.2
11.	64	4	6.2
12.	68	4	6.2
13.	72	4	6.4
14.	76	4	6.4
15.	80	4	6.4
16.	84	4	6.8
17.	96	4	6.8

Zum Erntezeitpunkt hatten die Kulturen eine hell-grünbraune Färbung und einen End-pH-Wert von 6.8. Alle Proben wurden gemäß B.5.6.2.2.III.b mit Celite versetzt und mittels Zentrifugation (4500 U/min., 20 min und 4 °C) von dem Zellpellet abgetrennt. Der Kulturüberstand wurde auf 5 mL Amberchrom® C161CG-Adsorberharz (5 mL) gebracht (100 % Methanol). Dem Eluat wurden im Vakuum (20 mbar) und über Gefriertrockne die Lösungsmittel entzogen. Nach der Eluation mit Wasser/Methanol Gemisch (45:55) auf der Kieselgel®RP-Säule und dem Entzug des Lösungsmittels (im Vakuum 20 mbar, dannach die Gefriertrockne), wurden die Proben in 2 mL Methanol aufgenommen (c = 5 mg/mL) und zur HPLC-Untersuchung bereitgestellt.

Als Produktionsanfang wurde die 36. Stunde angenommen (pH-Wert = 7.2). Als Produktionsende wurde 72. Stunde bestimmt (pH-Wert = 6.4). Die HPLC-Analyse (195-595 nm) verlief nach dem B.5.2.II.A.1.a.

5.6.4 Durchführung der Fütterungsversuche

<u>Vorläufer-dirigierte Biosynthese</u>: Zur Vorläufer-dirigierten Biosynthese in verschiedenen Fermentationen wurden insgesamt folgende Substanzen eingesetzt: Brenzsäure-Natriumsalz (Pyrruvat), Glycerin, HEPES-Puffer, *DL*-Leucin, Malonat, *L*-(-)-Methionin, Natriumacetat, Natriumpropionat, *L*-(-)-Valin, *L*-(-)-Tyrosin.

Die Substanzen wurden in gelöster Form zugefüttert, wobei alle Lösungen einen pH-Wert von 7.3 besaßen. Die Fütterungslösungen wurden wie folgt hergestellt:

Brenzsäure-Natriumsalz, Glycerin, Malonat, *L*-(-)-Methionin, Natriumacetat, Natriumpropionat, *L*-(-)-Valin wurden in 60 mL autoklaviertem Wasser gelöst und der pH-Wert wurde mit 0.5 N NaOH bwz. 1 N HCl auf 7.3 korrigiert. Die Lösung wurde sterilfiltriert und zu den entsprechenden Kulturen zur 36., 48., und 72. Stunde portionsweise zugegeben (*Pulse-Feeding-*Verfahren).

DL-Leucin und *L*-(-)-Tyrosin wurden in möglichst wenig 2 N NaOH gelöst und der pH-Wert wurde mit 1 N HCl auf pH 7.3 korrigiert. Die Lösung wurde auf 60 mL Gesamtvolumens mit sterilem Wasser aufgefüllt und steril filtriert. Die so bereitgestellte Mischung wurde über den Zeitraum von der 36., 48., und 72.sten Stunde der Kultur zugegeben (*Pulse-Feeding*-Verfahren).

HEPES-Puffer wurde in der Pulverform direkt der Nährmedienkomponenten bei der Nährmedienzubereitung in entsprechender Konzentration beigemischt.

Aminosäuren-Gemisch: die Aminosäuren-Mixtur enthielte folgenden Komponenten: Brenzsäure-Natriumsalz (Pyruvat), *DL*-(-)-Leucin, *L*-(-)-Methionin, *L*-(-)-Valin und *L*-(-)-Tyrosin in den oben genannten Konzentrationen. Das pH-Wert wurde auf 7.3 eingestellt. Nährmedien-Variation:

Tabelle 15: Konzentrationsangabe der Nährmedium-Zusätze.

Percursor	Nährmedium (NM)	Konzentration [mg/L]
Brenzsäure-Natriumsalz (Pyruvat)	10	300
Glycerin	7	300
HEPES-Puffer	6, 10	300
DL-(-)-Leucin		300
Malonat	6, 10	300
L-(-)-Methionin		100
Natriumacetat	6, 10	300
Natriumpropionat	6, 10	300
L-(-)-Valin	7	300
L -(-)-Tyrosin		300
Natriumacetat + Natriumpropionat	6, 10	
Aminosäuren-Gemisch	6, 8, 10	

Amiosäuren-Gemisch ohne Methionin	6	
L -(-)-Valin + Glycerin	8	

Fütterungsversuche mit uniform-markiertem Glycerin ([U-¹³C₃]Glycerin)

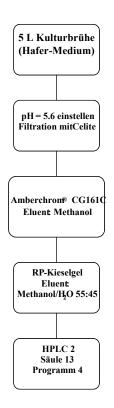
Zur Untersuchung der Biosynthese des Spirotetrons (<u>22</u>) wurde das Nährmedium **NM** 5 mit der Glycerineinlagerung des Stammes GT 19961033 beimpft (B.6.1.b) und auf dem Querschüttler unter B.5.6.2.II beschriebenen Kultivierungsbedingungen angezogen.

Die Vorkultur (pH-Ende = 7.1) diente als Inokulum für

die 5 L Hauptkultur in **NM 5**. 150 mL Hauptkultur wurden hierfür mit je 5 mL Vorkultur versetzt und bei 28 °C und 120 spm. kultiviert. Für die Fütterung wurde der markierte Vorläufer [U-¹³C₃]Glycerin mit sterilem, unmarkiertem Glycerin verdünnt (1:2), in sterilem Wasser gelöst und sterilfiltriert.

Jeweils 1 mL markierten Verbindung wurden während der 36., 40., 44., und 48. Stunde im *Pulse-Feeding*-Verfahren 150 mL Kulturlösung zugegeben (0.5 g/L, 5.5 mmol). Die wachsende Kultur wurde weitere 48 Stunden kultiviert (96 Stunden Fermentationsdauer). Das Kulturfiltrat wurde nach (B.5.6.2.2.b) bearbeitet.

Zum Erntezeitpunkt hatten die Kulturen eine helle grünbraune Färbung angenommen, der End-pH-Wert war 6.4 (Aufarbeitungsschema 7).



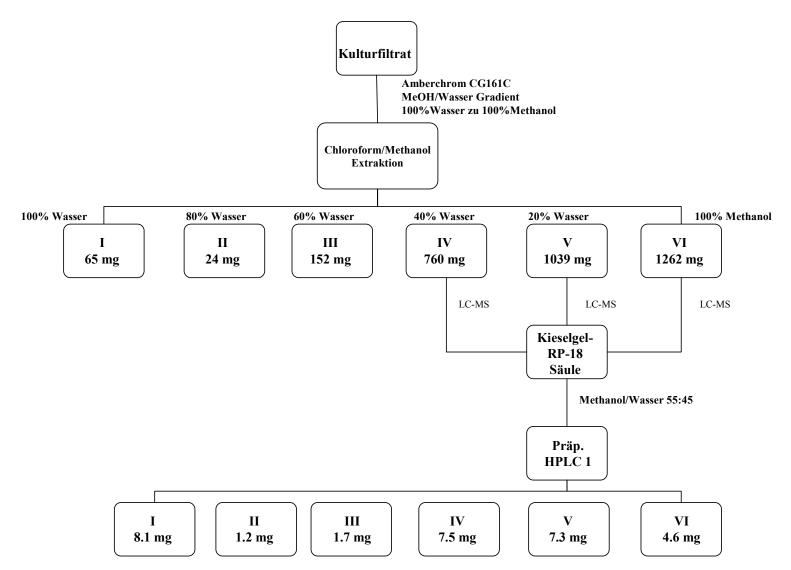
Aufarbeitungsschema 7: Isolierungsschema des Fütterungsexperiments mit [U-¹³C₃]Glycerin.

5.6.5 Isolierung und Charakterisierung des Spirotetrons (22)

Die Kultivierung erfolgte in 1 L Erlenmayerkolben mit Schikane, die mit 150 mL Nährmedium **NM 6** befüllt und mit einer Schaumstoffkappe verschlossen wurden. Nach der Sterilisation (30 min, 121 °C und 1 bar Überdruck) wurden die Kulturen eines 12 L Ansatzes mit 5 mL einer Glycerineinlagerung beimpft (B.5.6.1.b) und für 96 h bei 28 °C und 120 spm auf dem Querschüttler bebrütet (B.5.6.2.2.II). Nach einer Inkubationszeit von 96 h bei 28 °C und 120 spm wiesen die Zellen eine hellbraune Färbung auf, der Überstand hatte eine grünbraune Farbe angenommen, der pH-Wert betrug ca. 6.8-7.1. Die Zellen wurden durch

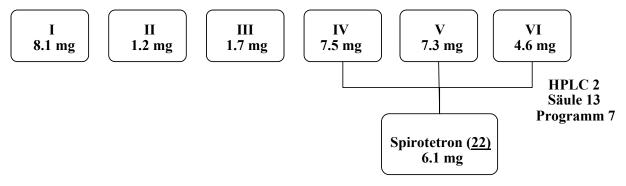
Filtration von dem Überstand nach der Aufarbeitungsmethode B.5.6.2.2.b abgetrennt. Das Kulturfiltrat wurde nach Aufarbeitungsschema 8 für die analytische Trennung bearbeitet.

Experimenteller Teil 187



Aufarbeitungsschema 8: Isolierungsschema des Spirotetrons (22) aus dem Stamm GT 19961033.

Die LC-MS-Analyse (B.5.2.II.A.4.a) der präparativen Trennung (B.5.2.I.2.2.b) ergab, dass die Fraktionen IV, V und VI die gesuchte Verbindung 22 enthielten. Diese Fraktionen wurden vereinigt und die gewünschte erneut Komponente 22 durch die präparative Hochruckflüssigchromatographie (B.5.2.IV.B.4.b), folgenden isoliert wie im Aufarbeitungsschema 9 dargestellt wurde:



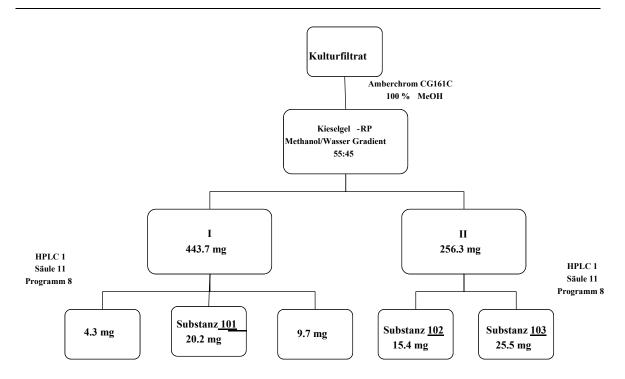
Aufarbeitungsschema 9: Optimierte Isolierung des Spirotetrons (22).

5.6.6 Isolierung und Charakterisierung der Metabolite

Isolierung von Naphtoquinomycin (101), Naphtomycin (102) und Benzoxazomycin (104)

Die 12 L Hauptkultur wurde in den 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen mit dem Hafer-Medium **NM 6** beschickt (B.5.6.2.2.I). Zum Erntezeitpunkt betrug der pH-Wert = 7.4, die helle, grünlichbraune Kulturbrühe wurde nach B.5.6.2.2.III.b weiter bearbeitet. Das Eluat wurde im Vakuum eingeengt (20 mbar) und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde im 3 mL Methanol/Wasser-Gemisch 55:45 gelöst und säulenchromatographisch aufgereinigt (Kieselgel-RP-18, Methanol/Wasser 55:45, 10.0 × 15.0 cm). Die Fraktionen wurden präparativ aufgetrennt (B.5.2.IV.A.2.8).

Bei einer Retentionszeit von R_t = 24.1 min der hochdruckchromatographischen Trennung (präparative Anlage, HPLC 1, Säule 11, Programm 8) wurde die Komponente <u>101</u> als grüngrauer Feststoff erhalten (20.2 mg). Die Fraktion II enthielt die Verbindung <u>102</u> als rot-orangen Feststoff (15.4 mg) (Retentionszeit R_t = 7.1 min) und die Substanz <u>104</u> als weißen Feststoff (25.5 mg) (Retentionszeit R_t = 18.2 min) (präparative Anlage, HPLC 1, Säule 11, Programm 8). Die gesamten Isolierungsschritte sind zusammenfassend in Aufarbeitungsschema 10 dargestellt.

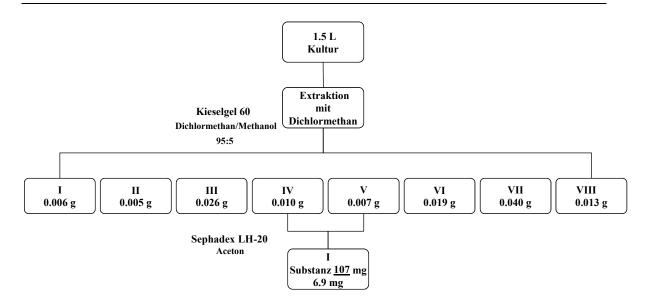


Aufarbeitungsschema 10: Trennungsgang für die Verbindungen 101, 102 und 104.

Dipeptid Prolin-Valin (107)

Drei 1 L Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen wurden mit 150 mL **NM8**-Medium unter Aminosäuren-Mixtur-Zusatz (Tabelle 14) befüllt und nach dem Sterilisieren mit 1/10 einer gut bewachsenen **NM3**-Agarplatte des Stammes angeimpft (B.5.6.1.a). Die Fermentation der Hauptkultur (1.5 L) im **NM8**-Medium wurde in dem Biostat B2-Fermenter durchgeführt (B.5.6.2.2.II). Als Inokulum dienten 450 mL einer 48 h bestehenden Vorkultur.

Nachdem die Fermentation abgeschlossen wurde, betrug der pH-Wert 7.4-7.7 und die Kultur hatte eine dunkelbraune Farbe. Das Kulturfiltrat wurde durch Filtration von der Biomasse getrennt und nach B.5.6.2.III.c.ii aufgearbeitet (Dichlormethan-Extraktion). Das erhaltene Rohprodukt (129.5 mg) wurde über Säulenchromatographie gereinigt (Kieselgel $^{\$}$ 60, Dichlomethan/Methanol 95:5, 3.0×30.0 cm). Die Fraktionen IV (10.2 mg) und V (6.6 mg) wurden vereinigt und über Gelchromatographie aufgetrennt (Sephadex LH-20, Aceton, 3.0×150 cm), die Fraktion I enthielt die Komponente 107 (6.9 mg) als weißen Feststoff (Aufarbeitungsschema 11).



Aufarbeitungsschema 11: Trennungsgang für die Substanz 107.

Chemische Charakterisierung der Substanzen aus dem Stamm 3-001

N^b-Acetyltryptamin (24)

gelbliches Öl

 $C_{12}H_{14}N_2O$ (202.26)

Anfärbeverhalten: leuchtend orange-rot (Anisaldehyd)

$$\mathbf{R_{f^{-}Wert}} = 0.36 \text{ (KG}^{\$}60, \text{CHCl}_{3}/\text{CH}_{3}\text{OH 9:1)}.$$

 $0.52 \text{ (RP}^{\$}18, \text{CH}_{3}\text{OH/H}_{2}\text{O 7:3)}.$

UV (CH₃OH) λ_{max} (log ϵ) = 222 (4.0), 283 (2.3) nm.

IR (KBr) = 3400, 1638, 1384, 744 cm⁻¹.

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 202.1 (22) $[M]^+$, 143.1 (100), 130.1 (98).

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = 0.87 (m, 3H, 11-CH₃), 2.92 (t, J = 6.5 Hz, 2H, 8-H), 3.28 (m, 1H, 9-H), 3.46 (t, J = 6.5 Hz, 2H, 8'-H), 7.08 (s, 1H, 2-H), 6.94 (t, J = 2.2 Hz, 1H, 5-H), 7.08 (t, J = 6.0 Hz, 6.0 Hz, 1H, 6-H), 7.38 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 7-H), 7.57 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 4-H).

¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD): $\delta = 25.6$ (q, C-11), 29.4 (t, C-8), 55.9 (t, C-9), 112.0 (d, C-7), 113.2 (s, C-3), 118.8 (d, C-4), 120.7 (d, C-5), 121.2 (d, C-6), 129.7 (s, C-3a), 136.3 (s, C-7a), 206.0 (s, C-10).

Chemische Charakterisierung der Substanzen aus dem Stamm 3-002

Adenosin (33)

blassgelbes Öl

 $C_{10}H_{13}N_5O_4$ (267.25)

R_f-Wert: 0.13 (KG[®]60, CHCl₃/CH₃OH 9:1).

0.46 (KG[®]60, BuOH/Eisessig/H₂O 4:1:5).

0.91 (RP[®]18, CH₃OH/H₂O 7:3).

 $R_t = 9.25 \text{ min. } (B.5.2.I.A.1.a).$

Anfärbeverhalten: schwach gelb bis farblos (Orcin)

grüngelb (Anisadehyd)

UV (CH₃OH) λ_{max} (log ϵ) = 201 (0.43), 259 (0.22) nm.

UV (CH₃OH/HCl) λ_{max} (log ϵ) = 206 (0.48), 258 (0.27) nm.

UV (CH₃OH/NaOH) λ_{max} (log ϵ) = 206 (0.36), 259 (0.20) nm.

IR (KBr) = 3422, 3178, 2920, 2362, 1666, 1650, 1302, 1056 cm⁻¹.

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = 268 (28) $[M+H]^+$.

EI-MS (70 eV): m/z (%) = 267 (6), $[M]^+$, 178 (30), 164 (86), 135 (100), 108 (16).

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 3.63$ (m, 1H, 5-H_a), 3.71 (dd, 1H, 5'-H_b), 3.85 (dd, J = 11.3 Hz, 3 Hz, 1H, 4'-H), 4.14 (d, J = 4 Hz, 1H, 3'-H), 4.31 (d, J = 6 Hz, 4 Hz, 1H, 2'-H), 6.02 (d, J = 6 Hz, 1H, 1'-H), 8.24 (s, 1H, 1-H), 8.48 (s, 1H, 5-H).

¹³C-NMR (150 MHz, d₆-DMSO): $\delta = 61.6$ (t, C-5'), 70.6 (d, C-3'), 73.8 (d, C-2'), 85.8 (d, C-4'), 86.4 (d, C-1'), 119.5 (s, C-3), 140.5 (d, C-1), 149.5 (s, C-6a), 152.4 (d, C-5), 156.5 (s, C-2a).

Cytidin (34)

gelbes Öl

 $C_9H_{13}N_3O_4$ (243.22)

Anfärbeverhalten: schwach gelb bis farblos (Orcin)

grüngelb (Anisaldehyd)

R_f-Wert: 0.13 (KG[®]60, CHCl₃/CH₃OH 9:1).

0.54 (KG[®]60, CH₃OH/CH₃OH 1:1).

0.91 (RP[®]18, CH₃OH/H₂O 7:3).

 $R_t = 8.46 \text{ min. } (B.5.2.I.A.1.a).$

UV (CH₃OH) λ_{max} (log ϵ) = 229.5 (8300), 271 (9100) nm.

IR (KBr) = 3450, 3351, 3277, 3087, 2920, 1213, 855, 845 cm⁻¹.

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = 266 (20) $[M + Na]^{+}$.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 3.73$ (dd, 1H, 5'-H_a), 3.84 (dd, 1H, 5'-H_b), 4.17 (dd, 1H, 4'-H), 4.28 (m, 1H, 2'-H), 4.59 (s, 2H, 3-NH), 5.92 (d, J = 6.0 Hz, 1H, 1'-H), 7.08 (d, 1H 4-H), 7.14 (d, 1H, 5-H).

¹³C-NMR (150 MHz, d₆-DMSO): $\delta = 60.8$ (t, C-5'), 69.4 (d, C-3'), 74.02 (d, C-2'), 84.0 (d, C-4'), 89.2 (d, C-1'), 93.8 (d, C-4), 141.1 (d, C-5), 155.4 (s, C-2), 165.5 (s, C-3).

1H-Indol-3-carbonsäure (38)

weißer Feststoff

 $C_9H_7NO_2$ (161.16)

Anfärbeverhalten: intensiv gelb (Eigenfarbe)

 R_f -Wert = 0.56 (KG[®]60, CHCl₃/CH₃OH 9:1).

0.58 (RP[®]18, CH₃OH/H₂O 7:3).

UV (CH₃OH) λ_{max} (log ϵ) = 270, 280 nm.

EI-MS (70 eV) (positive Ionen): m/z (%) = 161.1 (100) $[M]^+$, 144.1 (98) $[M-OH]^+$, 117 (99) [M-CO₂]⁺.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 7.21$ (m, J = 7.0 Hz, 7.5 Hz, 2H, 5-H/6-H), 7.46 $(d, J = 7.5 \text{ Hz}, 1H, 7-H), 7.83 \text{ (s, 1H, 2-H)}, 8.20 \text{ (d, } J = 7.5 \text{ Hz}, 1H, 4-H)}, 8.27 \text{ (s, 1H, 2-H)}.$

¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD): δ = 111.2 (d, C-7), 118.4 (d, C-4), 119.3 (d, C-5), 121.8 (d, C-6), 122.2 (d, C-3a), 126.5 (s, C-7a), 127.6 (s, C-3), 130.6 (s, C-2), 172.6 (s, 3-COOH).

Indol-3-milchsäure (39)

farbloses Öl

 $C_{11}H_{11}NO_3$ (205.22)

Anfärbeverhalten: dunkelrot (Anisaldehyd)

 R_f -Wert = 0.25 (KG[®]60, CHCl₃/CH₃OH 9:1). 0.72 (RP[®]18, CH₃OH/H₂O 7:3).

UV (CH₃OH) λ_{max} (log ϵ) = 280, 288 nm.

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = 250.1 (20) $[M-H+2Na]^+$.

(negative Ionen): m/z (%) = 431.1 (924) [2M-2H+Na], 204.2 (100) [M-H].

¹**H-NMR (600 MHz, CD₃OD):** δ = 2.97 (dd, 2H, 8-H), 4.28 (d, 1H, 9-H), 4.61 (s_b, 1H, 9-OH), 6.62 (d, 1H, 7-H), 6.94 (t, 1H, 5-H), 7.04 (t, 1H, 6-H), 7.27 (d, 1H, 4-H), 7.63 (d, 1H, 7-H), 7.72 (d, 1H, 1-NH).

¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD): $\delta = 32.4$ (t, C-8), 74.8 d, (C-9), 111.8 (d, C-7), 112.6 (s, C-3), 119.4 (d, C-4), 119.8 (d, C-5), 121.9 (d, C-6), 124.3 (s, C-3a), 128.2 (s, C-7a), 137.9 (d. C-2), 181.1 (s, C-10).

3',4'-O-exo/endo-Chartreusin (115)

blasgelbe Nadeln

 $C_{39}H_{36}O_{14}(728.71)$

Anfärbeverhalten: intensiv gelb (Eigenfarbe)

Na]⁺, HO O CH₃

 $\mathbf{R_{f}\text{-}Wert} = 0.68 \text{ (KG}^{\otimes}60, \text{CHCl}_{3}/\text{CH}_{3}\text{OH 9:1)}.$

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = 1479.8 (31) $[2M+Na]^+$,

751.3 (100) [M+Na]⁺.

(negative Ionen): m/z (%) = 727.5 (100) [M-H]⁻.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 1.04 (d, J = 6.8 Hz, 3H, 5"-CH₃), 1.26 (d, J = 6.4 Hz, 3H, 5"-CH₃), 1.16 (s, 1H, 2"-OH), 2.60 (s, 1H, 2"-OH), 2.98 (s_b, 1H, 4"-OH), 2.78 (s, 3H, 1-CH₃), 3.41 (s, 3H, 3"-OCH₃), 3.75 (dd, J = 9.8 Hz, 3.2 Hz, 1H, 3"-H), 3.81 (m, J = 6.8 Hz, 1H, 2"-H), 4.12 (m, J = 5.8 Hz, 2.4 Hz, 1H, 5'-H), 4.15 (m, J = 6.6 Hz, 2.4 Hz, 1H, 5"-H), 4.18 (m, J = 6.8 Hz, 5'-H), 4.25 (t, J = 5.8 Hz, 2.4 Hz, 1H, 2'-H), 4.43 (t, J = 7.6 Hz, 7.2 Hz, 1H, 3'-H), 5.28 (dd, J = 7.6 Hz, 1H, 1'-H), 5.64 (d, J = 3.9 Hz, 1H, PhCHO-Endo), 5.77 (d, J = 3.9 Hz, 1H, 1"-H), 5.94 (d, J = 3.9 Hz, 1H, PhCHO-Exo), 7.31-8.31 (m, 5H, Ar-H), 11.42 (s, 1H,Ar-OH).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 15.71 (d, 5'-CH₃), 18.23 (d, 5''-CH₃), 21.98 (s, 1-CH₃), 60.53 (q, 3''-O*C*H₃), 61.02 (d, C-5'), 70.15 (d, C-5''), 72.73 (d, C-4''), 73.53 (d, C-2''), 76.62 (d, C-2'), 78.75 (d, C-3'), 84.25 (d, C-3''), 96.03 (s, C-5), 99.78 (d, C-1'), 99.87 (d, C-1''), 102.74 (d, C-16), 108.01 (s, C-15), 115. 96 (d, C-9), 116.99 (s, C-11), 117.10 (d, C-7),

118.75 (s, C-14), 119.05 (d, C-10a), 121.25 (d, C-3), 126.56 (s, C-6a), 126.71 (d, C-18/22), 128.30 (d, C-20), 128.86 (d, C-8), 129.18 (d, C-19/21), 133.82 (d, C-2), 137.61 (s, C-17), 138.10 (s, C-1), 139,26 (s, C-13), 152.98 (s, C-10), 156.02 (s, C-6), 158.73 (s, C-12), 163.41 (s, C-4).

3, 4-O-exo-Benzyliden-6-O-benzoylchartreusin (149)

gelbes Öl

 $C_{46}H_{40}O_{15}(832.33)$

Anfärbeverhalten: gelb (Eigenfarbe)

 $\mathbf{R_{f}\text{-}Wert} = 0.46 \text{ (KG}^{\$}60, \text{CHCl}_{3}/\text{CH}_{3}\text{OH 9:1)}.$

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = $1687.66 (40) [2M+Na]^+$, $855.3 (100) [M+Na]^+$.

(negative Ionen): m/z (%) = 831.5 (100) [M-H]⁻.

¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂): δ = 1.10 (d, J = 7 Hz, 3H, 5"-CH₃), 1.33 (s, 3H, 1-CH₃), 1.48 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 5"-CH₃), 2.97 (s, 3H, 3"-OCH₃), 3.67 (d, J = 10.0 Hz, 1H, 3"-H), 3.70 (ddd, J = 7.0 Hz, 3.0 Hz, 1H, 2"-H), 3.94 (dd, J = 10.0 Hz, 3.0 Hz, H, 2"-H), 4.30 (m, J = 7.0 Hz, 3"-H), 4.28 (m, J = 7.0 Hz, 1.5 Hz, 1H, 5"-H), 4.30 (m, J = 7.0 Hz, 1.5 Hz, 1H, 5"-H), 4.51 (t, J = 7.0 Hz, 1H, 4"-H), 5.25 (m, J = 3.0 Hz, 1H, 1"-H), 5.27 (m, J = 7.0 Hz; 1H, 4"-H), 6.01 (s, 1H, 16-H), 6.05 (m, J = 4.0 Hz, 1H, 1"-H), 6.68 (t, J = 7.0 Hz, 1H, 26/28-H), 6.98 (d, J = 7.0 Hz, 1H, 27-H), 7.10 (t, J = 7.0 Hz, 1H, 25/29-H), 7.45 (t, J = 7.0 Hz, 3.0 Hz, 2H, 21/28-H), 7.50 (ddd, J = 7.0 Hz, 1H, 8-H), 7.56 (d, J = 6.0 Hz, 2H, 2/3-H), 7.74 (d, J = 7.0 Hz, 1H, 9-H), 7.91 (dd, J = 7.0 Hz, 1H, 7-H).

¹³C-NMR (150 MHz, CD₂Cl₂): δ = 15.88 (s, 1-CH₃), 16.54 (d, 5'-CH₃), 22.47 (d, 5''-CH₃), 57.43 (q, 3''-OCH₃), 66.14 (d, C-5''), 69.47 (d, C-3'), 69.51 (d, C-2''), 69.71 (d, C-4''), 77.82 (d,C-3''), 78.69 (d, C-4'), 79.05 (d, C-2'), 79.11 (d, C-5'), 98.77 (d, C-1''), 99.11 (d, C-1'), 105.34 (d, C-16), 109.12 (s, C-5), 113.78 (d, C-20), 118.03 (d, C-18), 118.37 (s, C-15), 118.63 (s, C-14), 119.91 (s, C-5), 120.92 (s, C-11), 126.62 (s, C-10a), 126.70 (s, C-6a), 127.25 (d, C-19), 127.43 (d, C-7), 127.58 (d, C-9), 127.64 (d, C-18), 128.29 (d, C-3), 128.77 (d, C-8), 129.93 (d, C-28), 132.19 (d, C-27), 133.18 (d, C-2), 134.02 (s, C-24), 137.10 (s, C-17), 140.44 (s, C-4), 146.62 (s, C-12), 153.81 (s, C-10), 157.05 (s, C-6), 165.09 (s, C-23).

β-Naphtylbenzoat (154)

gelbliches Öl

C₁₇H₁₂O₂ (248 g/mol)

Anfärbeverhalten: violett (Anisaldehyd).

 $\mathbf{R_{f}\text{-}Wert} = 0.60 \text{ (KG}^{\$}60, \text{CHCl}_{3}/\text{CH}_{3}\text{OH }98:2).$

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = 518.8 (10) $[2M+Na]^+$,

271.0 (100) [M+Na]⁺.

(negative Ionen): m/z (%) = 247.3 (100) [M-H]⁻.

¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂): δ = 7.38 (m, 1H, 7-H), 7.53 (m, 1H, 12-H), 7.54 (m, 1H, 10-H), 7.54 (m, 1H, 1-H), 7.58 (m, 1H, 11-H), 7.56 (m, 1H, 7-H), 7.60 (m, 1H, 3-H), 7.82 (m, 1H, 4-H), 7.94 (m, 1H, 8-H), 8.32 (m, 1H, 13-H), 8.43 (m, 1H, 9-H),

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 118.59 (d, C-3), 121.50 (d, C-1), 125.78 (s, C-6), 126.31 (d, C-5), 126.31 (d, C-7), 126.82 (s, C-3_a), 126.84 (s, C-7_a), 127.25 (d, C-4), 129.05 (d, C-12), 129.05 (d, C-14), 129.48 (d, C-10), 134.11 (s, C-13), 139.47 (d, C-11), 139.47 (d, C-15), 147.24 (s, C-2), 165.47 (s, C-9).

1H-(Indol-3-yl)-essigsäure-naphthalen-2-yl-ester (165)

gelbliches Öl

 $C_{20}H_{15}NO_2$ (301 g/mol)

Anfärbeverhalten: violett (Anisaldehyd).

 R_f -Wert = 0.73 (KG[®]60, CHCl₃/CH₃OH 98:2).

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = 625.3 (10) $[2M+Na]^+$,

324.1 (100) [M+Na]⁺

302.1 (60) [M+H]⁺.

(negative Ionen): m/z (%) = 345.8 (100) [M+HCOO]

300.1 (20) [M-H]⁻.

¹H-NMR (600 MHz, CD₂Cl₂): δ = 4.20 (m, 2H, 8-CH₂), 7.14 (m, 1H, 5-H), 7.20 (m, 1H, 6-H), 7.26 (m, 1H, 5'-H), 7.31 (s, 1H, 2-H), 7.38 (m, 1H, 1'-H), 7.41 (m, 1H, 3'-H), 7.46 (m,

1H, 7'-H), 7.53 (m, 1H, 7-H), 7.70 (m, 1H, 6'-H), 7.78 (m, 1H, 4-H), 7.87 (m, 1H, 4'-H), 7.89 (m, 1H, 8'-H), 8.31 (s_b, 1H, 1-NH).

¹³C-NMR (150 MHz, CD₂Cl₂): δ = 31.60 (d, C-8), 107.14 (s, C-3), 111.65 (d, C-7), 118.38 (d, C-3'), 118.99 (s, C-1'), 119.98 (s, C-4), 136.47 (s, C-3_a'), 121.33 (d, C-5), 122.50 (d, C-6), 123.91 (s, C-2), 126.24 (d, C-6'), 126.71 (d, C-5'), 126.74 (s, C-3_a), 127.08 (d, C-4'), 127.44 (d, C-7'), 128.22 (d, C-8'), 134.84 (s, C-7_a'), 147.04 (s, C-7_a), 147. 06 (d, C-2'), 171.05 (s, C-9).

Chemische Charakterisierung des Spirotetrons (22)

hellbrauner Feststoff

 $C_{20}H_{26}O_8$ (394.16)

Anfärbeverhalten: braun (Orcin)

 R_f -Wert = 0.54 (KG[®]60, CHCl₃/CH₃OH 9:1).

 $R_t = 11.8 \text{ min. } (B.5.2.I.A.1.a).$

UV (CH₃OH) $λ_{max}$ (log ε) = 229 (4.19) nm.

IR (KBr) = 3391, 2972, 1713, 1700, 1631, 1460, 1370, 1301, 1206, 1182, 1168, 1138, 1117, 1090, 1043, 1026, 1009, 969, 942, 923, 815 cm⁻¹.

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = 810.6 (54) $[2M+Na]^+$, 417.2 (100) $[M+H]^+$, 395 (95) $[M+Na]^+$.

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 1.00 (m, J = 6.8 Hz, 3H, 19-H), 1.27 (s, 3H, 16-CH₃), 1.31 (d, J = 7 Hz, 3H, 16-H), 1.98 (d, J = 14.5 Hz, 4.5 Hz, 1H, 3-H_a), 2.37 (d, J = 13.8 Hz, 11.4 Hz, 12-H_a), 2.54 (m, 1H, 13-H), 2.64 (dd, J = 4.0 Hz, 10-H), 2.80 (m, 1H, 4-H), 2.86 (s, 3-H_b), 3.26 (d, J = 8.0 Hz, 8-H), 3.29 (s, 3H, OCH₃), 3.72 (dd, J = 4.0 Hz, 1H, 14-H), 4.45 (dd, J = 8.0 Hz, 4.0 Hz, 9-H), 4.64 (d, J = 4.0 Hz, 15-H), 8.4 (s_b, 1H, 5-OH).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 18.68 (q, C-19), 19.34 (q, C-17), 24.23 (d, C-13), 27.99 C-16), 32.49 (t, C-12), 36.02 (d, C-4), 37.89 (t, C-3), 50.79 (d, C-10), 58.05 (q, OCH₃), 65.15 (d, C-8), 67.63 (d, C-15), 76.19 (C-14), 76.93 (d, C-9), 78.4 (s, C-2), 84.52 (s, C-11), 85.32 (s, C-7), 97.33 (s, C-6), 174.06 (s, C-18), 182.00 (s, C-5), 209.52 (s, C-1).

Naphtoquinomycin C (101)

grüngrauer Feststoff

C₃₉H₄₄CINO₉ (706.27)

Anfärbeverhalten: dunkelbraun (Orcin).

 R_f -Wert = 0.71 (KG[®]60, CHCl₃/CH₃OH 9:1).

 $R_t = 17.8 (B.5.2.I.A.1.a).$

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = 1434 (20) $[2M+Na]^+$,

728 (100) [M+Na]⁺.

(negative Ionen): m/z (%) = 704 (100) [M-H]⁻.

UV (CH₃OH) λ_{max} (log ε) = 232 (4.34), 305 4.25), 380 (sh, 3.55), 580 (2.98) nm. UV (CH₃OH/HCl) λ_{max} (log ε) = 227 (4.35), 283 (4.21), 300 (4.23), 365 (sh, 3.59) nm. UV (CH₃OH/NaOH) λ_{max} (log ε) = 233 (4.34), 303 (4.25), 400 (sh, 3.57), 575 (2.85) nm. IR (CHCl₃) = 3510, 3360, 2980, 1660, 1620, 1475, 1315, 1305 cm⁻¹.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 0.82$ (d, J = 6.5 Hz, 3H, 20-CH₃), 0.96 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 18-CH₃), 1.21 (d, J = 6.0 Hz, 3-H, 8-CH₃), 1.72 (s, 3H, 12-CH₃), 2.03 (s, 3H, 22-CH₃), 2.20 (m, 1H, 18-H), 2.20 (m, 2H, 14-H), 2.31 (m, 1H, 8-H), 2.39 (s, 3H, 26-CH₃), 2.62 (dd, 1H, 10a-H), 2.70 (m, 1H, 20-H), 3.11 (dd, J = 11.0 Hz, 1H, 19-H), 3.15 (dd, J = 16.0 Hz, 1H, 10b-H), 3.59 (ddd, 1H, 9-H), 4.04 (q, J = 15.0 Hz, J = 7.0 Hz, 1H, 15-H), 5.47 (m, J = 15.0 Hz, 17-H), 5.57 (dd, J = 15.0 Hz, J = 7.0 Hz, 1H, 7-H), 5.63 (dd, J = 15.0 Hz, 7.0 Hz, 16-H), 5.92 (d, J = 11.0 z, 1H, 21-H), 5.90 (d, J = 11.0 Hz, 1H, 2-H), 6.26 (t, J = 11.0 Hz, 1H, 5-H), 6.50 (d, J = 15.0 Hz, 1H, 6-H), 6.58 (dd, J = 11.0 Hz, 1H, 4-H), 6.86 (t, J = 11.0 Hz, 1H, 13-H), 6.98 (t, J = 11.0 Hz, 1H, 3-H), 7.98 (s, 1H, 27-H).

¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD): δ = 11.2 (q, 20-CH₃), 11.5 (q, 12-CH₃), 12.8 (q, 22-CH₃), 16.5 (q, 18-CH₃), 16.7 26-CH₃), 17.7 (8-CH₃), 34.0 (, C-20), 36.6 (t, C-14), 40.8 (t, C-10), 41.9 (d, C-18), 45.4 (d, C-8), 71.9 (d, C-15), 73.4 (d, C-9), 76.4 (d, C-19), 119.8 (s, C-27), 120.8 (d, C-2), 121.3 (s, C-26), 123.2 (d, C-4), 126.3 (d, C-6), 131.1 (d, C-27), 132.4 (s, C-24), 133.2 (s, C-31a), 133.6 (d, C-17), 134.8 (s, C-27a), 135.4 (d, C-5), 135.7 (d, C-3), 136.4 (s, C-12), 136.6 (d, C-16), 137.3 (s, C-22), 137.5 (s, C-29), 137.8 (s, C-30), 141.5 (d, C-7), 142.3 (d, C-13), 146.9 (d, C-21), 161.1 (s, C-25), 164.6 (s, C-1), 177.7 (s, C-28), 178.0 (s, C-31).

H₃C

HO

0

21

30

ĊHą

CO₂H

13

ĊH₃

NHAc

16

ĊHą

CH₃

ОН

Naphtomycin J (102)

orange-färbiger Feststoff

 $C_{44}H_{52}N_2O_{12}S$ (832.98)

Anfärbeverhalten: hellbraun (Orcin).

 R_f -Wert = 0.53 (KG[®]60, CHCl₃/CH₃OH 9:1).

 $R_t = 18.7 \text{ min.} (B.5.2.I.A.1.a).$

UV λ_{max} (log ϵ) = 234 (4.39), 2.87 (4.29), 306 (4.31) nm.

IR (CHCl₃) = 1720, 1655 cm⁻¹.

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = 877 (100) $[M-H+2Na]^+$,855 (92) $[M+Na]^+$.

(negative Ionen): m/z (%) = 831 (100 [M-H]⁻.

HREI-MS: gefunden 833.331 für $C_{44}H_{52}N_2O_{12}S$ berechnet 833.331.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): δ = 0.78 (s, J = 6.3 Hz, 3H, 20-CH₃), 0.94 (s, J = 6.5 Hz, 3H, 18-CH₃), 1.17 (s, J = 6.5 Hz, 3H, 8-CH₃), 1.69 (s, 3H, 12-CH₃), 1.83 (s, 3H, NHCOC*H*₃), 2.00 (s, 3H, 22-CH₃), 2.14 (m, 1H, 18-H), 2.28 (m, 3H, 8-H/14H), 2.32 (s, 3H, 26-CH₃), 2.66 (m, 1H, 10a-H), 2.70 (s_b, 1H, 20-H), 2.93 (d, J = 15.5 Hz, 1H, 19-H), 3.04 (s, 1H, 10b-H), 3.24 (d, J = 13.2 Hz, 1H, 32a-H), 3.35 (m, 1H, 32b-H), 4.06 (d, J = 6.0 Hz, 1H, 15-H), 4.48 (s, 1H, 33-H), 5.54 (m, 3H, 7-H/16-H/17-H), 5.87 (dd, J = 1.3 Hz, 10.0 Hz, 1H, 21-H), 6.07 (d, J = 11.9 Hz, 1H, 2-H), 6.27 (dd, J = 11.2 Hz, 1H, 5-H), 6.47 (dd, J = 13.2 Hz, 1H, 6-H), 6.51 (dd, J = 11.3 Hz, 1H, 4-H), 6.66 (dd, J = 6.4 Hz, 1H, 13-H), 6.93 (dd, J = 11.3 Hz, 1H, 3-H), 7.82 (s, 1H, 27-H), 8.80 (s, 1H, 29-NH).

¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD): δ = 10.9 (q, 20-CH₃), 11.3 (q, 12-CH₃), 12.3 (q, 8-CH₃), 16.3 (q, 36-CH₃), 16.5 (q, 22-CH₃), 17.3 (q, 26-CH₃), 22.8 (q, 35-CO*C*H₃), 33.8 (t, C-14), 35.6 (t, 32-S*C*H₂), 36.4 (t, C-18), 40.4 (t, C-8), 41.8 (d, C-8), 45.0 (d, C-20), 71.8 (d, C-19), 73.6 (d, C-15), 76.4 (d, C-9), 120.9 (d, C-7), 121.3 (d, C-6), 122.1 (d, C-16), 124.0 (d, C-17), 126.6 (d, C-21), 130.8 (d, C-12), 132.8 (d, C-2), 133.3 (d, C-5), 134.1 (d, C-3), 135.0 (d, C-4), 136.2 (d, C-12), 136.2 (d, C-22), 137.4 (d, C-13), 138.1 (d, C-16), 141.4 (s, C-30), 141.6 (s, C-28a), 142.5 (s, C-26), 147.8 (s, C-27), 160.0 (s, C-25), 166.2 (s, C-1), 171.0 (s, 36-CONH), 172.4 (s, 34-CO₂), 178.6 (s, C-29), 181.3 (s, C-29a), 201.7 (s, C-23), 203.8 (s, C-11).

OH

Benzoxazomycin (104)

weißer Feststoff

 $C_{36}H_{48}N_2O_8(636.3)$

Anfärbeverhalten: gelb-braun (Orcin).

HO CH₃ O O O O O CH₃

 $\mathbf{R_{f}\text{-}Wert} = 0.65 \text{ (KG}^{\$}60, \text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH } 9:1).$

 $R_t = 9.6 \text{ min. } (B.5.2.I.A.1.a).$

UV λ_{max} (log ϵ) = 215 (4.23), 240 (sh, 4.15), 308 (3.16) nm.

IR (KBr) = 3400, 940, 2850, 1690, 1480, 1270, 1210, 1100, 1000 cm⁻¹.

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = 1295.2 (56) $[2M+Na]^+$, 659.3 (100) $[M+Na]^+$.

(negative Ionen): m/z (%) = $1271.2 (86) [2M-H]^{-}$, $681.1 (78) [M+HCOO]^{-}$, $635.4 (98) [M-H]^{-}$.

¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD): $\delta = 1.14$ (d, 2H, 33-H), 1.24 (m, 2H, 32-H), 1.32 (d, 3H, 24-H₃), 1.59 (m, 1H, 28'-H), 1.59 (m, 3H, 29-H₃), 1.67-1.73 (m, 2H, 34-H), 1.67-1.73 (m, 2H, 35-H), 1.91 (m, 1H, 36-H), 2.10 (m, 3H, 25-H₃), 2.18 (m_{br}, 1H, 31-H), 2.32 (m, 1H, 16-H), 2.34 (m, 1H, 17-H), 2.45 (m, J = 10 Hz, 8.0 Hz, 1H, 10-H), 2.45 (m, J = 7.0 Hz, 1H, 12-H), 2,87 (m, 1H, 16'-H), 2.88 (m, 1H, 17'-H), 2.89 (m, 1H, 2-H), 3.27 (s, 3H, 26-H₃), 4.14 (q, 1H, 3-H), 4.40 (dd, J = 7.0 Hz, 13-H), 4.60 (m, 1H, 15-H), 5.24 (m, J = 8.0 Hz, 1H, 11-H), 5.80 (m, 1H, 9-H), 6.06 (dd, J = 10.0 Hz, 1H, 6-H), 6.32 (dd, J = 10.0 Hz, 1H, 8-H), 6.49 (dd. J = 10.0 Hz, 1H, 7-H), 6.93 (d, J = 2.8 Hz, 1H, 23-H), 7.41 (d, J = 2.8 Hz, 1H, 21-H).

¹³C-NMR (150 MHz, CD₃OD): δ = 11.5 (q, C-24), 17.8 (q, C-29), 19.8 (q, C-25), 26.0 (t, C-34), 26.2 (t, C-35), 29.9 (t, C-32), 30.1 (t, C-16), 31.6 (t, C-36), 33.7 (t, C-17), 42.1 (d, C-12), 45.0 (d, C-31), 49.2 (d C-28), 58.0 (q, C-26), 61.0 (d, C-4), 69.2 (d, C-13), 71.3 (d, C-5), 75.2 (d, C-3), 104.1 (d, C-21), 125.1 (s, C-20), 127.3 (d, C-15), 129.9 (s, C-22), 130.1 (s, C-18), 133.8 (d, C-9), 137.1 (d, C-7), 171.0 (s, C-1), 171.4 (s, C-27), 172.9 (s, C-30).

Prolin-Valin (107)

weißer Feststoff

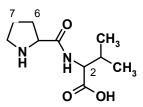
 $C_{10}H_{18}N_2O_3(214.29)$

Anfärbeverhalten: braun (Orcin)

 R_f -Wert = 0.39 (KG[®]60, CHCl₃/CH₃OH 6:1).

 $R_t = 11.4 \text{ min. } (B.5.2.II.A.4.a).$

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = 429.5 (100) $[2M+H]^+$.



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): $\delta = 0.88$ (d, J = 7.0 Hz, 3H, 11-H₃), 1.05 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 12-H₃), 1.23 (s, 1H, 3-NH), 1.88 (m, J = 7.0 Hz, 2.0 Hz, 1H, 8-H), 2.04 (m, J = 2.0 Hz, 1H, 8'-H), 2.36 (m, J = 7.0 Hz, 1H, 6-H), 2.61 (m, J = 7.0 Hz, 1H, 10-H), 3.52 (m, J = 7.0 Hz, 2.0 Hz, 1H, 7-H), 3.64 (m, J = 11.0 Hz, 7.0 Hz, 1H, 7'-H), 3.92 (s, 1H, 2-H), 4.06 (dd, J = 7.0 Hz, 1H, 5-H), 5.99 (s_b, 1H, 9-NH).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃): δ = 16.03 (q, C-11), 19.26 (q, C-12), 22.35 (t, C-8), 28.33 (d, C-10), 28.51 (t,C-6), 45.13 (t, C-7), 58.80 (d, C-5), 60.35 (d, C-2), 164.85 (s, C-1), 169.99 (s, C-4).

C. Literaturverzeichnis

¹ L. J. Rothschild, R. L. Mancinelli, *Nature* **2001**, *6823*, 1092-1101.

² S. Fujiwara, *J. Biosc. Bioengin.* **2002**, *94*, 518-525.

³ F. Niehaus, C. Bertoldo, M. Kähler, G. Antranikian, Appl. Microbiol. Biotech. 1995, 51, 711-729.

⁴ The UCSC Archaeal Genome Browser.

⁵ H. Kleinkauf, H. von Dören, *Biotech.* **1997**, *7*, 139-197.

⁶ C. H. Phoebe, Jr., J. Combie, F. G. Albert, K. van Tran, J. Cabrera, H. J. Correira, Y. Guo, J. Lindermuth, N. Rauert, W. Galbraith, C. P. Selitrennikoff, J. Antibiot. 2001, 1, 56-65.

⁷ K. Venzke, *Dissertation* **2005**, Universität Kiel, 11-12.

⁸ R. Sieber, M.-T. Fröhlich-Weider, Agrarforsch. 2002, 6, 246-251.

⁹ C. H. Phoebe, Jr., J. Combie, F. G. Albert, K. Van Tran K, J. Cabrera, H. J. Correira, Y. Guo, J. Lindermuth, N. Selitrennikoff . J. Antibiot. 2001. 54. 56-65.

¹⁰ D. Schröder, *Dissertation* **2001**, Universität Göttingen.

¹¹ C. A. Volk, H. Lippert, E. Lichte, M. Koeck, Eur. J. Org. Chem. 2004, 14, 3154-3158.

¹² J. Voss, K. Taraz, Z. Budzikiewicz, *Naturforsch*. C **1999**, *54*, 156-162.

¹³ M. Krahe, G. Antranikian, H. Märkl, *FEMS Microbiol. Rev.* **1996**, *18*, 271-285.

¹⁴ J. Gomes, W. Steiner, Food Technol. Biotech. **2004**, *4*, 223-235.

¹⁵ Szuromi P., V. Vinson, E. Marshall, Science **2004**, 303, 1729-1822.

¹⁶ A. Hillisch, R. Hilgenfeld, *Modern Methods of Drug Discovery* **2002**, Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 6-7.

¹⁷ H. B. Bode, R. Müller, Angew. Chem. **2005**, 117, 6988-7007.

¹⁸ National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine **2002**, Bethesda, MD 20894, http://www.ncbi.nlm.nih.gov.
R. P. Herzberg, A. J. Pope, *Curr. Opin. Chem.* **2000**, *4*, 445-451.

²⁰ S. Umezawa, T. Tsuchiya, K. Tatsuta, Y. Horiuchi, T. Usui, H. Umezawa, M. Hamada, A. Yagi, *J. Antibiot*. **1970**, *23*, 20-27.

²¹ H. Zähner, H. Drautz, W. Weber, (Eds. J. D. Bu'Lock, L. J. Nisbet, D. J. Winstley), *Bioactive Microbial* Products Search and Discovery 1982, Academic Press, London, New York, 51-71.

²² S. Breiding-Mack, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 953-960.

²³ H.-P. Fiedler, Nat. Prod. Lett. **1993**, 2, 119-128.

²⁴ J.-L. Wolfender, K. Ndjoko, K. Hostettmann, J. Chromatogr. A **2003**, 1000, 437-455.

²⁵ F. C. Schröder, M. Gronquist, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7280-7290.

²⁶ G. Bringmann, C. Günter, J. Schlauer, M. Rückert, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2805-2811.

²⁷ G. Bringmann, K. Messer, M. Wohlfahrt, J. Kraus, K. Dumbuya, M. Rückert, *Anal. Chem.* **1999**, 70, 2805-2811.

²⁸ M. Kinter, N. E. Sherman, Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry 2000, Wiley-Interscience, New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 195-194.

²⁹ F. Lottspeich, H. Zorbas, *Bioanalytik* **1998**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 206-207.

³⁰ R. S. Plumb, J. H. Granger, C. L. Stumpf, K. A. Johnson, B. W. Smith, S. Gaulitz, I. D., W. Castro-Perez, J. Castro-Perez, The Analyst 2005, 130, 844-849.

³¹ M. S. Butler, Nat. Prod. Rep. **2005**, 22, 162-195.

³² I. Paterson, E. A. Anderson, *Science* **2005**, *310*, 451-453.

³³ J. L. Baryza, S. E. Brenner, M. L. Craske, T. Meyer, P. A. Wender, *Chem Biol.* **2004**, *11*, 1261-1267.

³⁴ P. J. Gane, P. M. Dean, Curr. Opin. Struct. Biol. **2000**, *4*, 401-404.

³⁵ A. Brizzi, M. G. Cascio, V. Brizzi, T. Bisogno, M. T. Dinatolo, A. Martinelli, T. Tuccinardi, V. Di Marzo, Bioorg. Med. Chem. 2007, 16, 5406-5416.

³⁶ J. Clardy, C. Walsh, *Nature* **2004**, *432*, 829-837.

³⁷ Q. Huang, C. A. Roessner, R. Croteau, I. A. Scott, *Biorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2237-2242.

³⁸ K.-H. Altmann, J. Gertsch, Nat. Prod. Rep. **2007**, 24, 327-357.

³⁹ N. H. Oberlies, D. J. Kroll, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 129-135.

⁴⁰ http://nobelprize.org/chemistry

⁴¹ J. D. Bernal, *Nature* **1932**, *129*, 721-722.

⁴² R. B. Woodward, W. E. Doering, J. Am. Chem. Soc. **1945**, 67, 860-874.

⁴³ H. Fischer, K. Zeile, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1929**, 468, 98-116.

⁴⁴ R. B. Woodward, M. P. Cava, W. D. Ollis, A. Hunger, H.U. Daeniker, K. Schenker, *Tetrahedron* 1963, 19,

- 247-288.
- ⁴⁵ J. A. Labinger, S. J. Weiniger, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2664-2672.
- ⁴⁶ W. von E. Doering in H. Hopf, *Classics in Hydrocarbon Chemistry* **2000**, Wiley-VCH, Weinheim, 547.
- ⁴⁷ K. C. Nicolaou, S. A. Snyder, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1036-1069.
- ⁴⁸ A. V. Kalinin, V. Snieckus, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4999-5002.
- ⁴⁹ S.-X. Qiu, L.-Z. Lin, Y. Nan, P. Lin, J.-J. Chen, Z.-X. Zhang, J. Zhou, G. A. Cordell, *Phytochemistry* 1995, 40, 917-921.
- ⁵⁰ R. Pummerer, H. Puttfarcken, P. Schopflocher, Ber. Dtsch. Chem. Ges. B **1925**, 58, 1808-1820.
- ⁵¹ D. H. R. Barton, A. M. Deflorin, O. E. Edwards, *Chem. Ind.* **1955**, 1039.
- ⁵² E. Brochmann-Hanssen, B. Nielsen, Tetrahedron Lett. 1965, 7, 1271-1274.
- ⁵³ A. R. Battersby, G. W. Evans, *Tetrahedron Lett.* **1965**, *7*, 1275-1278.
- ⁵⁴ J. Frackenpohl, *Chemie in unserer Zeit* **2000**, 2, 99-112.
- ⁵⁵ S. Omura, A. Nakagawa, H. Yamada, T. Hata, A. Furusaki, T. Watanabe, *Chem. Pharm. Bull.* 1973, 21, 931-940.
- ⁵⁶ S. J. Gould, N. Tamayo, C. R. Melville, M. C. Cone, J. Am. Chem. Soc. 1994, 116, 2207-2208.
- ⁵⁷ S. Mithani, G. Weeratunga, N. J. Taylor, G. I. Dimitrenko, J. Am. Chem. Soc. **1994**, 116, 2209-2210.
- ⁵⁸ H. B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeeck, *Chem. Bio. Chem.* **2002**, 3, 619-627.
- ⁵⁹ F. M. Huber, R. H. Balltz, P. G. Caltriger, *Appl. Microbiol.* **1968**, 16, 1011-1016.
- ⁶⁰ S. Grabley, J. Wink, A. Zeeck, "Auffinden und isolieren mikrobieller Sekundärstoffe am Beispiel des chemischen Screenings", Jahrbuch der Biotechnologie 1990, Bd. 3, Carl Hanser Verlag, München, 379-390.
- ⁶¹ S. Omura, The Search of Bioactive Compounds from Microorganisms 1992, 303-324.
- ⁶² S. M. Colegate, R. J. Molyneux, *Bioaktive Natural Products* **1993**, 107-145.
- ⁶³ Schröder, Massenspektrometri: Begriffe und Definitionen 1991, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 12.
- ⁶⁴ Y.-Q. Tang, I. Sattler, R. Tiericke, S. Grabley, X.-Z. Feng, Fourth International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-4) 2000 September 1-30.
 ⁶⁵ Autorenkollektiv Chapman & Hall/CRC, Dictionary of natural Products on CD-Rom 2000, Version 9:1,
- 65 Autorenkollektiv Chapman & Hall/CRC, Dictionary of natural Products on CD-Rom 2000, Version 9:1, Chapman & Hall, CRC.
- ⁶⁶H. Laatsch, Naturstoffdatenbank AntiBase, Chemical Concepts **2000**, Weinheim.
- ⁶⁷ K. H. Michel et al., *J. Antibiot.* **1984**, *5*, 441-445.
- ⁶⁸ E. Pretsch, P. Bühlmann, C. Affolter, M. Badertscher, *Spektroskopische Daten zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen* **2001**, 4. Auflage, Springer Verlag, 237-239.
- ⁶⁹ K. B. G. Torssell, *Nat. Prod. Chem.* 1997, Apotekearsocieteten-Swedish Pharmaceutical Society, Stockholm, 26-27.
- M. Grever, K. Kopecky, M. K. Foucar, D. Head, J. M. Bennett, R. E. Hutchison, W. E. Corbett, P. A. Cassileth, T. Habermann, H. Golomb, J. Clinic. Onc. 1995, 4, 974-985.
- ⁷¹ J. Kobe et al., Nucleosides and Nucleotides **1994**, 10, 2209-2244.
- ⁷² J. Balzarini, P. Herdewijn, E. De Clercq, *J. Biol. Chem.* **1989**, *11*, 6127-6133.
- ⁷³ D. M. dos Santos, F. Canduri, J. H. Pereira, M. V. B. Dias, R. G. Silva, M. A. Mendes, M. S. Palma, L. A. Basso, W. F. de Azevedo, Jr., D. S. Santos, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2003, 308, 553-559.
- ⁷⁴ M. Sulpizi, P. Schelling, G. Follkers, P. Carloni, L. Scapozza, *J. Biol. Chem* **2001**, *24*, 21692-21697.
- ⁷⁵ H. Laatsch, *Naturstoffdatenbank AntiBase* **2000**, Chemical Concepts, Weinheim.
- ⁷⁶ F. Ehrlich, K. A. Jacobsen, *Ber. Chem. Ges.* **1911**, *44*, 888.
- ⁷⁷ L. C. Bauguess, C. P. Berg, *J. Biol. Chem.* **1934**, *104*, 675-689.
- ⁷⁸ K. Görlitzer, C. Kramer, H. Meyer, R. D. Walter, H. Jomaa, J. Wiesner, *Pharmazie* **2004**, *4*, 243-250.
- ⁷⁹ C. Hotzel, A. Marotto, U. Pindur, Eur. J. Med. Chem **2002**, *37*, 367-378.
- 80 M. Prudhomme, Curr. Med. Chem 2000, 7, 1189-1212.
- ⁸¹ X. Qu, J. B. Chaires, M. Ohkubo, T. Yoshinari, S. Nishimura, C. Bailly, Anti Cancer Drug Des. 1999, 14, 433-442
- ⁸² C. Carrasco, P. Helissey, M. Haroun, B. Baldeyrou, A. Lansieaux, P. Colson, C. Houssier, S. Giorgi-Renault, C. Bailly, *Chem. Bio. Chem.* 2002, *12*, 1235-1241.
- ⁸³ H.-C. Hotzel, *Dissertation* **2003**, Universität Mainz, 16-19.
- ⁸⁴ C. Bailly, J. B. Chaires, *Bioconjug. Chem.* **1998**, *5*, 514-523.
- 85 Y. Li, F. Li, D. S. Kim, H. D. Choi, B. W. Son, Arch. Pharm. Res. 2003, 1, 21-23.
- 85 Nicola Lysek, Dissertation 2002, Universität Heidelberg, 8-10.

- ⁹¹ F. Lingens, E. Keller, *Naturwiss.* **1983**, *70*, 115-118.
- ⁹² R. A. Dixon, D. Ferreira, *Phytochem.* **2002**, *60*, 205-211.
- ⁹³ T. Fotsis, M. Pepper, H. Adlerkreutz, G. Fleischmann, T. Hase, R. Montesano, L. Schweigerer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Medical Sciences* 1993, 7, 2690-2694.
- 94 C.-Y. Hsieh, R. C. Santell, S. Z. Haslam, W. G. Helferich, *Canc. Res.* **1998**, *17*, 3833-3838.
- 95 J. M. Beale, H. G. Floss, Angew. Chem. 1989, 101, 147-179.
- ⁹⁶ P. W. Schindler, M. C. Scrutton, Eur. J. Biochem **1975**, 55, 543.
- ⁹⁷ W. Pache, D. Chapman, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, *255*, 348.
- ⁹⁸ J. A. Walz, A. C. Horan, M. Kalyanpur, B. K. Lee, D. Loebenberg, J. A. Marques, G. Miller, M. Patel, J. Antibiot. 1981, 34, 1101-1106.
- ⁹⁹ T. Marimoto, M. Fukui, S. Ohkubo, T. Tamaoki, F. Tomita, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1033-1037.
- ¹⁰⁰ I. Tinhofer, G. Anether, M. Senfer, K. Pfaller, D. Bernhard, M. Hara, R. Greil, *FASEB J.* **2002**, *16*, 1295-1297
- ¹⁰¹ I. Tinhofer, G. Anether, M. Senfer, R. Greil, *Blood* **2003**, *101*, 4561-4568.
- ¹⁰² Y. Igarashi, K. Takagi, Y. Kan, K. Fujii, K. Harada, T. Furumai, T. Oki, *J. Antibiot.* **2000**, *3*, 233-240.
- ¹⁰³ J. Marrero, A. D. Rodriguez, P. Baran, R. G. Raptis, J. A. Sanches, E. Ortega-Barria, T. L. Capson, *Org. Lett.* **2004**, *10*, 1661-1664.
- ¹⁰⁴ A. Sutherland, R. A. Hill, *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *4*, H13-H15.
- ¹⁰⁵ J. Marrero, A. D. Rodriguez, P. Barran, R. G. Raptis, J. Org. Chem. **2003**, 68, 4977-4979.
- ¹⁰⁶ J. Marrero, A. D. Rodriguez, P. Barran, R. G. Raptis, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2551-2554.
- ¹⁰⁷ B. Bister, D. Bischoff, M. Ströbele, J. Riedlinger, A. Reicke, F. Wolter, A. T. Bull, H. Zähner, H.-P. Fiedler, R. D. Süssmuth, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 4574-2576.
- J. Riedlinger, A. Reicke, H. Zähner, B. Krismer, A. T. Bull, L. A. Maldonado, A. C. Ward, M. Goodfellow, B. Bister, D. Bischoff, R. D. Süssmuth, H.-P. Fiedler, *J. Antibiot.* 2004, 4, 271-279.
- ¹⁰⁹ A. Bermingham, J. P. Derrick, *BioEssays*. **2002**, *24*, 637-648.
- ¹¹⁰ J. J. Lee, J. P. Lee, P. J. Keller, C. E. Cottrell, C. J. Chang, H. Zähner, H. G. Floss. *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 1123-1134.
- ¹¹¹ Tim Schuhmann, *Dissertation* **2004**, Universität Göttingen, 32-40.
- ¹¹² S. C. Wenzel, R. M. Wiliamson, C. Grünanger, J. Xu, K. Gerth, R. A. Martinez, S. J. Moss, B. J. Carroll, S. Grond, C. J. Unkefer, R. Müller, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 14325-14336.
- ¹¹³ G. Michal (Hrsg.), *Biochemical Pathways* **1999**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- ¹¹⁴ X.-Y. Jia, Z.-H. Tian, L. Shao, X.-D. Qu, Q.-F. Zhao, J. Tang, G.-L. Tang, W. Liu, *Chem. Biol.* 2006, 13, 575-585.
- ¹¹⁵ C. W. Zapf, B. A. Harrison, C. Drahl, E. J. Sorensen, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6691.
- ¹¹⁶ Y. Zou, B. B. Snider, Org. Lett. **2005**, 22, 4939-4941.
- ¹¹⁷ S. T. Harrison, K. C. Nicolaou, Angew. Chem. **2006**, 118, 3334-3338...
- ¹¹⁸ W. Kuhn. H.-P. Fiedler, *Sekundärmethabolismus bei Mikroorganismen* **1995**, Attempto-Verlag, Tübingen, 9-35
- ¹¹⁹ H.-J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, *Biotech.* 1997, VCH Verlagsgeselschaft mbH, 59-105.
- ¹²⁰ O. Hara, T. Beppu, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 349-358.
- ¹²¹ S. Umezawa, T. Tsuchiya, K. Tatsuta, Y. Horiuchi, T. Usui, H. Umezawa, M. Hamada, A. Yagi, *J. Antibiot.* **1970**, *40*, 953-956.
- ¹²² S. Grabley, R. Thiericke, A. Zeeck, *The Chemical Screening Approach in Drug Discovery from Nature* **1999**, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 124-149.
- ¹²³ H. Laatsch, *Naturstoffdatenbank AntiBase* **2000**, Chemical Concepts, Weinheim.
- ¹²⁴ J. Mochizuki, E. Kobayashi., K. Furihata, A. Kawaguchi, H. Seto, N. Otake, *J. Antibiot.* **1986**, *I*, 157-161.
- ¹²⁵ S. Chen, D. von Bamberg, V. Hale, M. Breuer, B. Hardt, R. Müller, H. G. Floss, A. K. Reynolds, E. Leistner, Eur. J. Biochem. (FEBS) 1999, 261, 98-107.
- ¹²⁶ Autorenkollektiv, *Chapman & Hall/CNC*, *Dictionary of Natural Products on CD-ROM* **2000**, Version 9:1, Chapman&Hall, CRC.
- ¹²⁷ A. M. Hooper, R. W. Rickards, *J. Antibiot.* **1998**, *9*, 845-851.
- ¹²⁸ L. F. Fieser, R. H. Brown, J. Am. Chem. Soc. **1949**, 71, 853-856.
- ¹²⁹ M. Hotta, Y. Hayakawa, K. Furihata, A. Schimazu, H. Seto, N. Otake, *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 316-317.
- ¹³⁰ R. Cricchio, P. Antonini, P. Ferrari, A. Ripamonti, G. Tuan, E. Martinelli, J. Antibiot. 1981, 10, 1257-1260.
- ¹³¹ I. V. Hartung, M. A. Rude, N. A. Schnarr, D. Hunziker, C. Khoslaa, J. Am. Chem. Soc. 2005, 32, 11202-11203
- ¹³² R. Cricchio, P. Antonini, G. Sartori, J. Antibiotics 1980, 8, 842-846.

- ¹³³ N. Hosokawa, H. Naganawa, M. Hamada, H. Iinuma, *J. Antibiot.* **2000**, *9*, 886-894.
- ¹³⁴ P. R. August, L. Tang, Y. J. Yoon, S. Ning, R. Müller, T.-W. Yu, M. Taylor, D. Hoffmann, C.-G. Kim, X. Zhang, C. R. Hutchinson, H. G. Floss, *Chem. Biol.* 1998, 5, 69-79.
- ¹³⁵ B. E. Leach, K. M. Calhoun, L. E. Johnson, C. M. Teeters, W. G. Jackson, J. Am. Chem. Soc. 1953, 75, 4011–4012.
- ¹³⁶ J. P. McGovren, G. L. Neil, S. L. Crampton, M. I. Robinson, J. D. Douros, *Canc. Res.* **1977**, *37*, 1666–1672.
- ¹³⁷ K. Sugawara, M. Tsunakawa, M. Konishi, H. Kawaguchi, B. Krishnan, H. Cun-heng, J. Clardy, *J. Org. Chem.* 1987, 52, 996-1001.
- ¹³⁸ M. Uesugi, T. Sekida, S. Matsuki, Y. Sugiura, *Biochem.* **1991**, *30*, 6711–6715.
- ¹³⁹ A. Párraga, M. Orozco, J. Portugal, Eur. J. Biochem. **1992**, 208, 227-233.
- ¹⁴⁰ K. Drlica, R. J. Franco, *Biochemistry* **1988**, 27, 2253-2259.
- ¹⁴¹ F.Barcelo, D. Capo, J. Portugal, Nucl. Ac. Res. 2002, 20, 4567–4573.
- ¹⁴² J. Portugal, Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents 2003, 6, 411–420.
- ¹⁴³ X. Salas, J. Portugal, *FEBS Letters* **1991**, *1*, 223–228.
- ¹⁴⁴ M. J. Waring, C. Bailly, J. Mol. Rec. **1994**, 7, 109–122.
- ¹⁴⁵ M. Takai, Y. Uehara, J. A. Beisler, *J. Med. Chem.* **1980**, 23, 549-553.
- ¹⁴⁶ C. Alhambra, F. J. Luque, J. Portugal, M. Orozco, *FEBS* **1995**, *230*, 555–566.
- ¹⁴⁷ B. E. Leach, K. M. Calhoun. L. E. Johnson, C. M. Teeters, W. G. Jackson, J. Am. Chem. Soc. 1953, 75, 4011-4012.
- ¹⁴⁸ L. H. Sternbach, S. Kaiser, M. W. Goldberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *30*, 1639-1647.
- ¹⁴⁹ W. Eisenhuth, O. A. Stamm, H. Schmidt, *Helv. Chim. Acta* **1964**, *47*, 1475-1485.
- ¹⁵⁰ H. Uchida, Y. Nakakita, N. Enoki, N. Abe, T. Nakamura, M. Munekata, J. Antibiot. **1994**, 6, 648-667.
- ¹⁵¹ H. Uchida, Y. Nakakita, N. Enoki, N. Abe, T. Nakamura, M. Munekata, *Chem. Soc. Chem. Comm.* 1994, 3, 323-324.
- ¹⁵² M. Takai, Y. Uehara, J. A. Beisler, *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 549-553.
- ¹⁵³ K. Kon, H. Sugi, K. Tamai, Y. Ueda, N. Yamada, J. Antibiot. **1990**, 4, 372-382.
- ¹⁵⁴ S. Kamitori, M. Tanaka, Y. Aktia, K. Yamamoto, *Carbohydrate Res.* **2003**, 338, 1523-1525.
- ¹⁵⁵ P- L. Canham, L. C. Vinning, A. G. McInnes, J. A. Walter, J. L. C. Wright, *Can. J. Chem.* 1977, 12, 2450-2457.
- ¹⁵⁶ K. Weissmann, Chem. Biol. 2005, 12, 512-514.
- ¹⁵⁷ Z. Xu, K. Jakobi, K. Welzel, C. Hertweck, Chem. Biol. 2005, 12, 579-588.
- ¹⁵⁸ R. P. Maskey, I. Grün-Wolny, H. Laatsch, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 795-800.
- ¹⁵⁹ K. Kon, H. Sugi, K. Tamai, Y. Ueda, N. Yamada, J. Antibiot. **1990**, 43, 4, 372-382.
- ¹⁶⁰ P. H. Kocieński, *Protecting Groups* **2004**, 3rd Edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- ¹⁶¹ A. K. Prasad, V. Kumar, J. Maity, Z. Wang, V. T. Ravikumar, Y. S. Sanghvi, V. S. Parmar, *Synth. Comm.* 2005, 35, 935-945.
- A. K. Prasad, V. Kumar, J. Maity, Y. S. Sanghvi, V. T. Ravikumar, V. S. Parmar, *Nucleos. Nucleot. Nucl. Ac.* 2005, 24, 747-751.
- A. K. Prasad, V. Kumar, J. Maity, Y. S. Sanghvi, V. T. Ravikumar, V. S. Parmar, *Nucleos. Nucleot. Nucl. Ac.* 2005, 24, 13, 4467-4472.
- ¹⁶⁴ S. Klemenc, For. Sc. Int. 2002, 129, 194-199.
- ¹⁶⁵ A. Göhrt, *Dissertation* **1992**, Universität Göttingen, 18-46.
- ¹⁶⁶ T. Bender, *Diplomarbeit* **2004**, Universität Göttingen.
- ¹⁶⁷ R. Sharma, R. P. Sharma, R. Bala, L. Pretto, V. Ferretti, J. Coordinat. Chem. 2007, 60, 495-504.
- ¹⁶⁸ A. G. M. Barrett, K. Kasdorf, A. J. P. White, D. J. Williams, J. Chem. Soc., Chem. Comm. 1995, 6, 649-650.
- ¹⁶⁹ F. Albericio, L.A. Carpino, *Methods Enzymol.* **1997**, 289, 104-127.
- ¹⁷⁰ W. Y. Chen, J. Lu, Chin. Chem. Lett. **2004**, 15, 1146-1148.
- ¹⁷¹ P. Eckenberg, U. Groth, T. Huhn, N. Richter, C. Schmeck, *Tetrahedron* **1993**, *8*, 1619-1624.
- ¹⁷² I. Papastavrou, *Dissertation* **2000**, Göttingen, 102-103.
- ¹⁷³ A. M. Klibanov, *Nature* **2001**, *409*, 241-246.
- ¹⁷⁴ A. Zaks, A. M. Klibanov, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1985, 82, 3192-3196.
- ¹⁷⁵ A. Zaks, A. M. Klibanov, J. Biol. Chem. 1988, 263, 3194-3201.
- ¹⁷⁶ E. Henke, J. Pleiss, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3211-3213.
- ¹⁷⁷ P. Grochulski, L. Yunge, J. D. Schrag, M. Cygler, *Prot. Sci.* **1994**, *3*, 82-91.
- ¹⁷⁸ J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, T. A. Jones, *Structure* **1995**, *4*, 293-308.
- ¹⁷⁹ S. Raza, L. Fransson, K. Hult, *Prot. Sci.* **2001**, 10, 329-338.
- ¹⁸⁰ T. De Diego, P. Lozano, S. Gmouth, M. Vaultier, J. L. Iborra, *Biomacromol.* **2005**, *3*, 1457-1464.
- ¹⁸¹ D. Bianchi, P. Cesti, E. Battistel, *J. Org. Chem.* **1998**, *53*, 5531-5534.

Danksagung

Zuvorderst möchte ich meinen fleißigen Korrekturlesern danken, ohne deren kritischen Blick und hilfreiche Ratschläge diese Arbeit in ihrem vollen Ausmaß fertig zu stellen, nicht möglich gewesen wäre: Melanie Quitschau, Adriana Textor, Jens Bitzer, Daniel Vollmar, Nadine Czempinski, Philip Kössler Marko Gentzsch, Luise Hoffmann, Sandra Lösgen und Diana Wolff. Meiner Betreuerin PD Dr. Stephanie Grond danke ich für die fachliche Unterstützung, ihren Ideenreichtum und das stetige Interesse sowie für das Vorantreiben der schriftlichen Arbeiten.

Nadine Czempinski und Daniel Vollmar danke ich für Ihr unermüdliches Engagement und so manche eingeleiteten Ausnahmen bei HPLC-MS Messungen. Natürlich gilt mein Dank auch den Mitarbeitern der Zentralen Analytik- und Massenspektrometerie-Abteilung György Udvarnoki, Frau Krökel und Herrn Frauendorf. Für die Aufnahme der NMR-Spektren danke ich sowohl dem motivierten NMR-Team unserer Abteilung (Inken Plitzko, Sandra Lösgen und Frank Surup), als auch den Mitarbeitern der NMR-Abteilung Carola Zolke, Christiane Siebert und Martin Weitemeyer. Dem Leiter der NMR-Abteilung Herrn Machinek danke ich für seine Unterstützung bei aufgetretenden Problemen in der Strukturaufklärung. Mein besonderer Dank für seine unverzichtbare Hilfe beim Kultivieren und vielen anderen Laborarbeiten gilt Hans-Jörg Langer. Für das Weitergeben eines Teiles seiner enormen Laborerfahrung und technischen Unterstüztung bei der präparativen HPLC danke ich Hans-Peter Kroll. Vielen Dank für 23 kg Steine aus Korfu, HP! Marko Gentzsch danke ich nochmals für seine unvergleichliche Hilfeleistung und endlose Geduld, die er bei mir und anderen Computerlegasthenikern aufgebracht hat. Für die einmalige, sehr herzliche Arbeitsatmosphäre und die unvergesslichen gemeinsamen Ausflüge möchte ich meiner Abteilung danken, hier namentlich: Marko, Inken, Nadine, Melli, Daniel, Philip, Adriana, Sandra, Jens, Diana, Lui, Tim, Ina, Olli, Gerald, Sven, Markus, Frank, Nadine Beetz und Mieke Westerman. Unseren wunderbaren technischen Asisstenten und Laboranten gebührt ebenfalls ein "Danke", ohne Euch wäre unsere kleine Familie nicht vollständig: Jana, Kerstin, Micha, Verena und Jutta. Die einmalige Sternenkonstellation, die uns zusammengebracht hat, wird sich wohl sehr schwer wiederholen! Auch den Menschen außerhalb der Uni, die mich geprägt haben, gilt an dieser Stelle mein besonderer Dank: Lara, Leif, Marc, Ana. Ihr habt dazu beigetragen diesen Abschnitt meines Lebens zu einem der schönsten zu versüßen.

Die letzten Korrekturen vor der Veröffentlichung sind sorgfältig durch die Hände der strengen aber gerechten Korrektoren Ljiljana Miscevic und Ivan Bosnjak gegangen. An dieser Stelle ein großes Dankeschön!

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die ganze Unterstüzung, Ermutigung und das grenzenlose Vertrauen, das sie in mich gesetzt haben.

Um Goran für alles zu danken, was er für mich getan hat und dafür, dass er stets zu mir gehalten hat, reichen Worte nicht aus. Lebenslauf

Am 23. Oktober 1975 wurde ich, Adrijana Kubicek-Pejic (geb. Kubicek), als Tochter von

Zdenko Kubicek und Ranka Kubicek, geb. Babic, in Tuzla/Bosnien und Herzegowina

geboren.

In der Zeit von 1982 bis 1990 besuchte ich die Grundschule "Braca Ribar" in Tuzla. Ab

Herbst 1990 besuchte ich das "Mesa Selimovic" Gymnasium in Tuzla und legte im Schuljahr

1993/1994 meine Allgemeine Hochschulreife ab. Im Sommersemester 1997 erfolgte meine

Immatrikulation an der Georg-August-Universität zu Göttingen, der am April 2000 die

Diplom-Chemiker-Vorprüfung folgte. Im Sommersemester 2002 begann ich unter Leitung

von Herrn Prof. Dr. C. Schneider mit meiner Diplomarbeit zum Thema "Variation der

Aldehyde in Domino-Aldol-Tishchenko-Reaktion mit Diacetonalkohol als Enolat-

Äquvivalent". Die Diplomhauptprüfung bestand ich im Juni 2003.

Von November 2003 bis November 2007 fertigte ich die vorliegende Arbeit am Institut für

Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen im Arbeitskreis von Frau

PD Dr. Stephanie Grond an.

Göttingen, 01. September 2007

(Adrijana Kubicek-Pejic)