Strukturaufklärung der Phenalinolactone

und

Beiträge zur Biosynthese der Hexacyclinsäure

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Sven Wolfgang Meyer

aus Bremen

Göttingen 2003

D7

Referent: Prof. Dr. A. Zeeck

Korreferent: Prof. Dr. U. Diederichsen

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Januar 2004

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen von Juli 2000 bis Dezember 2003 unter Anleitung von Prof. Dr. Axel Zeeck durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Axel Zeeck danke ich für sein stetes Interesse und viele wertvolle Diskussionen, die den Weg zu der vorliegenden Arbeit begleitet haben.

Inhaltsverzeichnis

A. Theoretischer Teil

II. Einleitung 1

2.1 Quo vadis Life Sciences? 1

2.2 Zur Rolle von Naturstoffen in der Pharmaforschung 3

2.3 Wie sieht die Zukunft der pharmazeutischen Forschung aus? 5

2.4 Aufgabenstellung 10

III. Phenalinolactone A - D aus *Streptomyces* sp. Tü 6071 11

3.1 HPLC-DAD-Screening 11

3.2 Der Stamm *Streptomyces* sp. Tü 6071 12

3.3 Metabolitenspektrum des Stammes *Streptomyces* sp. Tü 6071 12

3.4 Strukturaufklärung der Phenalinolactone 14

3.4.1 Strukturaufklärung der Hauptkomponente Tü-6071 A 15

3.4.2 Zur Struktur des Zuckeranteils 17

3.4.3 Methyl-pyrrolcarbonsäure und Acetylgruppe 19

3.4.4 Tricyclus des Aglycons 20

3.4.5 Lactonbaustein des Aglycons 23

3.4.6 Relative Stereochemie der Phenalinolactone 25

3.4.7 Phenalinolacton A 26

3.4.8 Phenalinolactone B - D 28

3.5 Strukturvergleich mit Brasilicardin A 29

3.6 Überlegungen zur Biosynthese der Phenalinolactone 30

3.7 Fütterungsexperimente mit dem Stamm Tü 6071 39

3.8 Chemische Derivatisierung des Phenalinolacton A 40

3.9 Biologische Wirkungen 40

3.10 Beurteilung der Biosyntheseleistung des Stammes Tü 6071 41

3.11 Ausblick 42

IV. *Streptomyces cellulosae* subsp. *griseorubiginosus* S 1013 43

4.1 Bekannte Metaboliten des Stammes S 1013 43

4.2 Reproduzierbarkeit der Hexacyclinsäure-Bildung 46

4.3 Neue Metabolite aus dem Stamm S 1013 48

4.3.1 *N*-Acetyl-Tryptamin 48

4.3.2 7-*O*-Methyl-Gabosin E 49

4.3.3 14-Desacetyl-14-propionyl-hexacyclinsäure 49

V. Untersuchungen zur Biosynthese der Hexacyclinsäure 51

5.1 Zur Hexacyclinsäure strukturverwandte Substanzen 51

5.1.1 Strukturvergleich von Hexacyclinsäure und FR182877 51

5.1.2 Zur biologischen Aktivität von FR182877 52

5.1.3 Überlegungen zur Biosynthese von FR182877 53

5.1.4 Hexacyclinsäure und FR182877 aus der Sicht eines Synthetikers 55

5.2 Kennt die Natur die Diels-Alder-Reaktion? 57

5.3 Bekannte Fütterungsexperimente mit ^{13}C-markierten Vorläufern 59

5.3.1 Fütterung von [1-^{13}C]Acetat, [2-^{13}C]Acetat und [1,2-$^{13}C_2$]Acetat 60

5.3.2 Fütterung von [1-^{13}C]Propionat und [3-^{13}C]Propionat 60

5.3.3 Fütterung von [1,4-$^{13}C_2$]Succinat 61

5.3.4 Diskussion der Fütterungsergebnisse 62

5.4 Fütterungsexperimente mit ^{13}C- und ^{18}O-markierten Vorläufern 63

5.4.1 Fütterung von [1-^{13}C, $^{18}O_2$]Acetat 63

5.4.2 Fütterung von [1-^{13}C, $^{18}O_2$]Propionat 66

5.4.3 Scrambling in der Biosynthese 69

5.5 Weitere Fütterungsexperimente 69

5.5.1 Fütterung von deuteriertem Acetat 69

5.5.2 Kultivierung des Stammes S 1013 unter [$^{18}O_2$]Atmosphäre 71

5.6 Hypothetischer Biosyntheseweg der Hexacyclinsäure 71

5.7 Chemische Modifikation der Hexacyclinsäure 78

5.7.1 Umsetzung mit methanolischer Natronlauge 79

5.7.2 Umsetzung mit p-Toluolsulfonsäure 80

5.7.3 Acetylierung 80

5.7.4 Diskussion der chemischen Reaktivität 82

5.8 Biologische Wirkungen der Metaboliten 83

5.9 Ausblick 84

VI. Chemisches Screening von Streptomycetenstämmen 86

6.1 Zur Technik des chemischen Screenings 87

6.2 Untersuchte Streptomycetenstämme 88

6.3 Der Stamm Alv 5 89

6.4 Ausblick 91

VII. Zusammenfassung der Ergebnisse 92

B. Experimenteller Teil

1. Allgemeines 95

1.1 Instrumentelle Analytik 95

1.2 Chromatographische Methoden 97

1.3 Mikrobielle Methoden 98

2. Phenalinolactone A - D aus *Streptomyces* sp. Tü 6071 114

2.1 Stammhaltung 114

2.2 Kultivierung und Standardaufarbeitung 114

2.3 Durchführung von Fütterungsexperimenten 115

2.4 Kristallisierungsversuche 115

2.5 Chemische Derivatisierung von Phenalinolacton A 115

2.6 Isolierung und Charakterisierung der Metabolite 116

3. *Streptomyces cellulosae* subsp. *griseorubiginosus* S 1013 102

3.1 Stammhaltung 102

3.2 Kultivierung und Standardaufarbeitung 103

3.3 Wachstumskurve und Ausbeutebestimmung mittels HPLC 103

3.4 Durchführung von Fütterungsexperimenten 104

3.5 Chemische Modifikation der Hexacyclinsäure 105

3.6 Isolierung und Charakterisierung der Metabolite aus S 1013 106

3.7 Isolierung und Charakterisierung der Hexacyclinsäure-Derivate 111

4. Chemisches Screening 122

4.1 Durchführung des chemischen Screenings 122

4.2 6-Dihydro-3-desmethyl-acetomycin aus Stamm Alv 5 123

C. Literaturverzeichnis 124

D. Anhang 128

A. THEORETISCHER TEIL

1. Einleitung

1.1 Quo vadis Life Sciences?

Anfang der achtziger Jahre begann in der Chemie- und Pharmabranche eine Periode reger Umstrukturierungen und Umorientierungen, die auch jetzt noch anhält. Pharmazeutische und agrochemische Bereiche wurden zusammengelegt, oftmals in Kombination mit biotechnologischen Anwendungen, und das Ganze „Life Sciences“ genannt. Die Hoffnung bestand darin, Synergismen in Forschung und Entwicklung sowie in der verwendeten Technologie nutzen zu können[1]. In der folgenden Zeit entstanden durch vielfache Fusionen und Aufkäufe kleinerer Betriebe Großunternehmen wie Aventis oder Novartis[*].

Bereits kurz vor Beginn des neuen Jahrtausends wandten sich die ersten Firmen wieder von diesem Konzept ab. Der insbesondere in den USA gesunkene Profit in der Landwirtschaft hatte die Agrarindustrie schwer getroffen und stand somit im krassen Gegensatz zum zweistelligen Wachstum des Pharmamarktes[1]. In Verbindung mit dem von Anteilseignern ausgeübten Druck, den Gewinnfaktor zu erhöhen, führten die divergenten Märkte zu einer neuen Welle von Umstrukturierungen. Die Agrarbereiche wurden ausgelagert und erneute Fusionen und Aufkäufe führten zum jetzigen Bild der zumeist getrennt voneinander existierenden Pharma- bzw. Agrarunternehmen[**].

Ein Blick auf die Börsendaten verrät, dass oftmals auch nach der Abspaltung des landwirtschaftlichen Teils kein signifikanter Anstieg der Aktienkurse zu verzeichnen ist[1]. Rein wirtschaftlich gesehen zahlen sich Fusionen nur aus, wenn dadurch eine höhere Gewinnspanne erreicht wird. Pharmaunternehmen vertreten vielfach die Meinung, dass wirtschaftliche Größe ein entscheidender Faktor ist, um auf dem Markt zu bestehen. Es zeigte sich jedoch, dass trotz des betriebswirtschaftlichen Potentials für größere Effizienz die Firmenröße allein nicht entscheidet[2]. Oftmals sind die neu entstandenen Unternehmen nicht innovativer als zuvor[3], die Aufkäufe dienen lediglich der Verringerung der Konkurrenz. Zusätzlich führen Fusionen und Umstrukturierungen zu Unterbrechungen in Forschung und

[*] Aventis entstand 1999 aus den Pharma- und Agrochemiebereichen der Firmen Hoechst und Rhône-Poulenc, Novartis wurde 1997 in gleicher Weise von den Firmen Sandoz und Ciba-Geigy gegründet.

[**] Elf Monate nach der Gründung spaltete Aventis den Agrobereich ab (Aventis CropScience). Im Jahr der Gründung kombinierte Novartis seinen agrochemischen Zweig mit AstraZeneca, es entstand daraus Syngenta.

Entwicklung. Ein guter Teil des Wachstums nach einer erfolgten Fusion lässt sich auf Kosteneinsparungen zurückzuführen[2].

Aufgrund der immensen Entwicklungskosten (etwa 600 Mio. $[4]) und -zeiten (12 bis 15 Jahre[5]) für ein neues Medikament kann eine zusätzliche Woche während der Entwicklung weit über eine Mio. Dollar kosten. Schätzungen gehen davon aus, dass zwei Drittel der Entwicklungskosten in die Untersuchung von schließlich doch nicht verwendeten Leitstrukturen fließen[4]. Aus diesen Gründen werden unsichere Projekte schneller aufgegeben. Ein finanziell wichtiger Faktor für die forschende Pharmaindustrie ist zudem, dass sie zunehmend mit dem Auslaufen ihrer Exklusivitätsrechte für Patente konfrontiert wird. So sanken die Verkaufszahlen von Eli Lillys Antidepressivum Prozac® innerhalb von zwei Monaten um 70 %, als nach Ablauf des Patentschutzes preiswerte Generika auf den Markt kamen. Innerhalb des nächsten Jahrzehnts werden im Pharmabereich Patente mit einem Marktvolumen von mehr als 60 Mrd. $ auslaufen, 13 der 35 führenden Medikamente verlieren ihren Patentschutz bereits innerhalb der nächsten fünf Jahre[7].

Vor allem finanzielle Überlegungen führten zu der Strategie, durch einen immer größeren Proben- und Targetdurchsatz die Zahl der Leitsubstanzen zu erhöhen. Der daraus resultierende Trend zu Automatisierung und Miniaturisierung förderte die Entwicklung des High Throughput Screenings und erzeugte einen stetig wachsenden Bedarf an neuen Substanzen für die Testsysteme. Mehrere Tausend Substanzen können bei Verwendung eines Assays derzeit pro Woche untersucht werden[6]. Mit dieser Entwicklung einher ging eine Abwendung von Naturstoffen als Ideengeber für Leitstrukturen, da sie erheblich kosten- und zeitaufwändiger in der Erforschung sind als synthetische Verbindungen. Durch die große Zahl an Syntheseprodukten, die mittels kombinatorischer Chemie erzeugt werden können, hoffte man, ausreichend Ansatzpunkte für neue Medikamente zu finden. Auffällig ist allerdings, dass trotz einer Vervielfachung des Screeningdurchsatzes die Zahl der erfolgreichen Leitstrukturen nicht im gleichen Maße angestiegen ist. Die an die kombinatorische Chemie gestellten Erwartungen wurden nicht erfüllt.
Es wird deutlich, dass sich die pharmazeutische Industrie derzeit in einer Produktivitäts- und Innovationskrise[7] befindet, was sich unter anderem in einem Rückgang der neu auf den Markt eingeführten Arzneimittel ausdrückt: 2001 waren es nur 37, was ein 20-Jahres Tief darstellt[7]. Kritische Stimmen sprechen von einer „Target-reichen, aber Leitstruktur-armen Ära“, in der wir uns befinden[8].

Angesichts der steigenden Anzahl sowohl neuer (SARS) als auch bereits besiegt geglaubter infektiöser Krankheiten (z.B. Tuberkulose, Influenza) drängt sich die Frage auf, ob nicht auch die Industrienationen Gefahr laufen, in einigen Jahren ohne Verteidigung gegen bakterielle Infektionen dazustehen.

1.2 Zur Rolle von Naturstoffen in der Pharmaforschung

Von der Kombinatorischen Chemie bereits weitgehend zurückgedrängt erleben Naturstoffe derzeit eine „Wiederentdeckung". Es wurde erkannt, dass Substanzbibliotheken, die nur aus synthetischen Produkten bestehen, eine erheblich geringere strukturelle Komplexität und Diversität aufweisen[9]. So unterscheiden sich die Strukturen von synthetisierten Verbindungen, Naturstoffen und Medikament-Wirkstoffen in wichtigen Punkten, von denen einige hier zur Verdeutlichung aufgezeigt werden sollen:

Eigenschaft	**Syntheseprodukte**	**Medikamente**	**Naturstoffe**
Molmasse (g/mol)	393	340	414
Anzahl drehbarer Bindungen	6.4	5.6	4.4
Anzahl chiraler Zentren	0.4	2.3	6.2
Mehrfachbindungsanteil	12.0	8.0	8.8
Anzahl N-/O-Atome	2.69/2.77	1.64/4.03	0.84/5.9
Anzahl S-/Halogenatome	0.45/0.80	0.23/0.34	0.03/0.02

Tabelle 1: Durchschnittswerte ausgewählter molekularer Eigenschaften von Syntheseprodukten (n = 670536), Medikamenten (n = 10968) und Naturstoffen (n = 3287) [10]

Tabelle 1 verdeutlicht, dass Syntheseprodukte im Schnitt erheblich weniger Chiralitätszentren besitzen. Es ist bekannt, dass dies die biologische Aktivität von Wirkstoffen deutlich senken kann. Produkte der kombinatorischen Chemie sind biologisch weniger relevant[8], Naturstoffe besitzen hingegen die Fähigkeit, funktionelle Gruppen in einer günstigeren Zusammenstellung zu präsentieren[9]. Anders ausgedrückt bedeutet das Ersetzen von Naturstoff-basierten Substanzbanken durch solche, die nur kombinatorische Substanzen enthalten, nichts anderes als das Zurückgreifen auf eine ungünstigere Verbindungsklasse.

Dass Substanzen aus Mikroorganismen oder Pflanzen logische Startpunkte für die Suche nach Wirkstoffen gegen Infektionen oder Krebs sein können, ist aufgrund ihrer Bedeutung im Produzenten verständlich, sollen sie doch unter anderem bei der Bekämpfung von Konkurrenten oder Schädlingen helfen. Die Evolution betrieb ihre eigene Art von kombinatorischer Chemie und optimierte verschiedene Substanzen für diese Aufgabe[3]. Warum aber sollten sich Strukturen speziell gegen bestimmte menschliche Krankheiten, z.B. Schizophrenie, entwickelt haben? Diese nicht ganz unberechtigte Frage trug entscheidend zur Verunsicherung Naturstoffen gegenüber bei. Zur Bewertung ist es hilfreich, sich vor Augen zu führen, dass in der Natur fundamentale Prozesse wie der Energie-Metabolismus hoch konserviert sind. Zum Vergleich: ca. 65 % der humanen Krankheitsgene finden in dem Fadenwurm *C. elegans* ein Pendant[11].

Analysiert man Proteine auf strukturelle Elemente hin, so findet man hoch konservierte Anteile, die Domänen, die durch Peptidlinker miteinander verbunden und zur Sekundärstruktur organisiert werden[12]. Im Gegensatz zu den hunderttausenden menschlichen Enzymen gibt es laut Schätzungen, die auf laufenden Genomsequenzierungsprojekten beruhen, nur 4000 bis 60000 verschiedene Domänen[12]. Strukturell gesehen können Enzyme einander also recht ähnlich sein, auch wenn sie völlig verschiedene Funktionen erfüllen. Die Ähnlichkeit in der Protein-Domänen Struktur kann dazu genutzt werden, basierend auf einer Leitstruktur Inhibitoren für Enzyme mit verschiedener Funktion zu entwickeln. Ein Beipiel für die Berechtigung dieses Ansatzes sind Ergebnisse des Screenings nach potenteren Inhibitoren der Leukotrien A4 (LTA4) Hydrolase[9]. Das Enzym katalysiert den letzten Schritt in der Biosynthese von Leukotrien A4 und spielt somit eine wichtige Rolle in der Reaktion des Körpers bei Entzündungen. Die katalytischen Domänen besitzen eine große Ähnlichkeit zu bestimmten Metalloproteasen wie dem Thermolysin[12]. Dies wurde als Ansatzpunkt zu einem Screeningprogramm verwendet, in dem eine Serie von Analoga des Thermolysin-hemmenden Bestatins synhetisiert und auf Aktivität hin überprüft wurden. Es konnten so Inhibitoren gewonnen werden, die im nanomolaren Bereich wirken.
Vor etwa 10 Jahren bestimmte die wissenschaftliche Meinung das Argument, dass aufgrund von Domänenähnlichkeiten entwickelte Wirkstoffe nicht enzymspezifisch genug seien[13]. Inzwischen ist akzeptiert, dass die Natur in der Feinstruktur der Domänen ausreichend variiert hat, um Selektivität zu garantieren. Allerdings erreicht man nur mit separater Optimierung für das einzelne Enzym bestmögliche Ergebnisse.

Da Naturstoffe von Enzymen produziert werden, besitzen sie zwangsläufig eine Affinität zu verschiedenen Enzymklassen bzw. -domänen. Für dieses Phänomen wurde der Begriff „privilegierte Strukturen“ geprägt (Evans, Merck[12]). Auf der Suche nach Leitstrukturen für ein bestimmtes Target sind demzufolge Substanzbibliotheken auf Basis von natürlichen Verbindungen ein guter Ansatz. Bei der Wirkstoffsuche aber Substanzbibliotheken einzusetzen, die nur aus Naturstoffen bestehen, wäre im Sinne der zuvor geforderten Diversität kontraproduktiv. Es konnte gezeigt werden, dass aus Naturstoffen und Naturstoffanaloga bestehende Banken effektiver sind als reine Naturstoffbanken[9].

Die Tatsache, dass 61 % aller in den Jahren 1981 bis 2002 als Medikament eingeführten kleinen Moleküle von Naturstoffen abgeleitet oder aber von ihnen inspiriert sind[*], verdeutlicht die Bedeutung der Naturstoffe für die Pharmaforschung[14]. In bestimmten therapeutischen Bereichen ist der Anteil sogar noch größer: z.B. bei Krebstherapeutika (74 %) und bei antibakteriellen Wirkstoffen (78 %). Aus der kombinatorischen Chemie ist dagegen bis heute kein *de novo* synthetisiertes Produkt bekannt, das bereits in der Anwendung ist[14] und nur eins, das sich zurzeit in Phase II der klinischen Tests befindet[15].

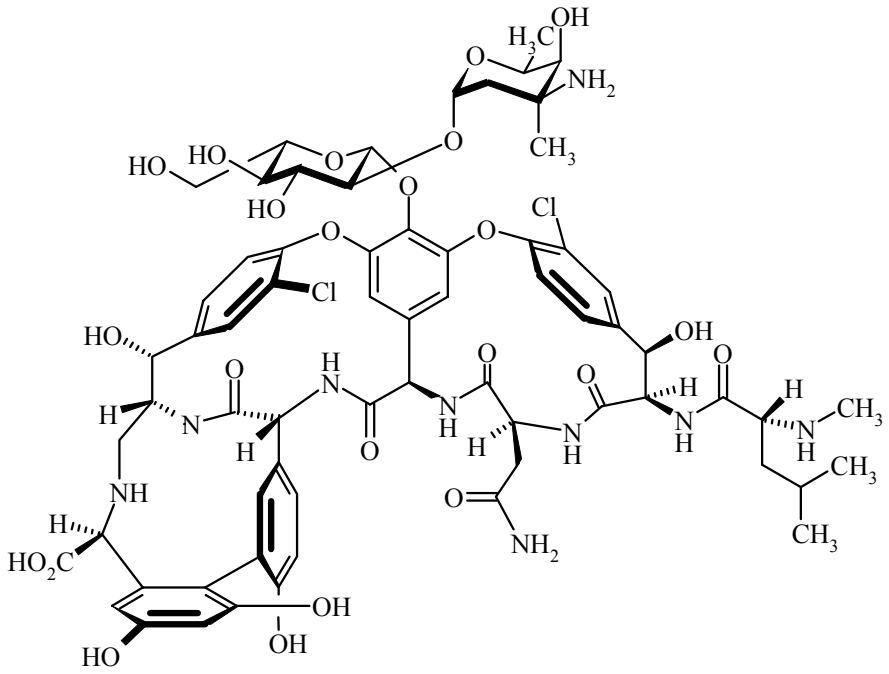
1.3 Wie sieht die Zukunft der pharmazeutischen Forschung aus?

Nachdem ein Innovationsdefizit in der Industrie sichtbar geworden ist[9] und Naturstoffe nicht mehr nur als Quelle für antibakterielle oder gegen Krebs wirksame Substanzen betrachtet werden, müssen die strategischen Entscheidungen der 90er Jahre im Lichte neuer Erkenntnisse überdacht werden. In diesem Zusammenhang ist von großer Bedeutung, dass sich auch die Naturstoffforschung stark weiterentwickelt hat[13]. So hat im letzten Jahrzehnt die Geschwindigkeit der Identifizierung neuer Metaboliten aus der Natur erheblich zugenommen. Durch die Kopplung von HPLC mit verschiedenen spektroskopischen Nachweistechniken, z.B. UV/Vis[16], UV/NMR[17], oder UV/MS können bereits bekannte Verbindungen über Datenbankabgleich sehr schnell identifiziert und Reisolierungen vermieden werden. Diese Techniken werden zukünftig bei der Entdeckung neuer Leitstrukturen eine größere Rolle spielen.

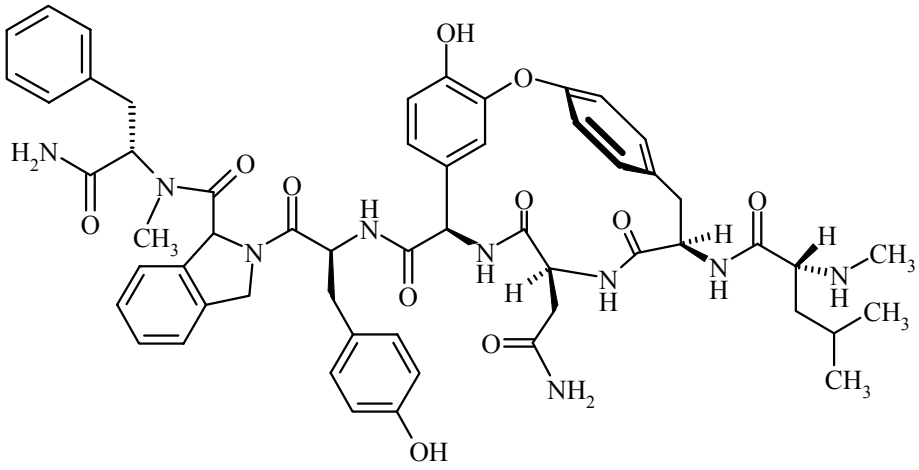
[*] Naturstoffe 6 %, Naturstoffderivate 27 %, synthetische Komponenten mit Naturstoff-basiertem Pharmakophor 5 %, synthetische Produkte, die aufgrund von Wissen aus der Naturstoffforschung erstellt wurden (Naturstoffimitatoren) 23 %. In diesen Zahlen nicht enthalten sind Derivate oder Analoga von schon auf dem Markt befindlichen Wirkstoffen.

Auch in der Anwendung der kombinatorischen Chemie scheint sich ein Paradigmenwechsel dahingehend zu manifestieren, dass nicht die reine Anzahl an Verbindungen als bestimmend für die Qualität einer Substanzbibliothek angesehen wird, sondern ihre strukturelle Diversität[12]. Intensive Forschung führte zu neuen Methoden[18], mit deren Hilfe auch komplexe Naturstoffe mit einer zweistelligen Anzahl an Reaktionsschritten synthetisch hergestellt und dabei kombinatorisch eine Vielzahl an Analoga kreiert werden können[19,20,21]. Vielfach bewährt hat sich die Methode der Festphasensynthese[21,22].

Besondere Erwähnung verdient eine Veröffentlichung von Ellman und Mitarbeitern, die die Erstellung einer Bibliothek von mehr als 39000 Vancomycin-Derivaten und -angelehnten Substanzen beschreibt[23]. Da Vancomycin (**1**) als Reserve-Therapeutikum bei Methicillin-resistenten Stämmen dient, hat eine Resistenz gegen **1** bei Patienten besonders schwere Folgen. Resistente Stämme synthetisieren einen veränderten Vorläufer der Zellwandbiosynthese, in dem eine terminale D-Alanin Einheit des Peptidoglykans durch D-Lactat ersetzt ist[24]. Anstelle einer Wasserstoff-Brückenbindung zur Vancomycin-Bindestelle wird dadurch eine abstoßende Wechselwirkung eingeführt, die die Affinität um den Faktor 1000 verringert. Aus der Bibliothek der kombinatorisch erzeugten Vancomycin-Derivate konnte eine Substanz (**2**) identifiziert werden, die trotz ihrer etwas abgeschwächten Bindung an die unmodifizierte Seitenkette fünfmal stärker an die Lactat-enthaltende Seitenkette bindet. Dieser Effekt resultiert aus der relativen Flexibilität des acyclischen Tripeptids im linken Molekülteil. **2** könnte sich zu einem wichtigen Ansatzpunkt bei der Überwindung der Vancomycin-Resistenz entwickeln[23].



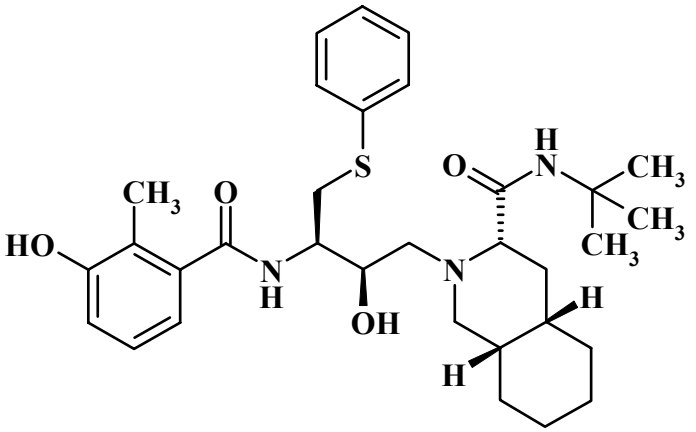
Vancomycin (**1**)



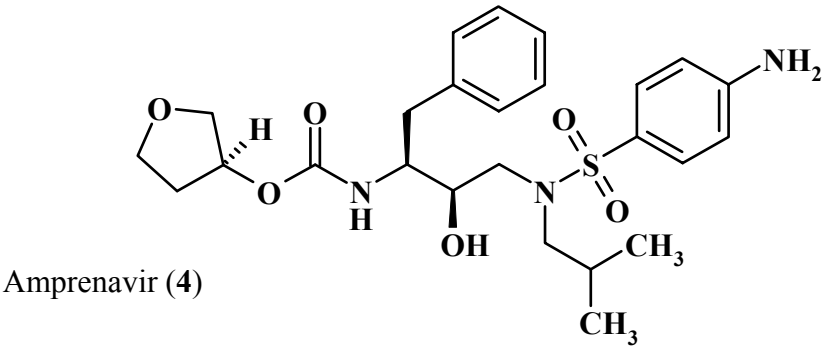
Vancomycin-Derivat (**2**)

Ein weiteres Beispiel dafür, dass Naturstoffe als biologisch validierte Startpunkte für das Bibliothekdesign durch kombinatorische Chemie dienen und dabei in relativ kleinen Banken eine deutlich höhere Trefferquote liefern können, ist die Synthese einer Nakijichinon-Substanzbank[25,26]. Von 56 Analoga der Nakijichinone hemmte eine Verbindung selektiv den KDR-Rezeptor, eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die an der Tumor-Angiogenese beteiligt ist.

Der nahezu exponentielle Fortschritt in der Computertechnologie ermöglicht die Berechnung von Wechselwirkungen zwischen Molekülen, deren Bestimmung noch vor 15 Jahren beträchtlichen Aufwand in der klinischen Forschung erfordert hätte. Beispielsweise können klinische ADME/T* Studien erheblich verkürzt werden, indem die Lebertoxizität und die Affinität zu Membran-Transporterproteinen von Wirkstoffen berechnet werden. Bisher sind allerdings nur wenige Wirkstoffe direkt auf dieses Drug Design zurückzuführen. Viracept® (Nelfinavir, **3**) und Agenerase® (Amprenavir, **4**) sind zwei Beispiele[8] für peptidmimetische HIV-Protease-Inhibitoren, die durch Molecular Modeling entwickelt wurden.



Nelfinavir (**3**)



Amprenavir (**4**)

High Throughput Kristallographie[27] soll die Bestimmung von Proteinstrukturen selbst bei geringen Ausgangsmengen[8] ermöglichen. Mit Kristallstrukturen könnten viele der unzähligen potentiellen Targets, die das Humangenom-Projekt erbracht hat bzw. noch erbringen wird, einem virtuellen Screening zugeführt werden. Praktisch „*in silico*“ können auf diese Weise Substanzbanken auf potentielle Inhibitoren durchsucht werden.

Viele Anwendungsmöglichkeiten eröffnet die Forschung auf dem Gebiet der „Proteomics“. Durch Vergleich von Expressionszuständen in krankem und gesundem Gewebe lassen sich

* ADME/T = Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion und Toxizität.

funktionelle Zusammenhänge von Enzymen und Krankheiten aufdecken[28]. Dies wird eine gezieltere Suche nach Wirkstoffen zur Therapie von Krankheiten ermöglichen.

Da es für ein Krankheitsbild verschiedene Ursachen gibt[29], heißt die Zukunft der medizinischen Therapie Individualisierung. Schon lange wird die „Verabschiedung vom Durchschnittspatienten“ gefordert, da im Durchschnitt nur etwa 20 bis 40 % der Patienten optimal auf ein Medikament reagieren[30]. Derzeit werden genetische Testsysteme lediglich verwendet, um für klinische Untersuchungen die richtigen Testpersonen auszuwählen.

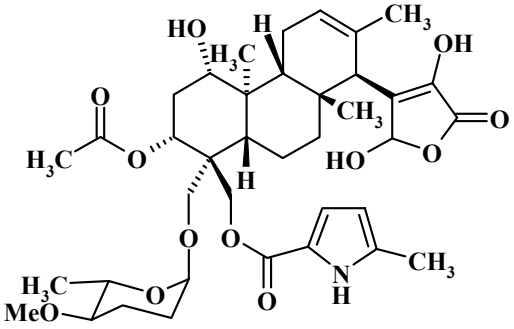
Seit der Schaffung der Life Sciences hat die pharmazeutische Forschung gewaltige Umstrukturierungen und Neuerungen in der Technik erfahren. Durch das Scheitern rein synthetischer Ansätze bei der Wirkstoffsuche zeichnet sich deutlich ab, dass die Zukunft der Pharmaindustrie von der Etablierung neuer Leitstrukturen aus der Natur abhängt. So wird es ein wichtiges Ziel sein, das Potential der Natur nutzbar zu machen. Derzeit sind schätzungsweise erst 1 - 10 % der als kultivierbar geltenden Mikroorganismen auf Sekundärstoffproduktion hin untersucht worden[31]. Neben dem Rückgriff auf seltene Mikroorganismen oder marine Organismen eröffnet auch die intensive Erforschung einzelner Bakterienstämme Wege zu interessanten neuen Naturstoffen. Die vorliegende Arbeit gibt mit den bakteriellen Sekundärstoffen Phenalinolacton A (**5**) und Hexacyclinsäure (**6**) zwei Beispiele für die Berechtigung dieses Ansatzes, da derart komplexe Strukturen sicherlich von keinem Chemiker der sich für eine effiziente Synthese interessiert dargestellt worden wären.

1.4 Aufgabenstellung

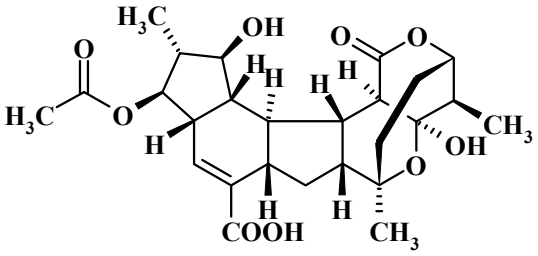
Die vorliegende Arbeit umfasst drei Teilbereiche.

1) Im Arbeitskreis von Prof. Dr. H.-P. Fiedler (Universität Tübingen) wurde der Stamm *Streptomyces* sp. Tü 6071 im HPLC-DAD-Screening durch die Produktion von vier verschiedenen Substanzgruppen als interessant eingestuft. Aus der Substanzgruppe IV, deren Komponenten im Kulturfiltrat angereichert wurden, ließen sich das neue Phenalinolacton A (**5**) und drei weitere Derivate isolieren. Im Rahmen der Zusammenarbeit sollte die Struktur dieser neuen Sekundärstoffe aufgeklärt werden. Ferner war angestrebt, durch erste Fütterungsexperimente einen Beitrag zur Biosynthese zu leisten.

2) Die von R. Höfs begonnenen Untersuchungen zur Biosynthese der Hexacyclinsäure (**6**) wurden fortgeführt. Zunächst galt es, eine gute Reproduzierbarkeit der Hexacyclinsäure-Produktion sicherzustellen. Verschiedene Fütterungsexperimente, auch von ^{13}C- und ^{18}O-markierten Vorläufermolekülen, sollten dazu dienen, Einblicke in den Ablauf der Biosynthese zu erhalten. In diesem Zusammenhang erschienen besonders die Cyclisierungsmechanismen interessant.
   Ferner sollten durch chemische Modifikation von **6** Derivate gewonnen und diese auf biologische Aktivität hin untersucht werden.



5



6

3) Die aus drei verschiedenen Erdproben in unserer Arbeitsgruppe isolierten Streptomycetenstämme sollten auf ihre Sekundärstoffproduktion hin untersucht werden. Ziel war es, im chemischen Screening auffällige Substanzen durch Kultivierung der Stämme im größeren Maßstab in ausreichender Menge zu isolieren und die Struktur aufzuklären.

2. Phenalinolactone A - D aus *Streptomyces* sp. Tü 6071

7.1 HPLC-DAD-Screening

Der Stamm *Streptomyces* sp. Tü 6071 wurde auf die Produktion von Sekundärstoffen hin untersucht. Die mikrobiologischen Arbeiten von der Stammisolierung und -charakterisierung bis hin zur Kultivierung sowie der Isolierung neuer Sekundärstoffe führte K. Gebhardt im Rahmen seiner Dissertation durch[32], die Strukturaufklärung isolierter Substanzen erfolgte anschließend in der Arbeitsgruppe G. Jung (Universität Tübingen) bzw. im Rahmen dieser Arbeit.

Für die Suche nach neuen Naturstoffen diente in diesem Projekt das physiko-chemische HPLC-DAD-Screening, kombiniert mit einem biologischen Screening[33]. Die Stämme wurden dazu in vier verschiedenen Nährmedien kultiviert und die Kulturbrühe zur Extraktion in Kulturfiltrat und Myzelbestandteile getrennt. Sowohl Kulturfiltrat- und Myzelextrakt als auch ein Extrakt der Kulturbrühe wurden im Agardiffusionstest auf antimikrobielle Aktivität hin untersucht. Parallel dazu erfolgte die chromatographische Analyse in einem standardisierten HPLC-Programm. Die vom ***D***iode ***A***rray ***D***etector (DAD) aufgenommenen UV/Vis-Spektren liefern in Kombination mit den zugehörigen Retentionszeiten ein charakteristisches Bild. Computergestützt können diese Daten mit einer internen Datenbank* abgeglichen werden. Der sogenannte „Match"-Faktor ist ein Maß für die Ähnlichkeit zu bekannten Verbindungen dieser Datenbank. Recht früh im Screeningprozess lassen sich auf diese Weise bekannte Metaboliten von der weiteren Bearbeitung ausschliessen. UV-Spektren ähnlich denen bereits bekannter Substanzen können auf verwandte Verbindungen oder aber gleiche Chromophore hindeuten. In der Regel lassen sich im HPLC-Diagramm anhand der UV-Spektren Substanzgruppen bilden.

Als potentiell neue Strukturen werden Signale im Rohproduktchromatogramm interpretiert, zu denen ausschließlich Einträge mit geringem Match-Faktor ermittelt werden. Die dazu gehörigen Substanzen werden UV-geleitet chromatographisch aufgereinigt. Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass nur UV-aktive Metaboliten erkannt werden.

* HPLC-UV-Vis-Database, Prof. Dr. H.-P. Fiedler (Tübingen), z. Z. 732 Einträge.

7.2 Der Stamm *Streptomyces* sp. Tü 6071

Streptomyces sp. Tü 6071 stammt aus einer Bodenprobe, die im tropischen Regenwald bei Cape Coast in Ghana gesammelt wurde. Anhand morphologischer und chemotaxonomischer Charakteristika ordnete K. Gebhardt den Stamm in die Gattung Streptomyces ein[32]. Die Amplifizierung des 16 S rDNA-Gens und anschließender Sequenzvergleich führten zur Identifizierung von *Streptomyces thermocarboxydus* (DSMZ 44293) als nächsten phylogenetischen Nachbarn mit einer Übereinstimmung von 98.1 %.

7.3 Metabolitenspektrum des Stammes *Streptomyces* sp. Tü 6071

Im Zuge des Screenings wurde Tü 6071 in vier verschiedenen Nährmedien kultiviert. Da das Wachstum und die Diversität der im HPLC-Chromatogramm nachgewiesenen Substanzen im Nährmedium NL19 am ausgeprägtesten war, wurde dieses Medium bei Ansätzen in vergrößertem Maßstab verwendet. Im Myzelextrakt konnten drei (I - III) und im Kulturfiltrat-Extrakt eine interessante Substanzgruppe (IV, s. Abb. 1) identifiziert werden, letztere wurde von mir weiter bearbeitet[*].

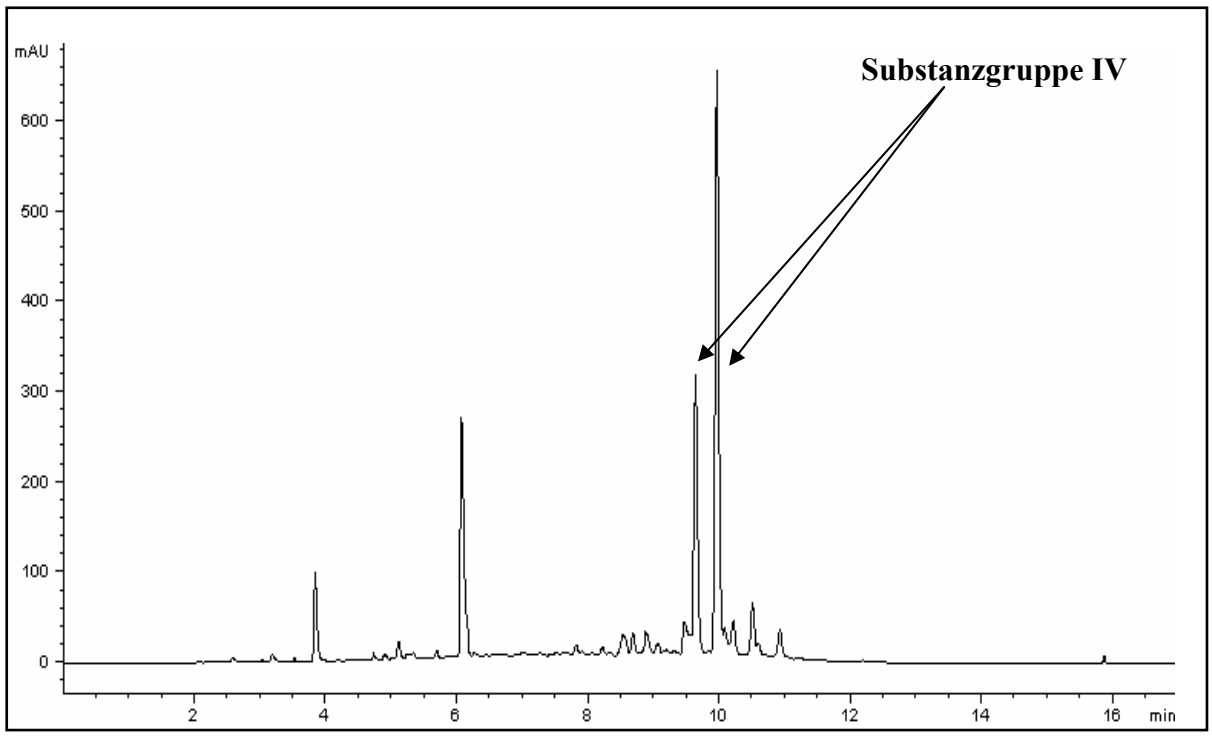


Abbildung 1: HPLC-Chromatogramm des Kulturfiltratextraktes von Tü 6071

[*] Für die Überlassung der Substanzen danke ich Herrn Prof. Dr. H.-P. Fiedler (Universität Tübingen)

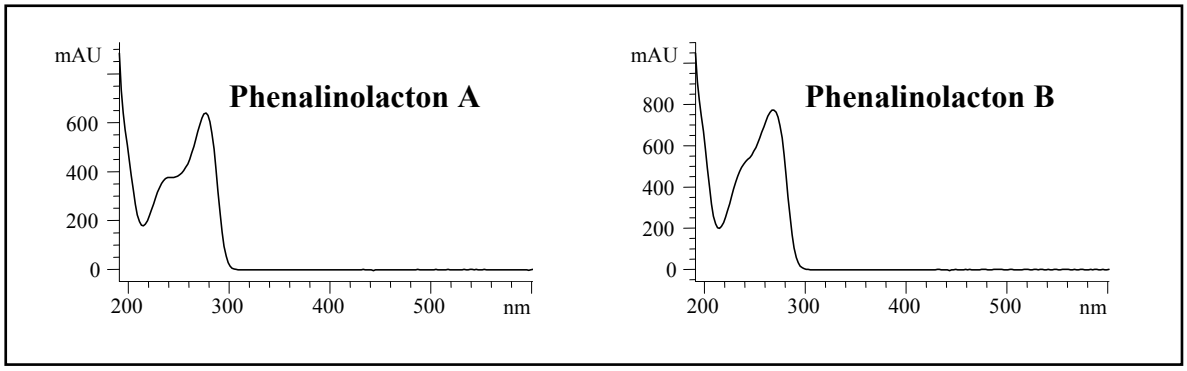
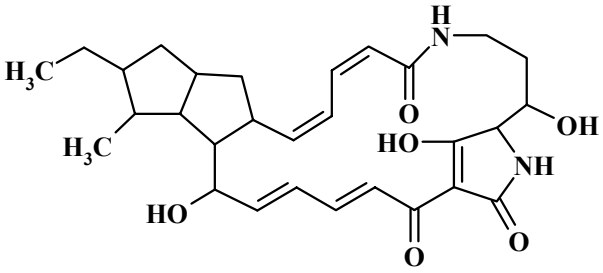
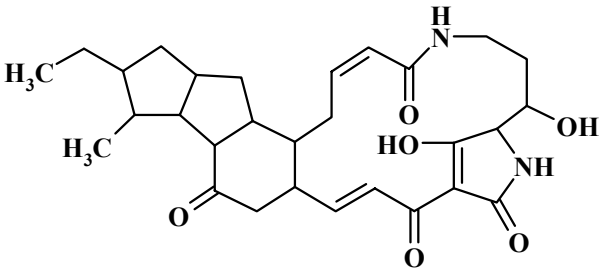


Abbildung 2: UV-Vis-Spektren von zwei Substanzen der Substanzgruppe IV

Die Substanzen der Gruppe I zeigten im UV-Spektrum eine große Ähnlichkeit zu den Makrolactamantibiotika Alteramid und Maltophilin. Drei Komponenten dieser Substanzgruppe konnten isoliert und durch Strukturaufklärung im AK G. Jung als Maltophilin (**7**), Dihydromaltophilin (**8**) und Alteramid (**9**) identifiziert werden.

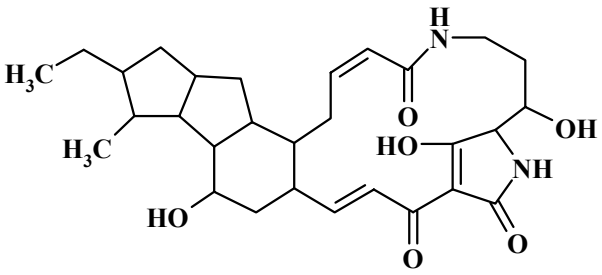
Maltophilin (**7**)



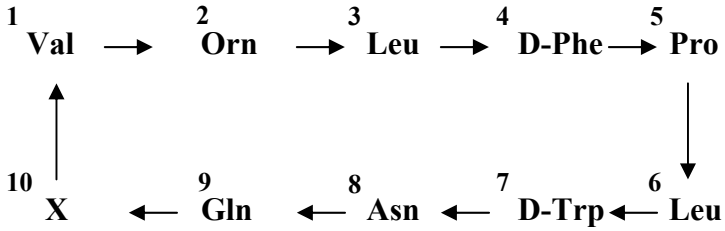


Dihydromaltophilin (**8**)

Alteramid (**9**)



Von der Substanzgruppe II wurden vier Komponenten aufgereinigt, deren UV-Spektren ähnlich denen der Bacillus-Peptide Tyrocidin und Gramicidin S waren. Die Strukturaufklärung führte zu vier neuen cyclischen Decapeptiden, den Streptocidinen A bis D (**10**)[34,35]. Peptidantibiotika dieser Art konnten bisher nicht aus Streptomyceten isoliert werden.



Streptocidine (**10**)

Streptocidin	Aminosäure X
A	L-Tyr
B	L-Trp
C	D-Trp
D	L-Trp, D-Phe an Pos. 7 (statt D-Trp)

Die Substanzen der Gruppe III befinden sich derzeit noch in der Strukturaufklärung im AK G. Jung.

7.4 Strukturaufklärung der Phenalinolactone

Aus der Substanzgruppe IV wurden vier Komponenten rein erhalten, die anhand der produzierten Menge bzw. der Reproduzierbarkeit als 6071-A (bis 10 mg/L), 6071-B (bis 10 mg/L), 6071-C (2 - 10 mg/L) und 6071-D (2 mg/L) benannt wurden. Aus den Merkmalen der Struktur ergab sich der Name Phenalinolacton.

Die Hauptkomponente 6071-A wurde regelmäßig produziert, die anderen hingegen teilweise gar nicht oder aber in nur geringen Mengen. Alle Reinsubstanzen haben eine weiß-gelbliche Farbe und sind in Benzol, Chloroform, Dichlormethan, Aceton, DMSO, Methanol und Pyridin gut löslich. Während in Pyridin eine langsame Zersetzung stattfindet, sind die Stoffe in anderen Lösungsmitteln stabil. Sowohl Licht als auch trockene Lagerung bei Raumtemperatur führen nur zu sehr langsamer Zersetzung. Auf verdünnte Säuren und Basen reagieren die Komponenten A bis D hingegen empfindlich.

Die Massenspektren lieferten durch ungerade Molmassen erste Hinweise auf die molekulare Zusammensetzung der Komponenten (s. Tabelle **2**), da ungerade Zahlenwerte auf das Vorhandensein von wenigstens einem Stickstoffatom im Molekül hindeuten.

Phenalinolacton	Molmasse (g/mol)	Retentionszeit (min)
A (= 6071-A)	715	9.9
B (= 6071-B)	701	9.9
C (= 6071-C)	745	9.6
D (= 6071-D)	699	12.03

Tabelle 2: Molmassen und Retentionszeiten der Phenalinolactone

Anhand der Hauptkomponente 6071-A wurde die Struktur des Grundgerüstes aufgeklärt. Die Komponenten B - D konnten durch Vergleich der NMR-Spektren und Molmassen als Derivate der Hauptkomponente erkannt werden.

7.4.1 Strukturaufklärung der Hauptkomponente Tü 6071-A

Das ^{13}C-NMR-Spektrum von 6071-A zeigt 38 Signale, von denen 19 im APT-Spektrum positive Werte (CH_3- und CH-Gruppen) und die restlichen negative Werte (CH_2-Gruppen bzw. quartäre C-Atome) aufweisen. Zusammen mit den $^1J_{CH}$-Korrelationen des HSQC-Spektrums ergibt sich, dass im Molekül drei Ester-/Amidgruppen, acht weitere quartäre Kohlenstoffatome, 12 Methin-, acht Methylen-, sechs Methylgruppen sowie eine Methoxygruppe vorhanden sind. Acht der Kohlenstoffatome liegen in einem für Aromaten oder Olefine charakteristischen Bereich.

Das ^{1}H-NMR-Spektrum (500 MHz, $CDCl_3$) zeigt vier mit D_2O austauschbare Protonen. Im aliphatischen Bereich sind die Signale stark überlagert, was die Zuordnung von Korrelationen in den zweidimensionalen Spektren erheblich erschwerte. Die Ermittlung der jeweiligen Kopplungspartner gelang durch Vergleich der in $CDCl_3$ bzw. Benzol-d_6 gemessenen Spektren. Das aromatische Lösungsmittel konnte die problematischen Überlagerungen zwar nicht aufheben, führte jedoch zu einer anderen Signalseparation. Diese Lösungsmitteleffekte entstehen durch Wechselwirkungen zwischen dem Lösungsmittel und gelösten Molekülen und können systematisch zur Strukturaufklärung genutzt werden[36]. Man vergleicht dazu Spektren, die in einem unpolaren Lösungsmittel aufgenommen wurden mit solchen, die in

einem Lösungsmittel mit starkem Anisotropieeffekt (Benzol oder andere Aromaten) gemessen wurden. In einem ähnlichen Fall konnte durch den Wechsel von CD_3OD zu Pyridin-d_5 die Strukturaufklärung der Hexacyclinsäure erheblich gefördert werden[37].

Ein hochaufgelöstes ESI-Massenspektrum* von 6071-A führte in Kombination mit den NMR-Daten zur Summenformel

$$\mathbf{C_{38}H_{53}NO_{12}}$$

Die Anzahl der Doppelbindungsäquivalente entsprechend dieser Summenformel beträgt 13. Abzüglich der drei Ester-/Amidgruppen sowie vier möglichen Doppelbindungen bleiben sechs Äquivalente, die hier durch Ringbildung zu erklären sind.

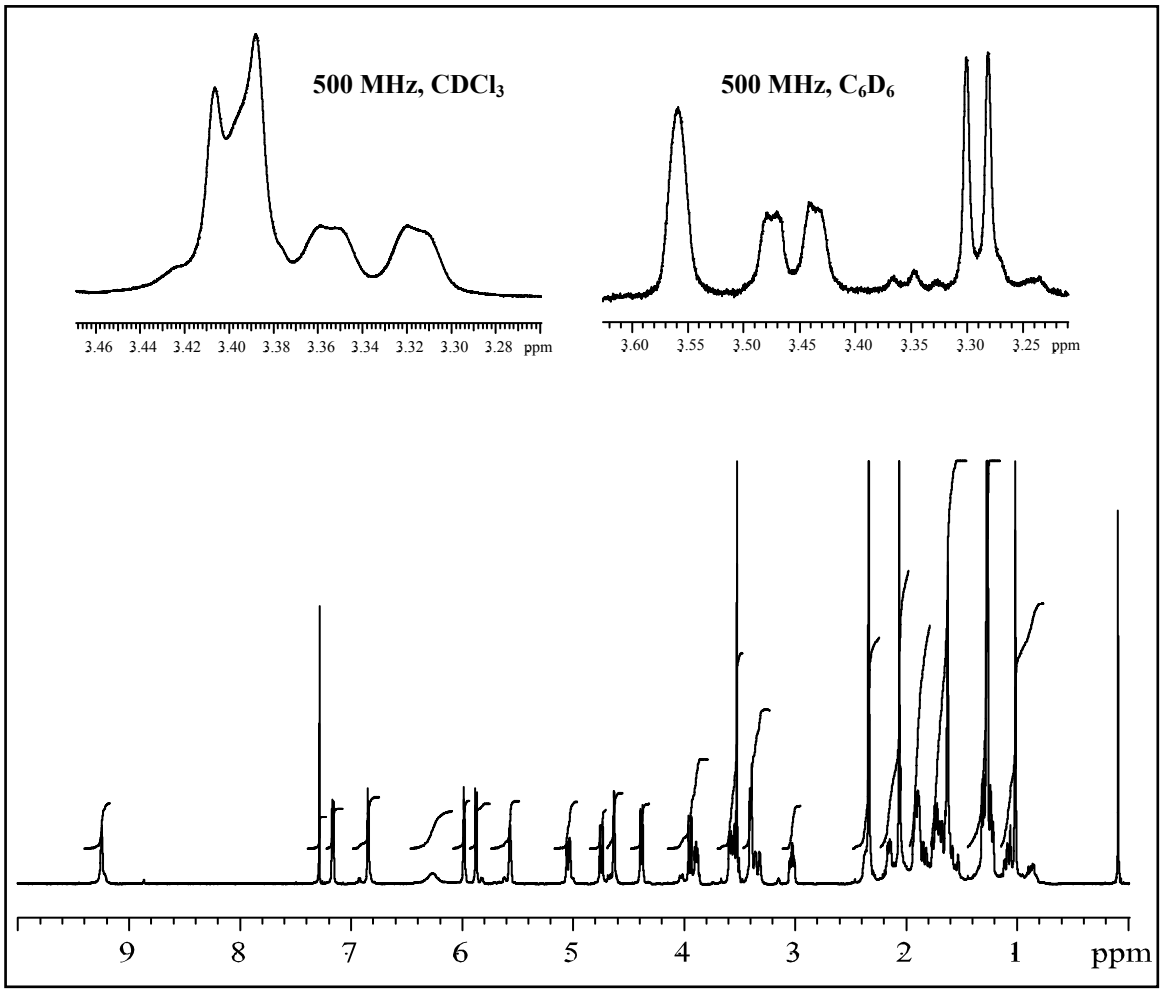
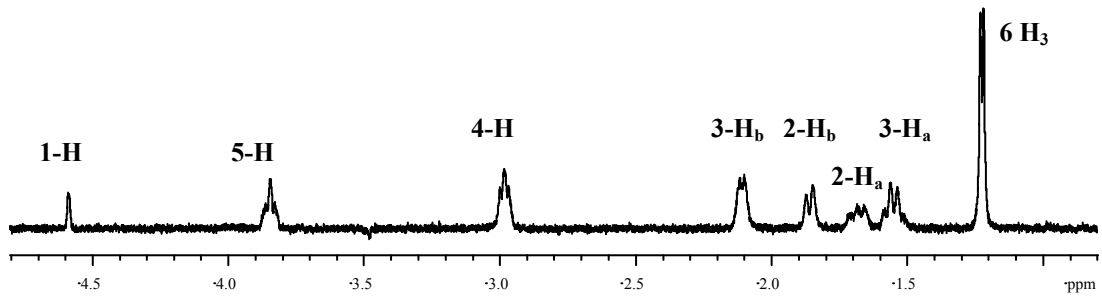


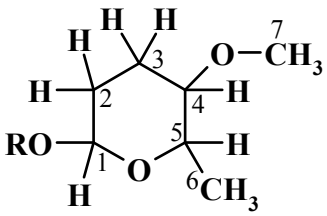
Abbildung 3: ^{1}H-NMR-Spektrum der Komponente Phenalinolacton A (500 MHz, $CDCl_3$). Die Spreizungen entsprechen derselben Signalgruppe, einmal in $CDCl_3$ gemessen und einmal in Benzol-d_6

* Für die Messung des HR-ESI Massenspektrums danke ich Herrn Dr. J. Fuchser, Bruker Daltonik GmbH, Bremen.

7.4.2 Zur Struktur des Zuckerbausteins

Das ^{1}H-NMR-Spektrum von 6071-A (Phenalinolacton A) zeigt bei $\delta_H = 4.63$ ein zum Dublett aufgespaltenes Signal. Das zugehörige Kohlenstoffatom hat im ^{13}C-NMR-Spektrum eine chemische Verschiebung von $\delta_C = 98.2$ Diese Werte entsprechen typischen Verschiebungen des anomeren H- bzw. C-Atoms eines Zuckers. Durch selektive Einstrahlung auf ein Proton lassen sich mit Hilfe einer TOCSY-Pulssequenz die zu demselben Spinsystem gehörenden Protonen identifizieren. Dies führte im Falle des beschriebenen Protons zur Resonanz in sieben Signalen, von denen eins von einer Methylgruppe erzeugt wird (s. Abb. 4). Die Zuordnung der $^{2}J_{HH}$- und $^{3}J_{HH}$-Kopplungen anhand des COSY-Spektrums ermöglichte es, die Konstitution des Zuckers (**11**) zu bestimmen.





Zucker (**11**)

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Multiplizität
1	98.2	4.63	d
2	29.2	1.71; 1.90	m, m
3	23.8	1.55; 2.15	m, m
4	81.6	3.03	ddd
5	68.8	3.89	dq
6	17.7	1.27	d
7	56.7	3.52	s

Abbildung 4: 1D-TOCSY-Spektrum und Struktur des Zuckerbausteins (**11**)

Abb. 4 zeigt den ermittelten 2,3,6-Tridesoxyzucker (**11**), der an C-4 ist mit einer Methoxygruppe substituiert ist. Entsprechend der chemischen Konstitution muss es sich bei dem Grundgerüst des Zuckers um Amicetose oder die an C-4 epimere Rhodinose handeln:

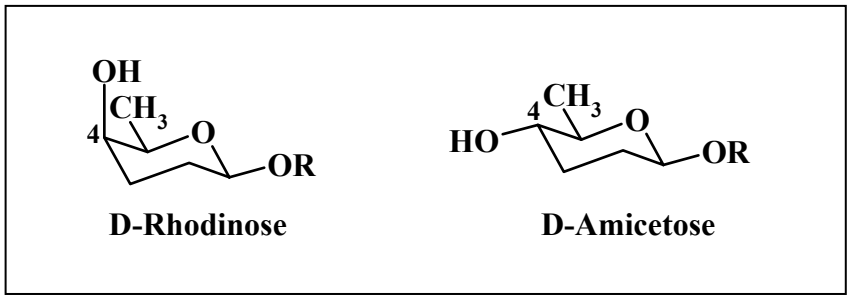


Abbildung 5: Natürlich vorkommende 2,3,6-Tridesoxyzucker

Die Größe der $^3J_{HH}$-Kopplungskonstanten in Cyclohexanen und Zuckern ist aufgrund der starren Sesselform von der Stellung der Protonen zueinander abhängig. Beschrieben wird dieser Zusammenhang der Kopplungskonstanten vom Diederwinkel durch die Karplus-Kurve[38]. Bei Cyclohexanen beträgt der Wert der axial-axialen Kopplungskonstanten $^3J_{aa}$ 10 - 13 Hz, der der axial-äquatorialen und äquatorial-äquatorialen Kopplung $^3J_{ea}$ bzw. $^3J_{ee}$ 2 - 5 Hz. Elektronegative Substituenten können diese Werte geringfügig verringern.

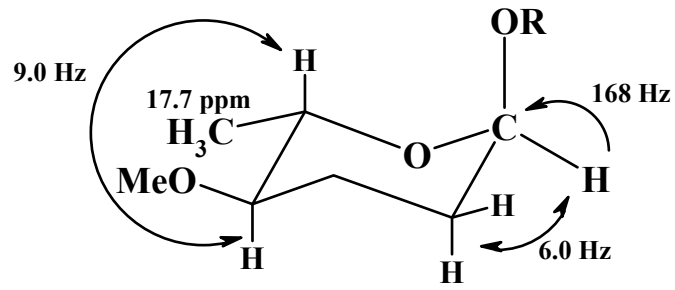
Auch die Methylgruppen in Zuckern weisen charakteristische chemische Verschiebungen auf: äquatoriale Positionen sind gegenüber axialen hochfeldverschoben. Das Kirromycin[39,40] beispielsweise ist an C-4 des Zuckers doppelt methyliert. Die äquatoriale Methylgruppe weist eine chemische Verschiebung von $\delta_C = 15.9$ auf, die axiale hingegen von $\delta_C = 24.5$.

Übertragen auf den vorliegenden Zucker deutet die Verschiebung von $\delta_C = 17.7$ auf eine äquatoriale Methylgruppe hin. Die Größe der Kopplung zwischen 4-H und 5-H beträgt 9.0 Hz, was die diaxiale Stellung dieser Protonen beweist und somit den Zucker als eine Amicetose identifiziert.

Die Zugehörigkeit von Zuckern zur D- oder L-Reihe lässt sich indirekt über die Klyne-Regel bestimmen[41]. Diese empirisch gefundene Regel besagt, dass Desoxyzucker in bakteriellen Naturstoffen entweder der β-D- oder der α-L-Reihe zuzuordnen sind.

Da das anomere Proton im vorliegenden Zucker zum breiten Dublett aufspaltet, wurde die Halbwertsbreite (6.0 Hz) als maximale Kopplungskonstante bestimmt. Eine axial-axiale Kopplung mit > 10 Hz kann demnach ausgeschlossen werden, 1-H muss äquatorial vorliegen. Von den auftretenden zwei $^3J_{HH}$-Kopplungen fällt eine aufgrund eines nahe bei 90° liegenden Diederwinkels sehr klein aus, was die Verbreiterung des Signals erklärt. Mit dem anomeren Proton in äquatorialer Lage ist **12** entsprechend der Klyne-Regel eine 4-*O*-Methyl-α-L-

amicetose. Dieser Befund wird durch die $^1J_{CH}$-Kopplungskonstante an C-1 bestätigt, sie beträgt 168 Hz und liegt damit im Bereich der Kopplungsgrößen von α-Glycosiden ($^1J_{CH}$ = 168 - 171 Hz). β-Glycoside weisen dagegen einen kleineren Wert von $^1J_{CH}$ = 158 - 162 Hz auf[42].

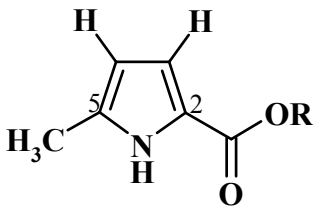


4-*O*-Methyl-α-L-amicetose (**12**)

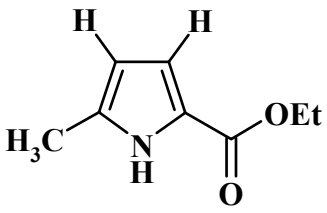
Abbildung 6: Kopplungen, die die α-L-Form von **12** belegen

7.4.3 5-Methyl-pyrrolcarboxy- und Acetoxygruppe

Das im ^{1}H-NMR-Spektrum von Phenalinolacton A als breites Singulett bei δ_H = 9.24 auftretende Signal koppelt im COSY-Spektrum mit zwei weiteren Signalen, deren chemische Verschiebung im Bereich von aromatischen/heteroaromatischen Protonen liegt: δ_H = 5.98 (dd) und 6.84 (dd). Des Weiteren tritt eine Korrelation zu einer an ein aromatisches System gebundenen Methylgruppe bei δ_H = 2.32 auf. 2D-NMR-Korrelationen und eine Analyse der chemischen Verschiebungen im ^{13}C-NMR-Spektrum legten die Vermutung nahe, dass es sich bei vorliegendem Substituenten (**13**) um eine 5-Methyl-pyrrolcarboxygruppe handelt. Dies konnte durch Vergleich der spektralen Daten mit dem entsprechenden Ethylester[43] (**14**) bestätigt werden.



5-Methyl-pyrrolcarboxygruppe (**13**)



5-Methyl-pyrrolcarbonsäure-ethylester (**14**)

	C-1 (ppm)	C-2 (ppm)	C-3 (ppm)	C-4 (ppm)	C-5 (ppm)	C-6 (ppm)
13	160.5	120.7	116.7	109.1	134.4	13.2
14	164	124	118	112	136	15

Abbildung 7: Vergleich der chemischen Verschiebungen. Die Unterschiede sind durch unterschiedliche Referenzierungen bedingt

Als ein weiterer Substituent konnte eine Acetoxygruppe identifiziert werden, mit einer chemischen Verschiebung der Methylprotonen von $\delta_H = 2.06$ ($\delta_C = 21.2$).

7.4.4 Tricyclus des Aglycons

Für das Aglycon bleibt abzüglich der genannten Substituenten ein Strukturelement $C_{23}H_{31}O_5$ mit sieben Doppelbindungsäquivalenten. In der Struktur müssen drei C-Methylgruppen, zwei Doppelbindungen und eine Estergruppe vorhanden sein. Entsprechend weist das Aglycon vier Ringe auf.

Durch selektive Einstrahlungen auf separiert stehende Protonen bei $\delta_H = 5.04$ und $\delta_H = 5.57$ konnten über eindimensionale TOCSY-Spektren zwei getrennte Spinsysteme (I und II) erkannt werden. Die Aufklärung der Konstitution innerhalb dieser Systeme gelang mit Hilfe zweidimensionaler NMR-Spektren. Des Weiteren lassen sich neben zwei aneinander gebundenen Methylengruppen (Spinsystem III) zwei isoliert stehende Methylengruppen erkennen, die aufgrund ihrer chemischen Verschiebung von $\delta_C = 62.4$ bzw. 68.2 jeweils an Sauerstoff gebunden sein müssen. Abb. 8 zeigt die genannten Strukturelemente sowie einige wichtige COSY-Kopplungen:

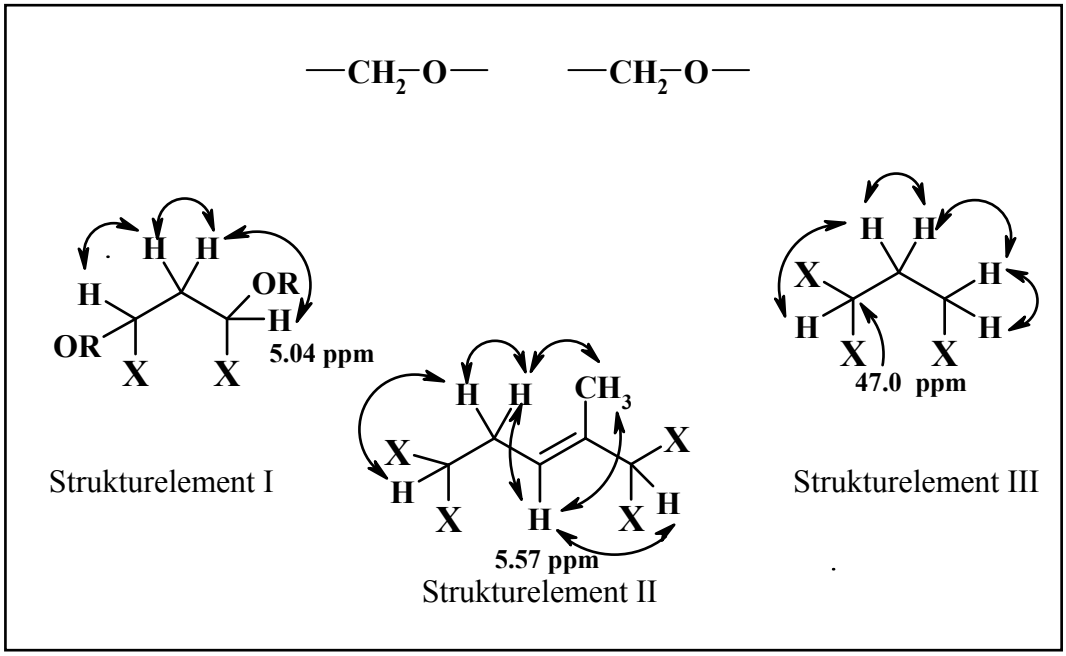
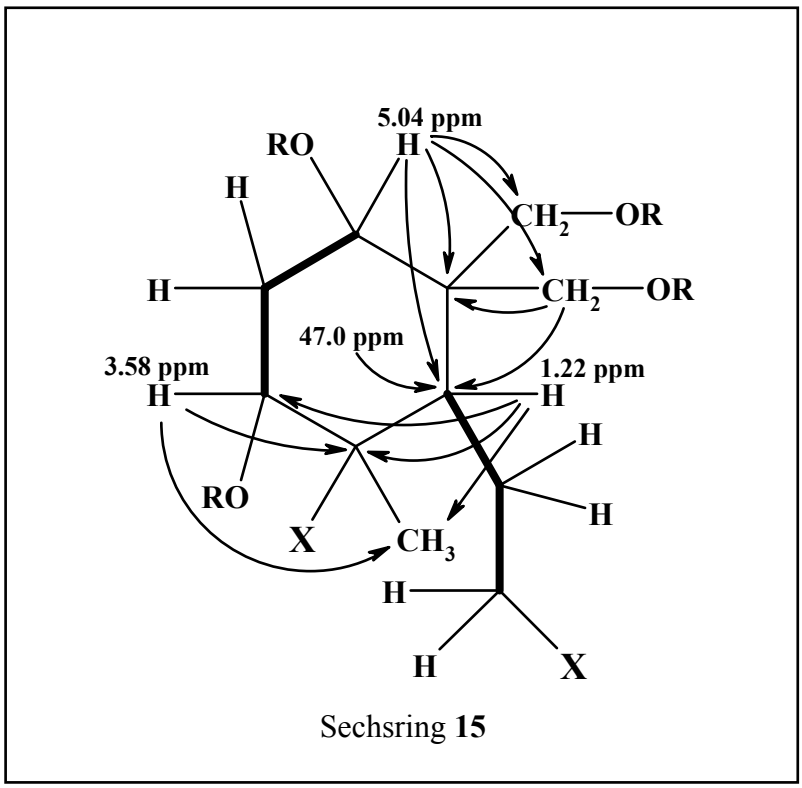


Abbildung 8: Strukturelemente des Aglycons. Die mit **X** markierten Positionen zeigen offene Bindungsstellen an

Ausgehend vom Proton bei $\delta_H = 5.04$ im Strukturelement I können im HMBC-Spektrum $^2J_{CH}$- bzw. $^3J_{CH}$-Kopplungen zu verschiedenen Kohlenstoffatomen, unter anderem bei $\delta_C = 44.9$, 68.2, 62.4 sowie 47.0 ausgemacht werden. Das am C-Atom mit der Verschiebung von 47.0 gebundene H-Atom aus dem Element III zeigt weitere $^2J_{CH}$- bzw. $^3J_{CH}$-Kopplungen, die den Zusammenschluss von Strukturelement I und III über zwei quartäre Kohlenstoffatome beweisen. In Abb. 9 ist der entsprechende Sechsring (**15**) mit den isoliert stehenden Methylengruppen und einer weiteren Methylgruppe dargestellt. Im linken Teil des Sechsringes ist Strukturteil I zu finden, Strukturelement III im rechten unteren Teil.



Sechsring **15**

Abbildung 9: Wichtige $^{2}J_{CH}$- bzw. $^{3}J_{CH}$-Kopplungen, anhand derer Sechsring **15** aufgeklärt wurde. **X** = offene Bindungsstellen

Die Verknüpfungen von **15** mit Strukturelement II, einem quartären C-Atom sowie einer im ^{1}H-NMR-Spektrum als Singulett auftretenden Methylgruppe konnten durch weitere, dem HMBC-Spektrum entnommene Korrelationen aufgeklärt werden (Abb. 10). Der interpretierte Teil des Aglycons weist eine tricyclische Struktur auf (**16**), an der über vier Sauerstoffatome unter anderem die oben beschriebenen Substituenten gebunden sind. Auffällig ist die Ähnlichkeit mit tricyclischen Diterpenen. Abb. 10 zeigt ein Beispiel auf.

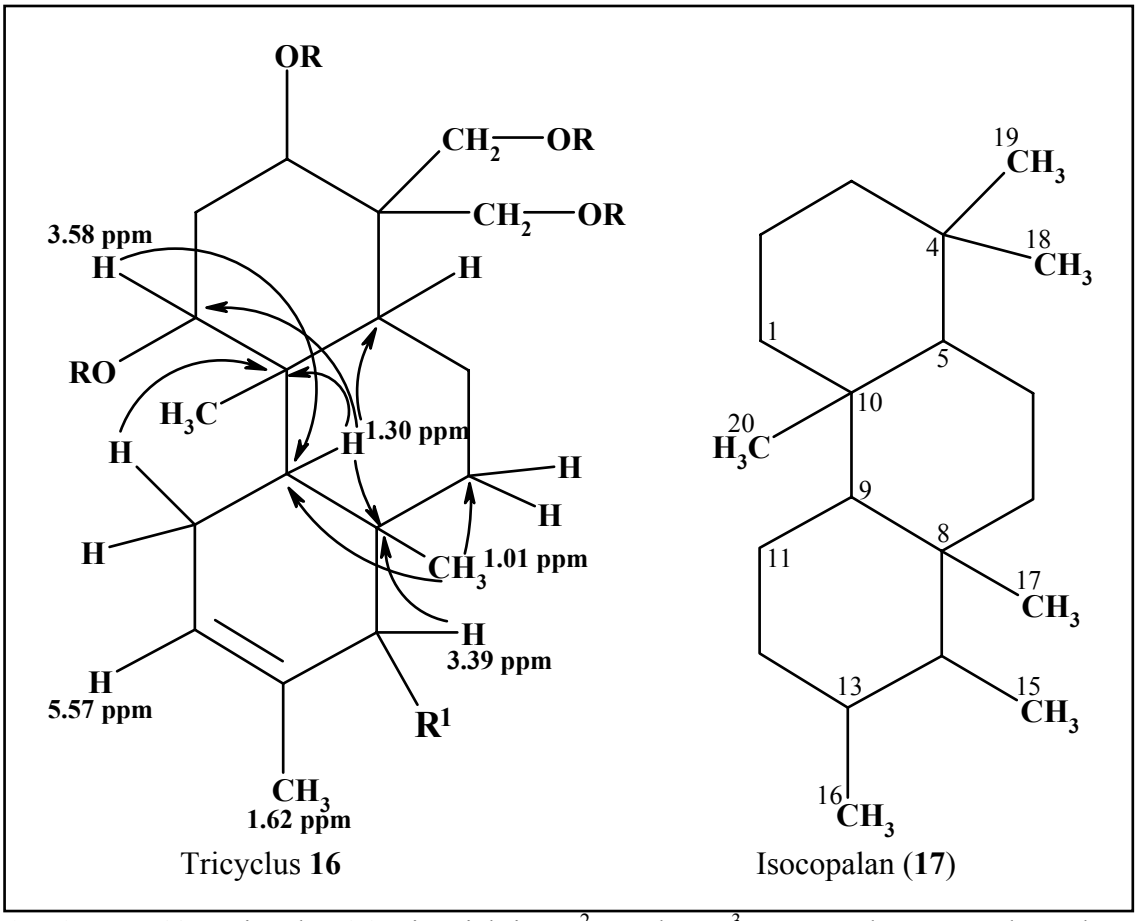


Abbildung 10: Tricyclus **16** mit wichtigen $^{2}J_{CH}$- bzw. $^{3}J_{CH}$-Kopplungen und Struktur des Diterpens Isocopalan (**17**)

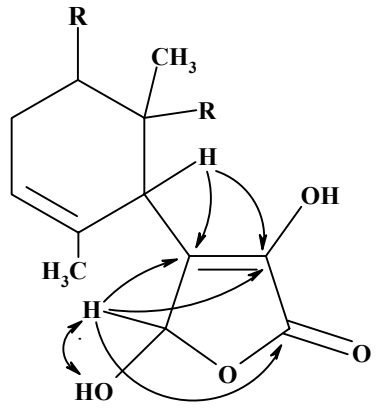
Der Vergleich mit dem Diterpen Isocopalan[44] (**17**) oder, nach den IUPAC-Regeln benannt, Tetradecahydro-1,1,4a,7,8,8a-hexamethyl-phenanthren, verdeutlicht die große Ähnlichkeit.

7.4.5 Lactonbaustein des Aglycons

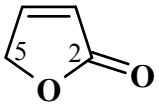
Für den Rest $\mathbf{R^1}$ am Tricyclus (**16**) bleibt die Summenformel $C_4H_3O_4$ mit drei Doppelbindungsäquivalenten übrig, von denen eins auf das Lacton ($\delta_C = 169.2$) und eins auf eine Doppelbindung entfällt. Demzufolge muß $\mathbf{R^1}$ einen weiteren Ring beinhalten. Aufgrund der chemischen Verschiebung der Carboxylgruppe ($\delta_C = 169.2$) kann von einem α,β-ungesättigten Lacton ausgegangen werden. Diese Vermutung wird durch eine für 2(5H)-Furanone charakteristische CO-Streckschwingungsbande im IR-Spektrum bei 1757.6 cm^{-1} bestätigt. Auffällig ist aber, dass die Doppelbindung mit ^{13}C-Verschiebungen von $\delta_C = 130.0$ bzw. 139.2 wenig polarisiert ist. Im 2(5H)-Furanon betragen die entsprechenden Werte 121.5

bzw. 153.5 ppm. Entsprechende Substituenten müssen diese Unterschiede ausgleichen, beide olefinischen C-Atome sind laut APT-Spektrum quartär.

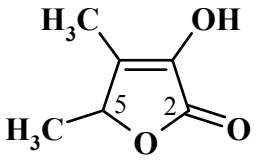
Die Methingruppe im C_4-Rest ist an zwei Sauerstoffatome gebunden, erkennbar an der hohen chemischen Verschiebung von $\delta_C = 98.4$. Abb. 11 zeigt die ermittelte Struktur des Lactongerüsts **18**. Ebenfalls abgebildet sind ein unsubstituiertes (**19**) sowie ein vergleichbar substituiertes (**20**) Furanongerüst[45]:



Lactonbaustein des Aglycons (**18**)



2(5H)-Furanon (**19**)



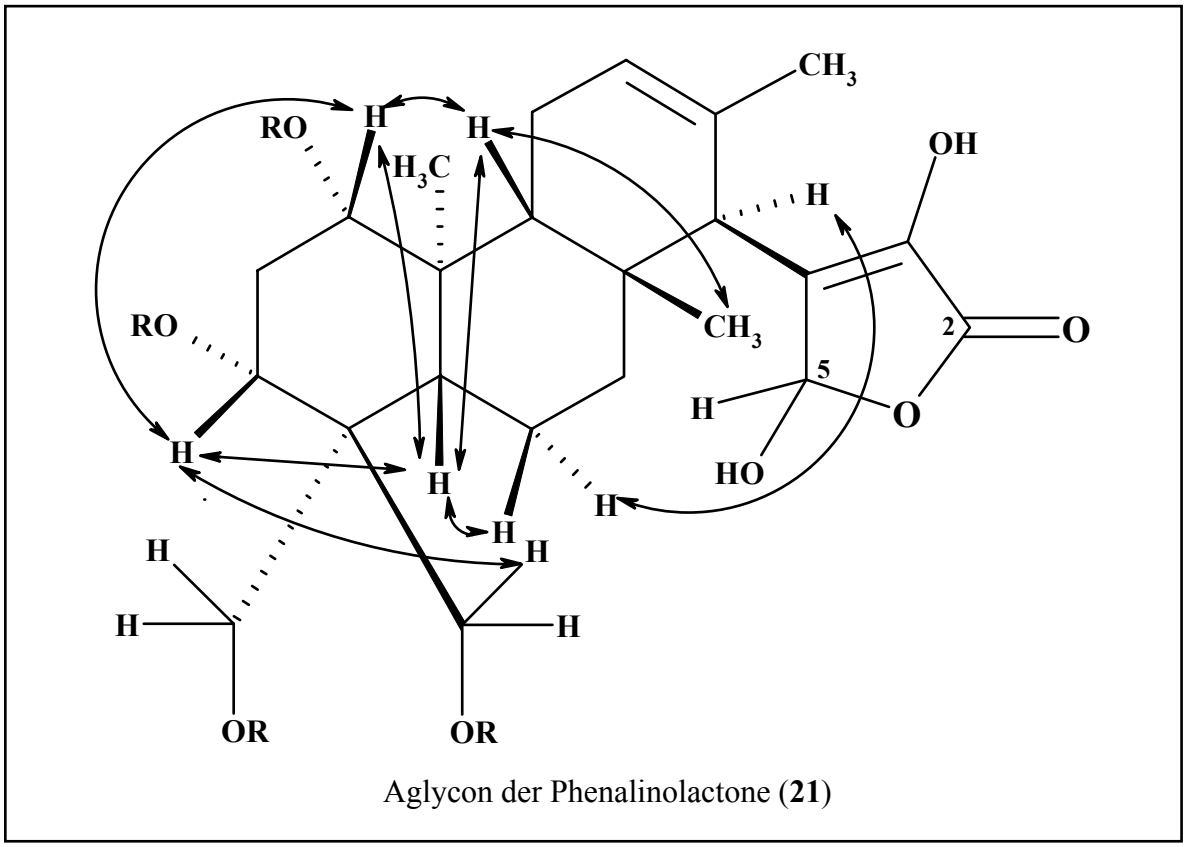
4,5-Dimethyl-3-hydroxy-2,5-dihydrofuran 2-on (**20**)[45]

	C-2 (ppm)	**C-3 (ppm)**	**C-4 (ppm)**	**C-5 (ppm)**
Phenalinolacton A (**5**)	169.2	139.2	130.0	98.4
2(5H)-Furanon (**19**)	174.0	153.5	121.5	72.0
20	171.0	137.5	133.5	79

Abbildung 11: Struktur des Lactonbausteins (**18**)

7.4.6 Relative Stereochemie der Phenalinolactone

Die relative Konfiguration des Aglycons (**21**) konnte durch Korrelationen in NOESY-Spektren bewiesen werden (Abb. 12). Durch NOE-Effekte kann sich die Magnetisierung eines Protons auf andere, räumlich nahe stehende Protonen übertragen. Diese Übertragung erfolgt nicht über Bindungen, sondern durch den Raum mit einer maximalen Entfernung von etwa 6 Å zwischen den ^{1}H-Atomen. Die relative Stereochemie von C-5 des Lactonrings lässt sich durch NOESY-Spektren nicht klären, da die entsprechenden Korrelationen aufgrund der freien Drehbarkeit des Substituenten nicht aussagekräftig sind.



Aglycon der Phenalinolactone (**21**)

Abbildung 12: NOE-Korrelationen, die die relative Konfiguration des Aglycons belegen

Abb. 13 zeigt einen Ausschnitt aus dem zweidimensionalen NOESY-Spektrum mit einigen wichtigen Korrelationen.

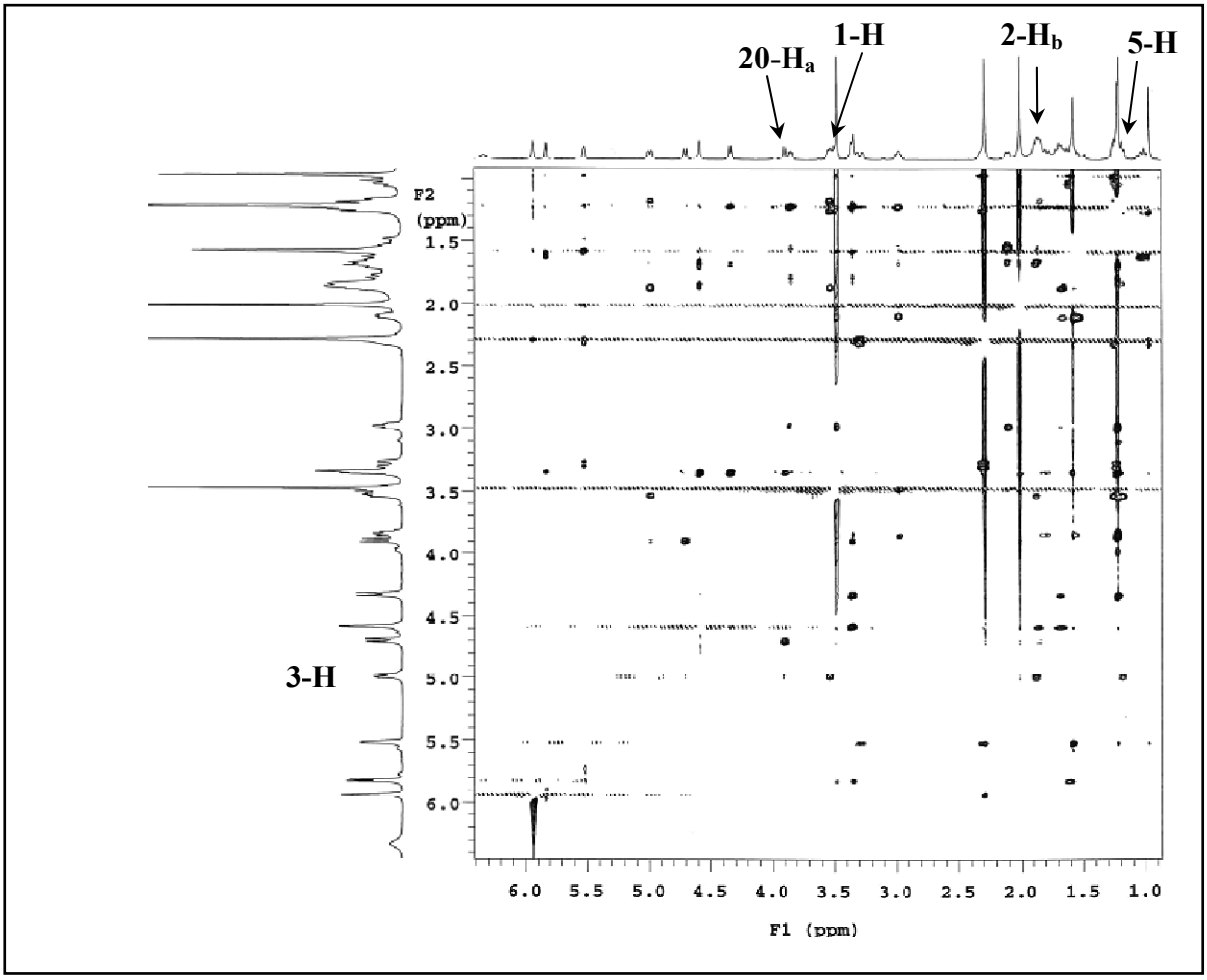


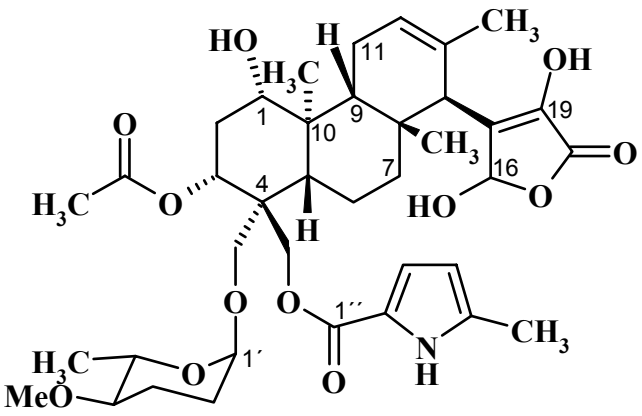
Abbildung 13: Ausschnitt aus dem zweidimensionalen NOESY-Spektrum von **5**

Zur Absicherung der Lacton-Struktur sowie der relativen Stereochemie wurden verschiedene Versuche zur Kristallisation der Phenalinolactone unternommen. Jedoch konnten aus unterschiedlichen Lösungsmitteln bzw. Lösungmittelgemischen keine für die Röntgenstrukturanalyse tauglichen Kristalle erhalten werden. Auch der Versuch der Veresterung mit o-Brombenzoesäure zur Verbesserung der Kristallisationseigenschaften schlug fehl.

7.4.7 Phenalinolacton A (5)

Die Positionen der zuvor beschriebenen Substituenten am Aglycon lassen sich über entsprechende Korrelationen im HMBC-Spektrum bestimmen. So zeigen die Methylenprotonen an C-20 $^3J_{CH}$-Korrelationen zu C-1′ des Pyrrolcarboxybausteins (δ_C = 160.5) und die Protonen an C-21 $^3J_{CH}$-Korrelationen zu C-1′ des Zuckers (δ_C = 98.2). Die Position der Acetoxygruppe kann über $^4J_{CH}$-Korrelationen der Methylgruppe zu C-3 und $^3J_{CH}$-Korrelationen von 3-H auf das Esterkohlenstoffatom (δ_C = 170.3) nachgewiesen werden.

Es ergibt sich für Phenalinolacton A folgende Gesamtstruktur. Die Konfiguration ist jedoch nur relativ, auch ent-**5** ist denkbar.



5

Im Phenalinolacton A sind verschiedene Strukturelemente in einzigartiger Weise miteinander verknüpft. Auffällig ist das hoch oxidierte γ-Lacton des Aglycons, zu dem es in der Literatur derzeit keine Entsprechung gibt.

Eine ähnliche Kombination aus Terpengerüst und ungesättigtem Lacton besitzen auch die Strukturen der Lintenolide[46] (**22**) oder Petrosaspongiolide[47] (**23,** Abb. 14). Beide Metaboliten sind Sesterterpene und wurden aus verschiedenen marinen Schwämmen isoliert.

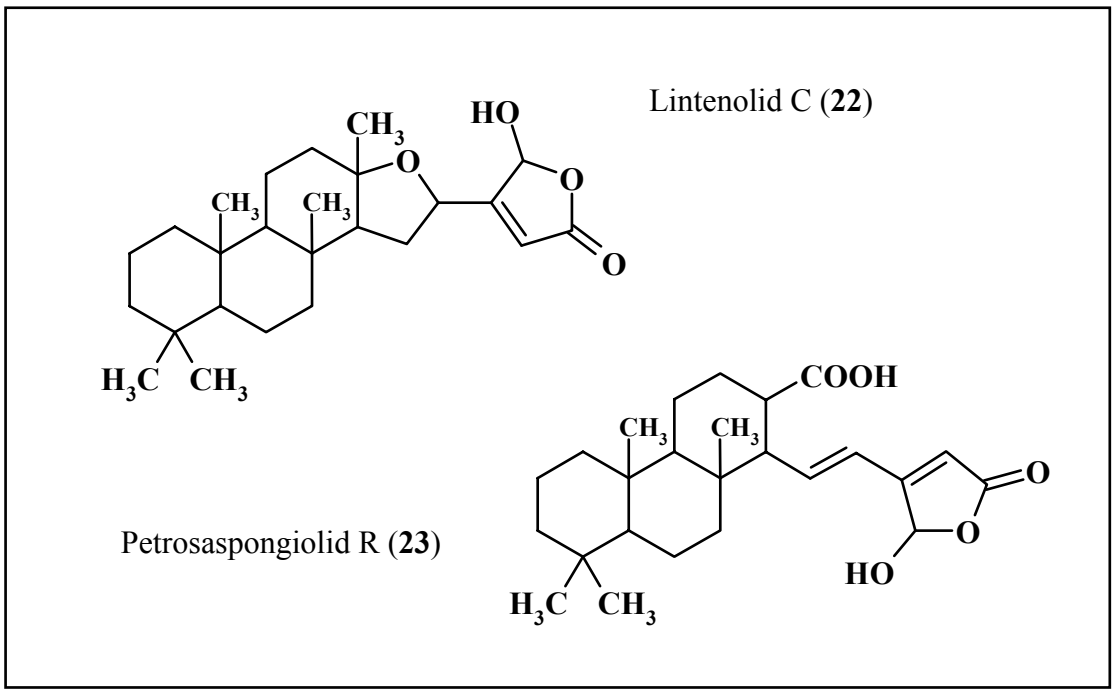


Abbildung 14: Sesterterpene mit einem *α,β*-ungesättigten Lacton

Die Suche* nach einem angularen tricyclischen System in Verbindung mit einer Pyrrolcarbonsäure blieb ebenso erfolglos wie die Kombination jeweils eines der beiden Strukturelemente mit einer Amicetose. Dies ist ein weiterer Beweis für die Einmaligkeit der Struktur.
Die Bezeichnung „Phenalinolactone“ für die Metaboliten der Substanzgruppe IV soll zum einen auf die strukturelle Ähnlichkeit zum reduzierten Phenanthren hinweisen, und zum anderen auf das Lactongerüst aufmerksam machen.

7.4.8 Phenalinolactone B bis D

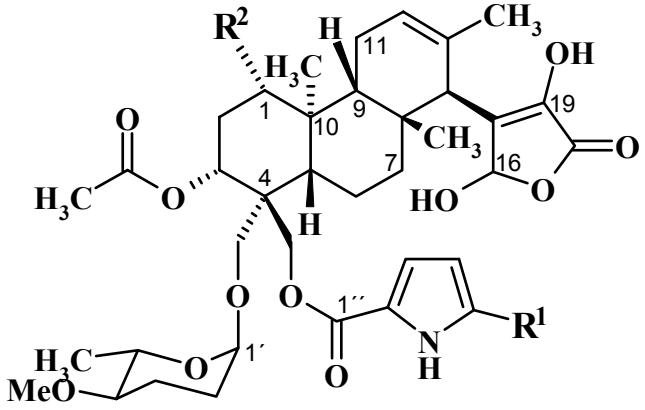
Die Differenz der Molmassen von Phenalinolacton A (715) zur Komponente B (701) beträgt 14 g/mol, ein Wert, der typischerweise für den Austausch einer Methylgruppe gegen ein Proton spricht. Dieser Verdacht bestätigt sich durch das Fehlen des Methylgruppensignals bei $\delta_H = 2.32$ im ^{1}H-NMR-Spektrum. Stattdessen tritt ein zusätzliches aromatisches Protonensignal bei $\delta_H = 6.96$ ppm auf, das zum ddd aufgespalten ist. Zusätzlich verkompliziert sich das Aufspaltungsmuster der beiden aromatischen Protonen der Pyrrolcarbonsäure ($\delta_H = 6.90$, ddd und $\delta_H = 6.24$, ddd). Anhand der Massen- und eindimensionalen NMR-Spektren ließ sich Phenalinolacton B (**24**) als ein an der Pyrrolcarbonsäure demethyliertes Derivat des Phenalinolacton A identifizieren.

Die dritte Komponente aus der Substanzreihe zeigt mit einer Molmasse von 745 g/mol einen Unterschied von 30 g/mol zur Hauptkomponente, möglicherweise ein Hinweis auf ein zusätzliches CH_2O-Fragment. Erneut fehlt im NMR-Spektrum das Signal der am Heteroaromaten gebundenen Methylgruppe. Stattdessen fallen eine Sauerstoff-substituierte Methylengruppe ($\delta_H = 3.35$, $\delta_C = 67.0$) und eine Methoxygruppe ($\delta_H = 3.52$, $\delta_C = 58.1$) auf. Durch zweidimensionale Spektren kann die Komponente C (**25**) als ein Methoxyl-Derivat der Komponente A abgesichert werden.

Die Molmasse des Phenalinolacton D (**26**) deutet mit 699 g/mol darauf hin, dass im Vergleich zur Struktur der Komponente A ein Sauerstoffatom weniger eingebaut ist. Tatsächlich fehlt im ^{1}H-NMR-Spektrum das Signal für 1-H bei $\delta_H = 3.58$. Die erheblich geringere Polarität der Komponente in DC und HPLC lässt sich durch das Fehlen einer Hydroxylgruppe erklären. Über zweidimensionale Spektren kann die Änderung der Methingruppe in eine

* Struktursuche in den Datenbanken Scifinder, Antibase und Chapman & Hall, Stand der Suche: 22.11.2003.

Methylengruppe bestätigt werden. Phenalinolacton D ist ein 1-Desoxy-Derivat des Phenalinolactons A.



Phenalinolacton	R^1	R^2
A (**6**)	CH_3	OH
B (**24**)	H	OH
C (**25**)	CH_2OCH_3	OH
D (**26**)	CH_3	H

Abbildung 15: Struktureller Vergleich der Phenalinolactone A - D

7.5 Strukturvergleich mit Brasilicardin A (27)

Die Datenbankrecherche nach strukturell ähnlichen Substanzen führte zu einem möglicherweise biosynthetisch verwandten Metaboliten, dem Brasilicardin A (**27**)[48,49,50]. Dieser immunosuppressiv und cytotoxisch wirksame Sekundärstoff wird vom pathogenen Actinomyceten *Nocardia brasiliensis* IFM 0406 produziert und besteht ebenfalls aus einem tricyclischen terpenoiden Grundgerüst. Zusätzlich zu zwei Zuckern und einer 3-Hydroxy-benzoyl-Einheit ist eine Aminosäure-Seitenkette an den Tricyclus gebunden.

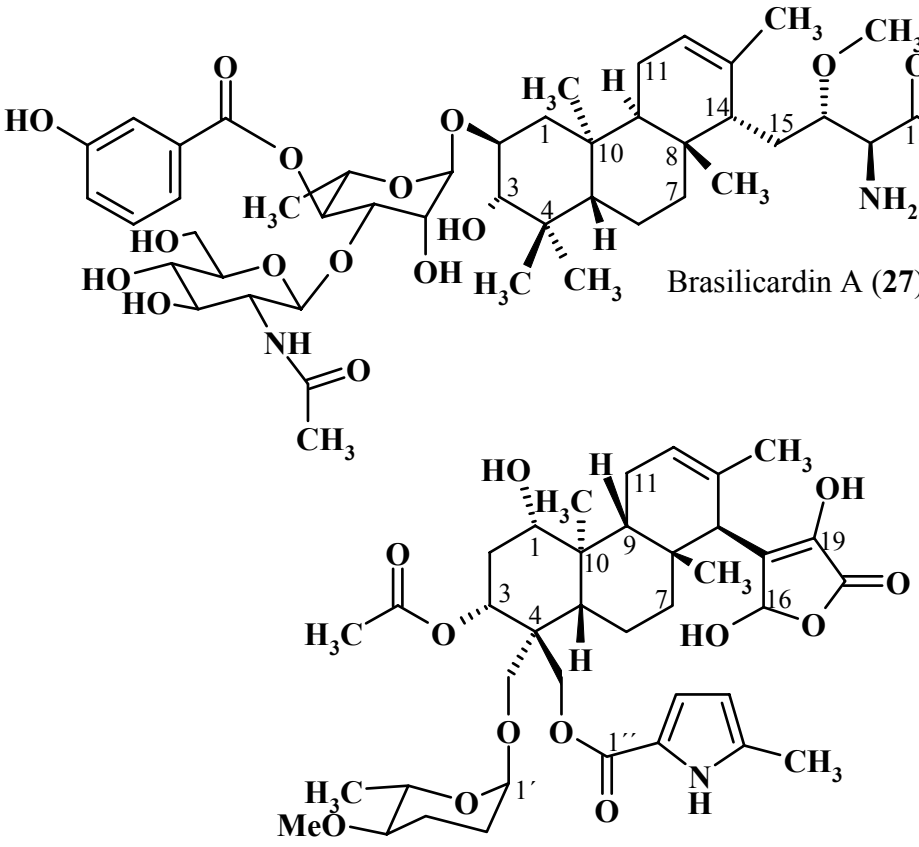


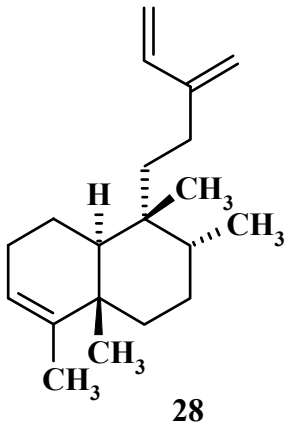
Abbildung 16: Strukturvergleich von **5** mit Brasilicardin A (**27**)

7.6 Überlegungen zur Biosynthese der Phenalinolactone

In den Phenalinolactonen sind Strukturelemente aus verschiedenen Biosynthese-Pools vereint. Die Pyrrolcarbonsäure beispielsweise stammt aus Prolin, also aus dem Aminosäure-Pool. Eine entsprechende Umwandlung der Aminosäure durch Dehydrierung und Methylierung wurde bei der Biosynthese des Clorobiocins beschrieben[51].

Amicetose wird als Desoxyzucker aus Glucose synthetisiert[52]. Die Deoxygenierungs-mechanismen zur L-Rhodinose, dem epimeren Zucker der Amicetose, wurden am Beispiel des Landomycins untersucht. Demnach findet zunächst an der Position C-6 eine Desoxygenierung statt, bevor C-2 und schließlich C-3 reduziert werden[53].

Der tricyclische Teil des Aglycons legt eine terpenoide Struktur nahe. Derzeit ist jedoch nur eine sehr geringe Anzahl an terpenoiden Sekundärmetaboliten bekannt, die von Streptomyceten produziert werden. Ein Beispiel für ein solches Diterpen ist das von *Streptomyces griseolosporeus* produzierte Terpentetrien (**28**)[54]:



28

Strukturrecherchen ergaben keine weiteren, aus Actinomyceten isolierten terpenoiden Verbindungen mit einem tricyclischen Gerüst ähnlich dem der Phenalinolactone oder des Brasilicardins.

Interessanterweise verwenden bestimmte Actinomyceten zur Synthese der universell genutzten Terpen-Bausteine IPP und DMAPP zwei unterschiedliche Wege[55]. Dies konnte durch Fütterungsexperimente am Stamm *Streptomyces aeriouvifer* erstmalig gezeigt werden[56,57]. Durch Fütterung von markiertem Acetat (ab der 24. Stunde der Kultivierung) bzw. markierter Glucose (ab der 16. Stunde) in separaten Kulturen konnte die Markierungsanreicherung in zwei verschiedenen Metaboliten nachgewiesen werden. Menaquinon ließ sich durch Fütterung mit Glucose entsprechend dem Einbaumuster des Nicht-Mevalonat oder auch Triose-Pyruvat-Weges anreichern, Naphterpin hingegen durch Acetatfütterung entsprechend dem klassischen Mevalonatweg. Inzwischen ist bekannt, dass Actinomyceten zur Synthese von Primärmetaboliten den Nicht-Mevalonat-Weg[58,59] verwenden[55], aber nur einige zur Biosynthese von Sekundärstoffen zusätzlich auf den Mevalonat-Weg zurückgreifen können.

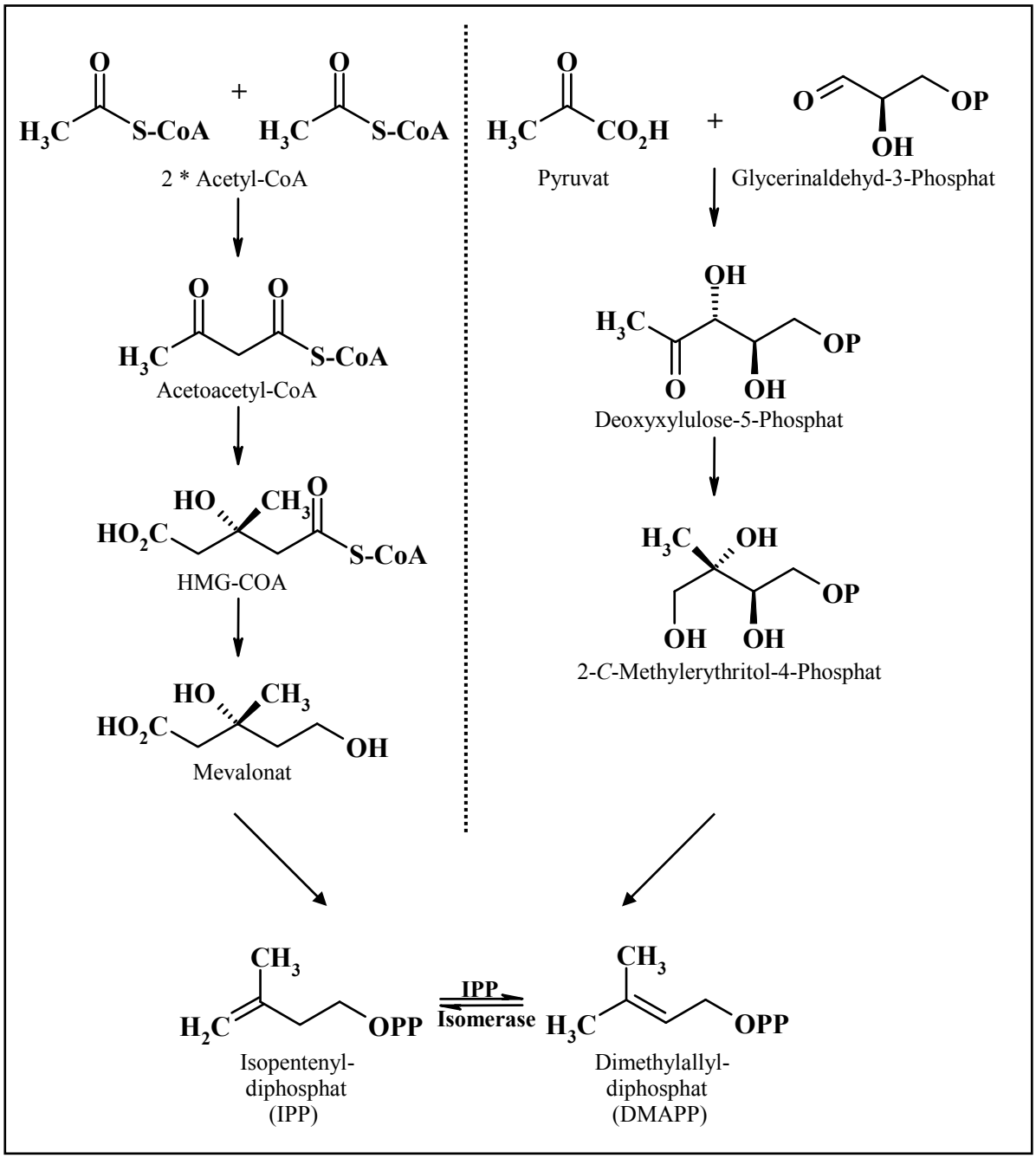


Abbildung 17: Vereinfachte Darstellungen des klassischen Acetat-Mevalonat-Weges (links) und des Nicht-Mevalonat-Weges (rechts) zu IPP und DMAPP[60]

Terpene werden in der Natur durch fortschreitende Kopf-Schwanz-Verknüpfung von IPP an sein Isomer DMAPP bzw. an zuvor synthetisierte oligomere Systeme aufgebaut. Das im Falle von Diterpenen zunächst entstandene Geranylgeranyldiphosphat (GGPP) kann von verschiedenen Terpenoid-Synthasen (Cyclasen) über unterschiedliche Mechanismen zu drei Strukturklassen cyclisiert werden: bicyclische, polycyclische oder macrocyclische Diterpene[60]. Die Mechanismen können entweder durch eine Protonierung (an der Doppelbindung C-14/C-15 oder einem Epoxid an dieser Stelle) initiiert werden oder durch

eine Spaltung des Diphosphatesters. Kaskadenartig erfolgen die Ringschlüsse durch interne Deprotonierungen und Reprotonierungen, Hydridverschiebungen und Umlagerungen. Abb. 18 zeigt zwei verschiedene Mechanismen bei der Diterpen-Cyclisierung. Während die Cyclisierung und anschließende Gerüstumlagerung[61] vom 3-Geranylgeranylindol zum Radaricin C (**29**) hypothetisch ist[62], ist das Enzym Taxadien-Synthase gut untersucht[63]. Letzteres synthetisiert die Cyclisierung des GGPP zum Taxa-4,11-dien (**30**), dem terpenoiden Grundgerüst des Taxols.

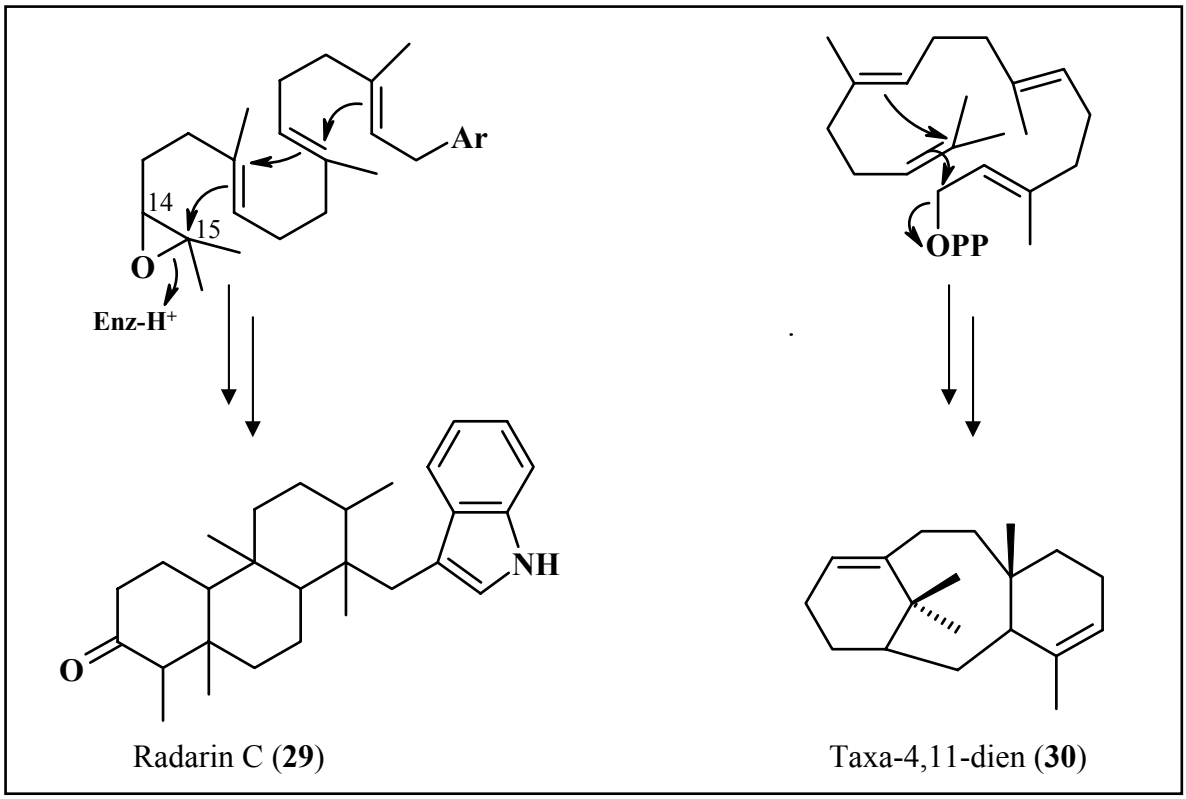


Abbildung 18: Beispiele für zwei verschiedene Cyclisierungsmechanismen

Experimentell lassen sich die beiden möglichen Wege zum IPP durch den Einbau von Vorläufermolekülen unterscheiden. Fütterung von [2-^{13}C]Acetat beispielsweise führt über den Mevalonat-Weg zur in Abb. 19 links dargestellten ^{13}C-Markierung in IPP und DMAPP. Der Nicht-Mevalonat-Weg kann durch Fütterung von markierter Glucose oder markiertem Glycerin mit dem in Abb. 19 auf der rechten Seite gezeigten Einbaumuster bewiesen werden.

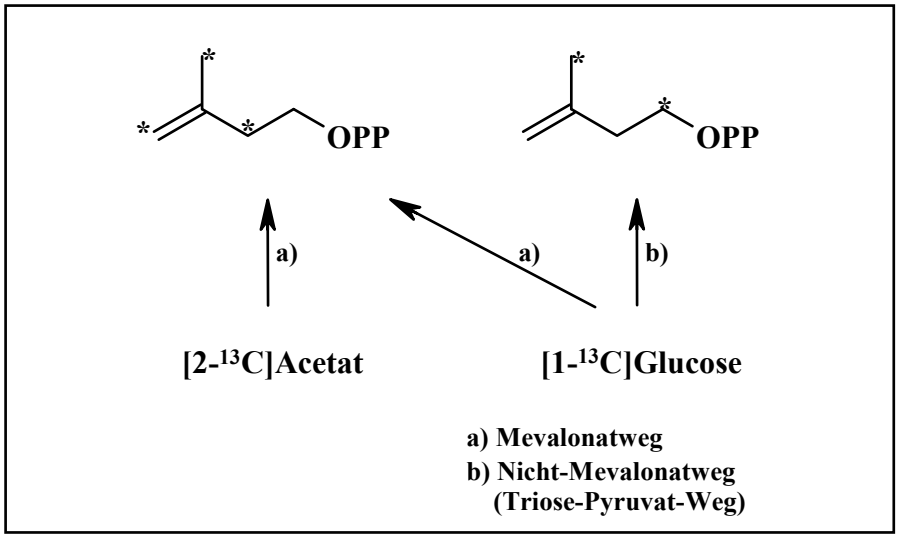


Abbildung 19: experiementelle Unterscheidung der beiden Wege zu IPP

Im Falle des Brasilicardin A (**27**) konnte durch Fütterung von [1-^{13}C]Glucose eine ^{13}C-Anreicherung erhalten werden, die die Biosynthese über den Triose-Pyruvat-Weg belegt (Abb. 20).

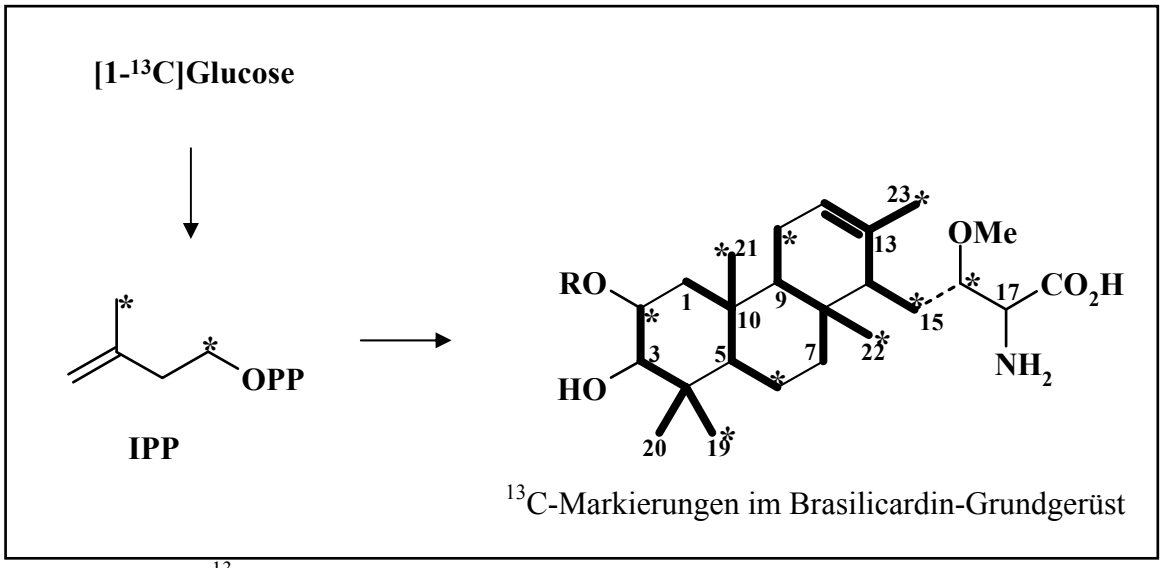


Abbildung 20: ^{13}C-Einbaumuster im Brasilicardin A (**27**)

Zur Cyclisierung während der Biosynthese des Brasilicardins ist kein Mechanismus diskutiert worden. Wahrscheinlich ist aber, dass er sehr ähnlich dem der Phenalinolactone sein wird. Die zusätzliche ^{13}C-Anreicherung von C-16 in **27** erlaubt die Annahme, dass die Aminsoäure-Seitenkette, möglicherweise methyliertes Serin, durch Glycolyse markierter Glucose aus dem entstandenen [3-^{13}C]Glycerat-3-phosphat gebildet wird[48].

Übertragen auf die Biosynthese der Phenalinolactone sollte das tricyclische Grundgerüst in analoger Weise aus Geranylgeranyldiphosphat hervorgehen.

Wahrscheinlich erscheint ein Cyclisierungsmechanismus, der durch eine Protonierung der Doppelbindung an C-14/C-15 bzw. des entsprechenden Epoxids eingeleitet wird. In Analogie zur Biosynthese des Radarin C (**29**) entsteht dadurch ein Tricyclus, der in seiner aktivierten Form als Diphosphatester (**31**) vorliegt. Abspaltung des Diphosphats führt zu einem Carbokation, das nucleophil angegriffen werden kann, zum Beispiel von Pyruvat in der Enolform. Durch das Verknüpfen mit dem C_3-Körper Pyruvat entsteht eine viergliedrige Seitenkette am Tricyclus (**32)**, die zur Bildung des Lactons, wie es in den Phenalinolactonen vorliegt, allerdings umgelagert werden muss.

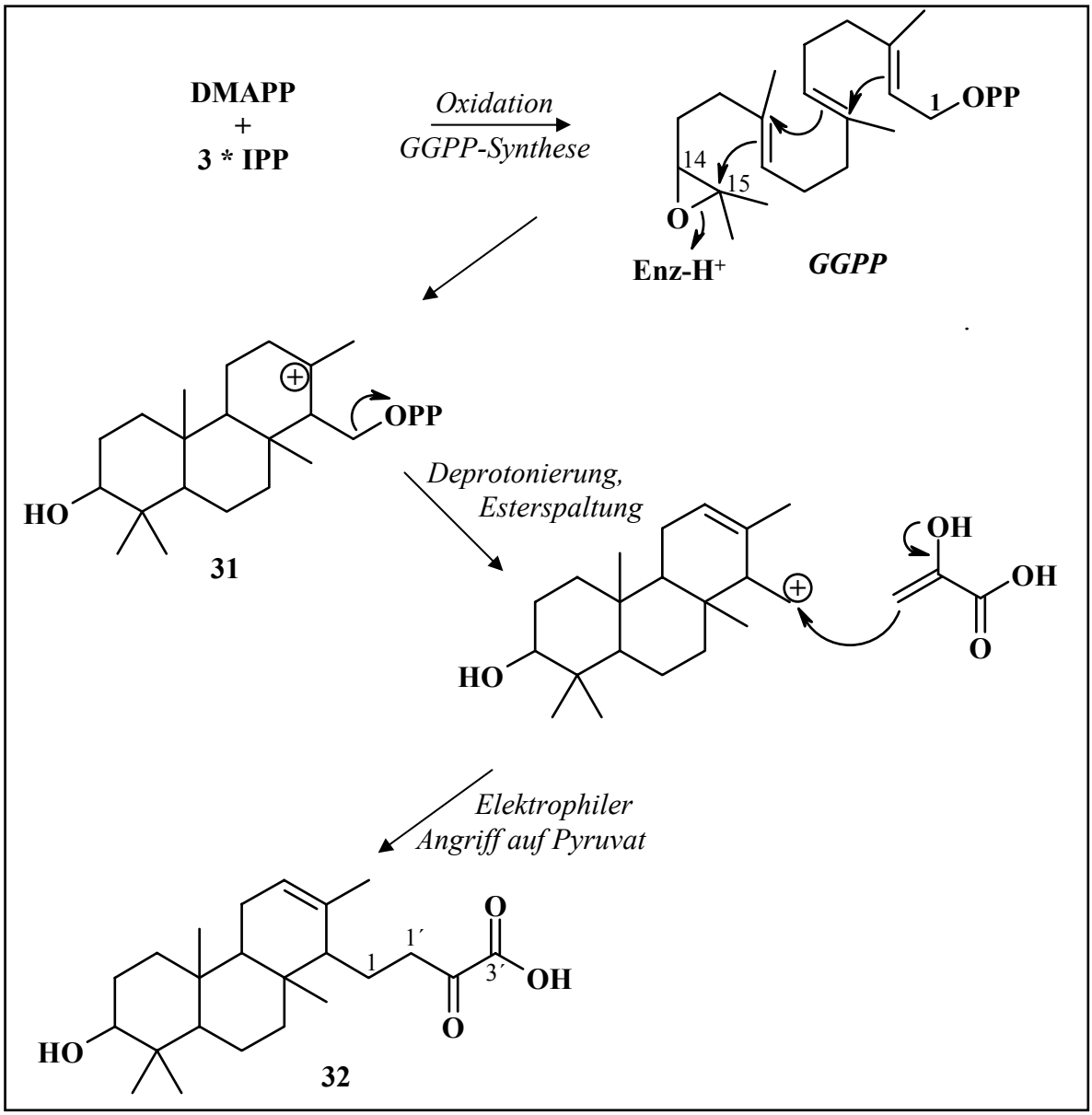


Abbildung 21: möglicher Biosyntheseweg zum tricyclischen Grundgerüst **32**

Denkbar wäre, dass diese Umlagerung über ein Cyclobutatrion verläuft, das oxidativ zum Aldehyd und einer Carbonsäure geöffnet wird. Um den Butylring aufbauen zu können müsste jedoch zunächst eine Oxidation von C-1´ erfolgen, um C-1 in eine potentiell nucleophile Position zu überführen:

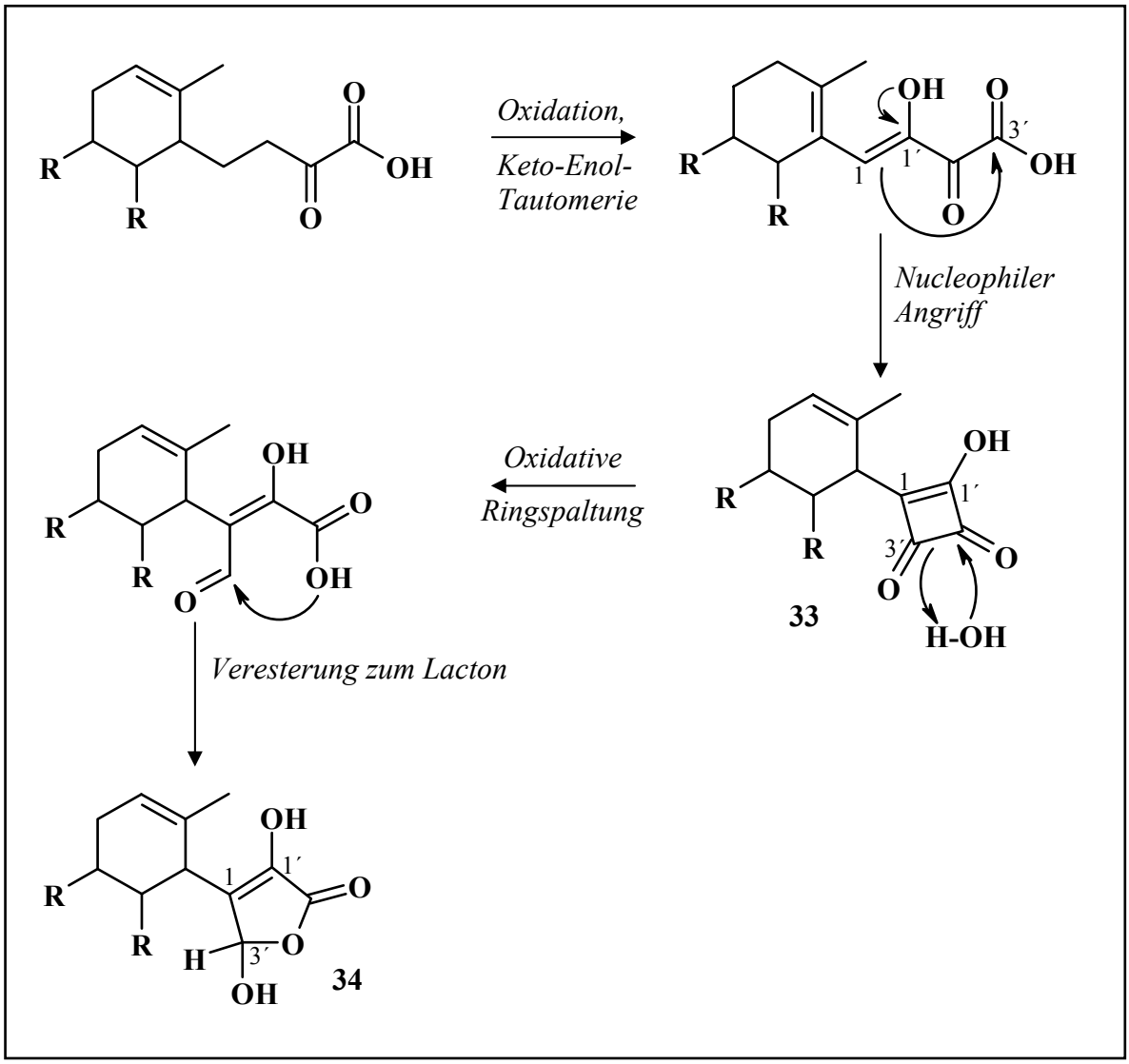


Abbildung 22: Hypothetischer Biosyntheseweg für den Lactonteil der Phenalinolactone

Nach der Oxidation kann C-1 aus der Enolform heraus nucleophil auf das Carbonyl C-3´ angreifen, was zum beschriebenen Cyclobutatrion (**33**) führt. Dieses kann enolisiert stabil vorliegen, wie u.a. das Beispiel eines Moenomycinderivats mit gebundenem 3-Cyclobuten-1,2-dion-Substituenten zeigt[64].

Die oxidative Spaltung zu Aldehyd- und Carboxylgruppe schafft schließlich die Voraussetzungen zur Bildung des Lactonringes (**34**) der Phenalinolactone durch einen nucleophilen Angriff.

Trotz des so nicht belegbaren Mechanismus über das Cyclobutatrion-Zwischenprodukt (**33**) wird davon ausgegangen, dass für die Bildung der Seitenkette wie beim Brasilicardin A (**27**) Pyruvat verwendet wird. Alternativ wäre denkbar, dass biosynthetisch zunächst ein Sesterterpen produziert wird. Dieses müsste jedoch hoch funktionalisiert werden und durch Abspaltung zwei Kohlenstoffatome verlieren. Dieser Mechanismus erscheint somit unwahrscheinlich. Unter Umständen könnte der tatsächliche Biosyntheseweg durch eine erfolgreiche Fütterung von markiertem Acetat bzw. markierter Glucose aufgeklärt werden. ^{13}C-Anreicherungen im Lactonring sollten Aufschluss über den Cyclisierungsmechanismus geben.

Abb. 23 zeigt die postulierten Biosyntheseschritte vom Aglycon zu den Phenalinolactonen.

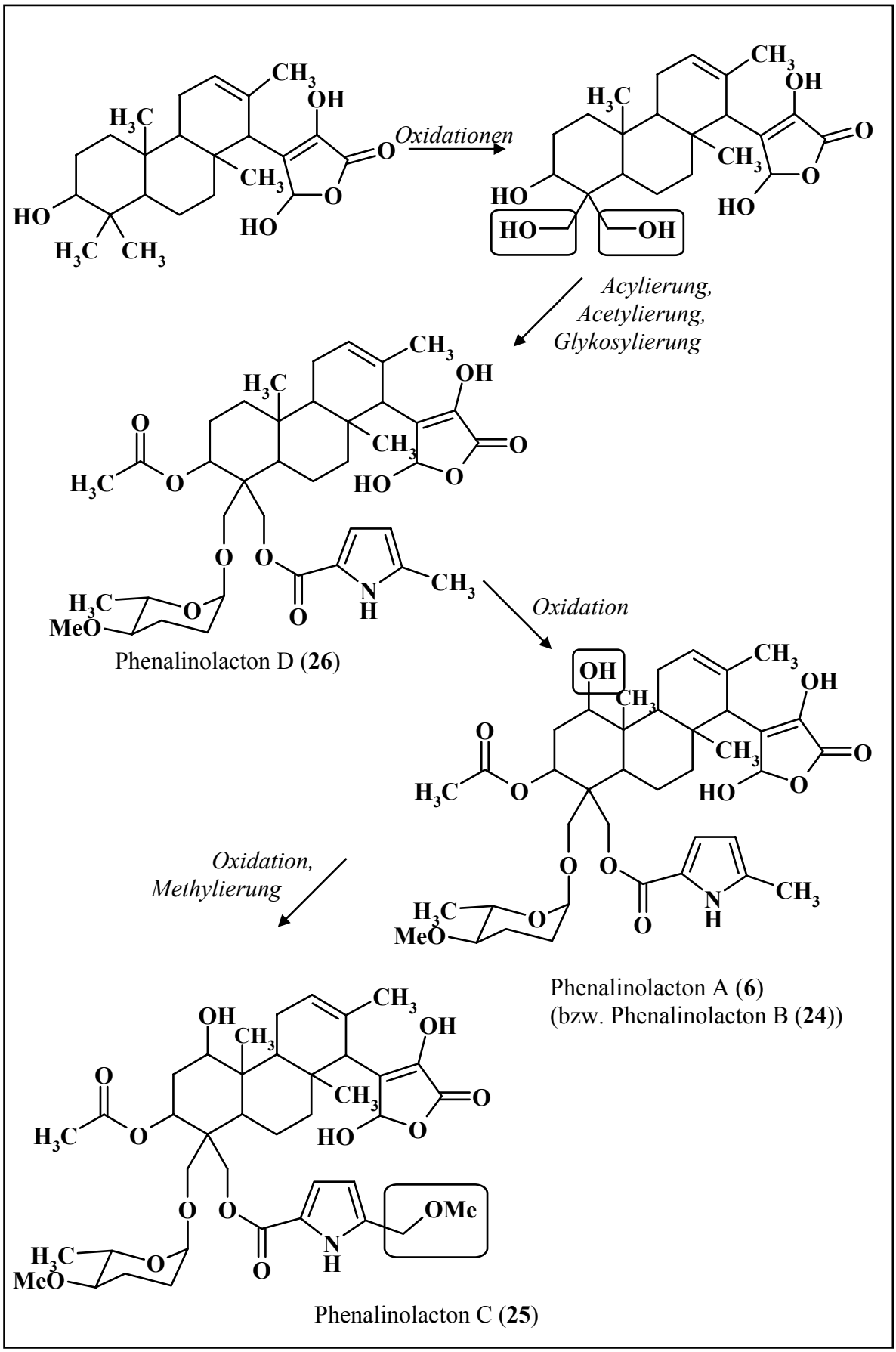


Abbildung 23: Späte Schritte in der Biosynthese der Phenalinolactone

In der späten Biosynthese werden vermutlich zunächst die beiden Methylgruppen C-20 und C-21 oxidiert und anschließend die drei beschriebenen Substituenten per Acyl-, Acetyl- bzw. Glykosyl-Transferasen eingeführt. Das in dieser Form isolierbare Zwischenprodukt ist Phenalinolacton D (**26**). Oxidation an C-1 führt zum Phenalinolacton A (**5**), bzw. zum Phenalinolacton B (**24**) wenn man davon ausgeht, dass die Acyltransferase unspezifisch arbeitet und anteilig auch nicht-methylierte Pyrrolcarbonsäure als Substrat akzeptiert.
Oxidation dieser Methylgruppe des Pyrrolcarbonsäure-Substituenten in **5** und Methylierung der entstandenen Hydroxylgruppe ergeben schließlich das Phenalinolacton C (**25**).

7.7 Fütterungsexperimente mit dem Stamm Tü 6071

Um zu ermitteln, über welchen Weg der Stamm Tü 6071 die Terpenbausteine IPP und DMAPP synthetisiert, wurden verschiedene Fütterungsexperimente unternommen. Zunächst musste eine Produktionskurve der Phenalinolactone aufgenommen werden, aus der sich die 96. Stunde als Produktionsbeginn der Phenalinolactone ergab. Die Fütterungen erfolgten in Portionen von jeweils 1 mL 96, 98, 100, 102 und 104 Stunden nach dem Animpfen (gefütterte Gesamtmenge jeweils 625 mg).

Gefüttert wurden [1-^{13}C]Acetat sowie [1-^{13}C]Glucose in separaten Ansätzen. Aus beiden Experimenten konnten nur geringe Mengen Phenalinolacton A (**5**) isoliert werden (1.2 mg bzw. 1.5 mg im Falle der Glucosefütterung).
Das ^{13}C-NMR-Spektrum aus der Acetatfütterung zeigte eine Anreicherung im C-Atom der Acetylgruppe. Diese Position wurde zu 18 % angereichert, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein indirekter Einbau von Acetat auch in das Grundgerüst erfolgte. Diese Markierungen müssten erheblich weniger intensiv ausfallen als in der direkt ^{13}C-angereicherten Acetylgruppe, da Acetat im Stoffwechsel zunächst in IPP umgewandelt wird und dabei eine Durchmischung mit unmarkierten Vorläufermolekülen aus dem Organismus erfolgt. Für eine Aussage über den indirekten Einbau ins Grundgerüst war die Substanzmenge nicht ausreichend.

Bei Fütterungsexperimenten mit [1-^{13}C]Glucose trat dasselbe Problem auf: Ein Einbau ins anomere C-Atom der Amicetose konnte deutlich nachgewiesen werden, jedoch waren Substanzmenge und Einbaurate (1.25 % in C-1 der Zuckereinheit) zu gering, um einen Einbau im Grundgerüst nachweisen zu können.

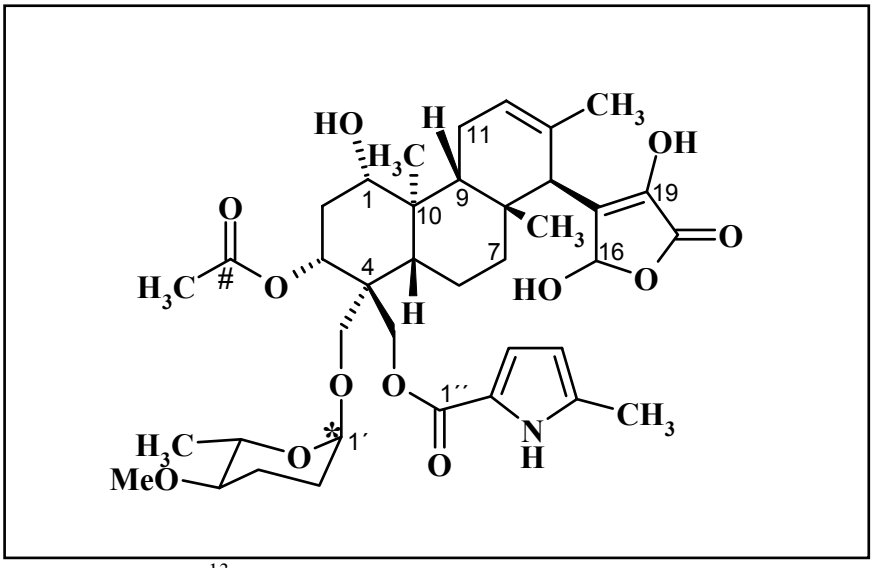


Abbildung 24: ^{13}C-Markierungen in Phenalinolacton A (**5**)

Abb. 24 zeigt den Einbau in C-1´ nach [1-^{13}C]Glucsose- (*) und in C-1 der Acetateinheit (#) nach [1-^{13}C]Acetat-Fütterungen.

7.8 Chemische Derivatisierung des Phenalinolacton A

Neben den bereits beschriebenen Versuchen zur Veresterung der Phenalinolactone wurden am Phenalinolacton A (**5**) die Acetylierung mit Acetanhydrid sowie die Methylierung mit Diazomethan untersucht. Bei beiden Reaktionen konnte keine definierte Umsetzung beobachtet werden.

Aufgrund der geringen vorhandenen Substanzmengen und der allgemeinen Labilität der Phenalinolactone sauren und basischen Bedingungen gegenüber wurden keine weiteren Derivatisierungsversuche unternommen.

7.9 Biologische Wirkungen

Die Phenalinolactone A (**5**) und B (**24**) wurden von K. Gebhardt breit auf antibiotische Wirkungen hin geprüft. In Agardiffusionstests wurde die Hemmung des Wachstums von 13 Gram-positiven und vier Gram-negativen Prokaryonten sowie von sieben Eukaryonten analysiert. Lediglich gegen *Rhodococcus erythropolis* und *Streptomyces viridochromogenes* bewirkten Phenalinolacton A und B eine leichte Hemmung (s. Anhang).

Im Lemna-Test auf herbizide Aktivität wurde eine Wachstumshemmung mit minimaler Bleichung der Wasserlinsen registriert (Bonitur: 3).

Algizide Wirkung gegenüber der Grünalge *Chlorella fusca* konnte nicht beobachtet werden.
Die Phenalinolactone A und B zeigten in Cytotxizitätstests gemäß den NCI-Richtlinien[65] gegen die Krebszell-Linien HM02 (Magencarcinom), MCF7 (Mammacarcinom) und Hep G2 (Lebercarcinom) in Konzentrationen bis 10 µg/mL keine Wirkung[*].

7.10 Beurteilung der Biosyntheseleistung des Stammes Tü 6071

Der Stamm *Streptomyces* sp. Tü 6071 produziert eine Reihe ungewöhnlicher Substanzen. Die drei Macrolactamantibiotika Maltophilin (**7**), Dihydromaltophilin (**8**) und Alteramid (**9**) konnten bislang noch nicht gemeinsam aus einem Stamm isoliert werden. Die Streptocidine aus Tü 6071 sind für Streptomyceten untypische Peptidantibiotika[32].
Die Phenalinolactone schließlich gehören zu den wenigen terpenoiden Strukturen, die von Actinomyceten gebildet werden. Mit ihrer Kombination der verschiedensten Strukturelemente, die jeweils für sich nur selten beschrieben wurden, weisen sie eine neue, ungewöhnliche Struktur auf.
Es bleibt abzuwarten, was die Strukturaufklärung der noch verbleibenden Substanzgruppe III des Kulturfiltrats erbringt. Es ist aber denkbar, dass das Potential dieses biosynthetisch außergewöhnlich begabten Stammes mit den drei genannten Substanzklassen noch nicht ausgeschöpft ist. Möglicherweise könnten durch weitere Variationen der Kultivierungsbedingungen gemäß dem OSMAC-Ansatz noch andere interessante Metaboliten isoliert werden.

[*] Für die Durchführung der Toxizitätstests danke ich Herrn Prof. Dr. Beil (Medizinische Hochschule Hannover).

7.11 Ausblick

Da die bisherigen Fütterungsversuche eine zu geringe Menge an markierten Phenalinolactonen ergaben, sind weitere Experimente nötig. Alternativ könnten für die Fütterungen markiertes Glycerin oder Malonat verwendet werden, die ebenfalls Vorläufer der IPP-Biosynthese sein können. Insbesondere zur Klärung der Lactonringbildung wären spezifisch markierte Verbindungen hilfreich.

Derzeit wird der Stamm Tü 6071 von I. Plitzko[66] auf Phenalinolacton-Produktion hin untersucht. Sie konnte über HPLC-MS Messungen zeigen, dass die Phenalinolactone zwar produziert werden, eine Isolierung jedoch an zu geringen Mengen scheiterte. Weitere Optimierungsarbeit ist hier nötig, um die Ausbeuten zu steigern.

Zur Absicherung der Struktur müssen weitere Versuche zur Kristallisierung der Phenalinolactone unternommen werden. Die Veresterung zum Brombenzoat wäre sinnvoll, um zum einen die Kristallisationseigenschaften zu verbessern und zum anderen über die eingeführten Schweratome zugleich die absolute Konfiguration bestimmen zu können. Dazu wäre eine Optimierung der Reaktion nötig, die aufgrund zu geringer Substanzmengen nicht durchgeführt werden konnte.

Recht aussichtsreich erscheint die Suche nach dem Biosynthesegencluster der Phenalinolactone. Die voraussichtliche Existenz einer Glycosyltransferase im Gencluster gestattet es, mittels einer entsprechenden Sonde gezielt nach dem Biosynthesegen zu suchen. Durch die Analyse der Gene sollten weitere Erkenntnisse über die Biosynthese des Lactonteils gewonnen werden können.

3. *Streptomyces cellulosae* subsp. *griseorubiginosus* Stamm S 1013

3.1 Bekannte Metaboliten des Stammes S 1013

Streptomyces cellulosae subsp. *Griseorubiginosus* Stamm S 1013 wurde aus einer sizilianischen Erdprobe isoliert. Im Rahmen eines Kooperationsprojektes mit der Hoechst AG fiel er im chemischen Screening aufgrund von intensiv violetten Farbreaktionen mit Tetrazolblau auf. Die dafür verantwortlichen Metaboliten, die Gabosine, konnten im Zuge früherer Arbeiten aus den Jahren 1989 bis 1995[67,68,69,70] im Arbeitskreis Zeeck isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Aus verschiedenen Streptomyceten-Stämmen sind bis heute 17 verschiedene, zur Klasse der Carbazucker gehörende Gabosine isoliert und teilweise publiziert worden[71,72] (vergleiche dazu Gabosin D (**35**) und Gabosin Q (**36**), s. Abb. 25).

Die Bezeichnung Carbazucker wurde von T. Suami und S. Ogawa geprägt[73] und ersetzte den bis dahin verwendeten Begriff „Pseudozucker“[74]. Als charakteristisches Strukturelement tragen Carbazucker im Vergleich zu Zuckern eine Methylengruppe statt des Ringsauerstoffs. Die Gabosine gehören zur Untergruppe der Ketocarbazucker, da sie eine Ketofunktion am Carbocyclus aufweisen. Auch bei den Carbazuckern gibt es Pyranose- und Furanose-Formen, aufgrund der fehlenden Halbacetalstruktur zeigen sie aber nicht die für Zucker typischen reduzierenden Reaktionen. Die Zuckerverwandtschaft zeigt sich aber in physikalischen Charakteristika, z. B. dem süßen Geschmack oder der relativ schlechten Kristallbildung.

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit Zuckern können verschiedene Carbazucker an Zucker-verwertende Enzyme binden und diese hemmen. Dies erklärt ihr großes Anwendungspotential z. B. als Enzyminhibitoren[75,76] und Antibiotika[77]. Als Beispiel für einen Enzyminhibitor zur Therapie von Diabetes-Erkrankungen des Typs II sei die Acarbose (**37**) genannt, die als α-Glucosidase-Inhibitor wirkt[78] (s. Abb. 25). Entscheidendes Strukturelement von **37** ist ein ungesättigter Aminocarbazucker, an den ein Trisaccharid geknüpft ist.

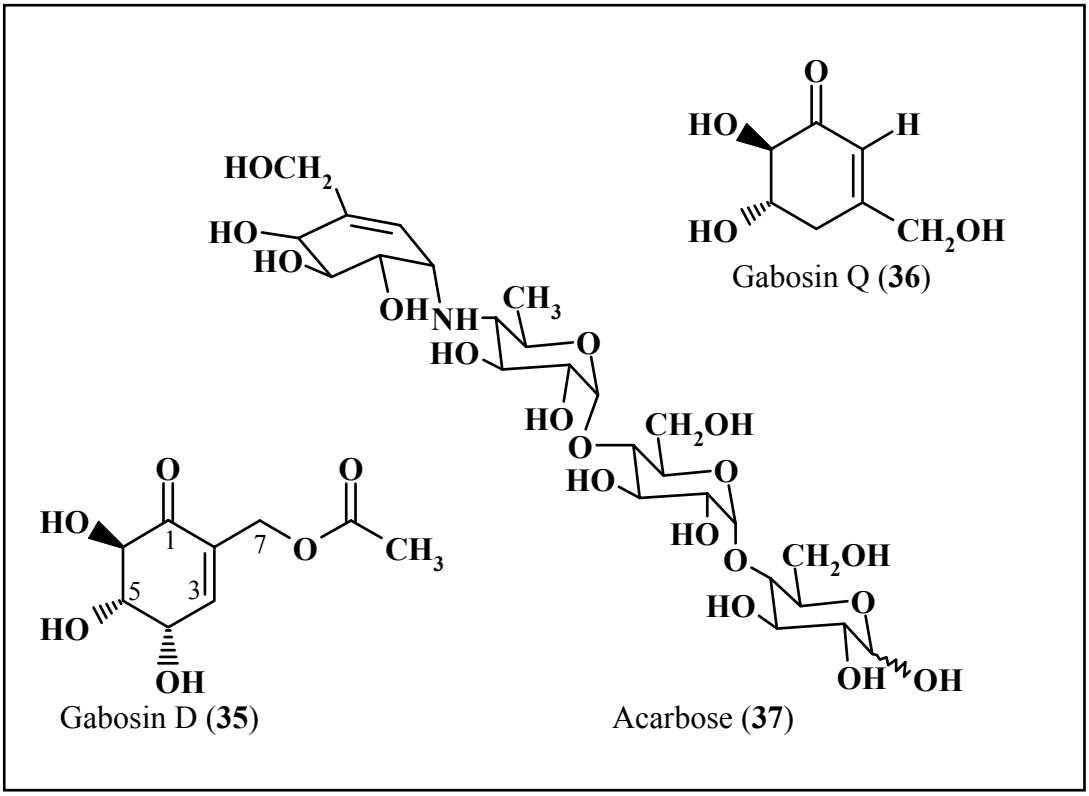


Abbildung 25: Beispiele für Carbazucker

In biologischen Standardtests erwiesen sich die Gabosine als inaktiv, ein Crotonsäureester des Gabosins C, das COTC, ist jedoch als cancerostatisch und cytotoxisch bekannt[79,80].

In ihrer Dissertation isolierte R. Höfs aus dem Stamm S 1013 die Gabosine D (**35**) und E (**38**)[71]. Ab Stunde 30 im Fermentationsverlauf wird **35** produziert und mit Beginn der 90. Stunde in **38** umgewandelt (s. Abb. 26).

Durch Anwendung der OSMAC-Methode (***O***ne ***S***train - ***Ma***ny ***C***ompounds) konnte Höfs das bis dahin bekannte Metabolitenspektrum des Stammes S 1013 um die Komponenten Indol-3-essigsäure (**39**), Pyrrol-2-carbonsäure (**40**) sowie ein 6´-Bromo-angustmycin A-Derivat (**41**) erweitern (s. Abb. 26). Die Hoffnung, durch Zugabe von NaBr als Brom-lieferndem Nährmedienzusatz die Ausbeute an **41** zu erhöhen, erfüllte sich nicht. Stattdessen wurde die Produktion eines neuen Metaboliten induziert, dessen Strukturaufklärung ein bis dahin völlig neuartiges Kohlenstoffgerüst enthüllte. In Anlehnung an die Struktur wurde die Verbindung Hexacyclinsäure (**6**) genannt[71].

Aus Fermentationen im Nährmedium NL 1147 unter Zusatz von 1 g/L NaBr konnte die Hexacyclinsäure in Ausbeuten von 13 mg/L isoliert werden. Der weiße Feststoff färbt im Dünnschichtchromatogramm mit Anisaldehyd intensiv blau an und weist in Chloroform/Methanol (9:1) einen R_f-Wert von 0.23 auf. Mit Hilfe von spektroskopischen Methoden und einer Röntgenstrukturanalyse konnte die Struktur von **6** aufgeklärt werden.

Veresterung mit dem Mosher-Reagenz[81] lieferte die absolute Konfiguration des Moleküls (s. Abb. 26)[71].

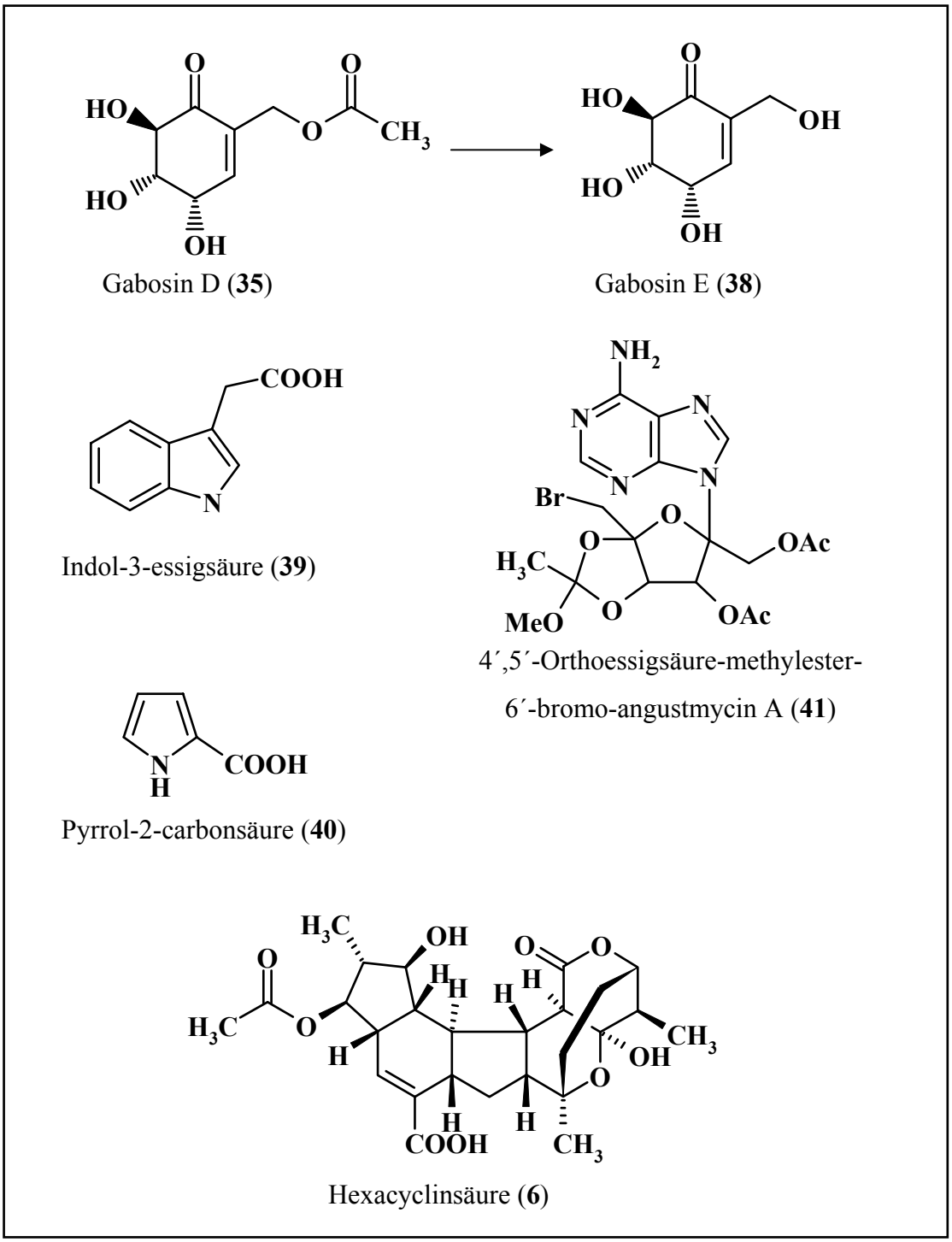


Abbildung 26: Metabolitenspektrum des Stammes S 1013

3.2 Reproduzierbarkeit der Hexacyclinsäure-Bildung

Zur Reproduktion der Hexacyclinsäure (**6**) wird der Stamm S 1013 standardmäßig in 300 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikanen kultiviert. Die Fermentation findet im Nährmedium NL 1147 unter Zusatz von 1 g/L NaBr statt, bei einer Temperatur von 30 °C und 180 Upm. Durch Chromatographie an Kieselgel und Sephadex LH-20 kann **6** in Ausbeuten von bis zu 13 mg/L erhalten werden.

Bereits in früheren Arbeiten[82] stellte der Stamm S 1013 die Produktion von Hexacyclinsäure zeitweise ein. Die Gabosine wurden unverändert produziert, **6** konnte jedoch weder im Dünnschichtchromatogramm noch durch HPLC nachgewiesen werden. Dieses Problem trat auch auf, nachdem S 1013 frisch aus der Langzeiterhaltung auf Agarplatten ausgestrichen worden war. Um die Bildung von **6** wiederherzustellen wurden diverse Variationen des Nährmediums und der Kultivierungsbedingungen durchgeführt.

Zunächst wurde der Stamm aus verschiedenen Langzeiterhaltungs-Chargen, Kryokulturen, Sporenlyophilisaten und Glycerineinlagerungen, neu auf Agarplatten ausgestrichen. Ebenso wurde mit alten Agarplatten verfahren, die zu produzierenden Kulturen geführt hatten. Aus diesen verschiedenen Ansätzen beimpfte Agarplatten wurden auf Hexacyclinsäure-Produktion hin untersucht.

Die Fermentationsparameter wurden wie folgt variiert:

- Temperatur: 28 °C (Standard 30° C)
- 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen (Standard: ohne Schikane)
- Umdrehungszahl: 150 Upm (Standard: 180 Upm)
- Fermenter: 5 L, 10 L und 50 L
- Animpfvolumina für Schüttelkulturen: 1 bis 5 mL (Standard: 1.5 mL)
- Fermentation als Ruhekultur

Bereits in früheren Arbeiten wurde versucht, die Produktion von Hexacyclinsäure durch Zusatz verschiedener Oberflächenmaterialien wie MCI-Gel, XAD oder Siedesteinchen erneut zu induzieren[82].

Um eventuelle Versorgungs-Engpässe bei Biosyntheseexperimenten umgehen zu können, erschien die Beimengung von Natriumacetat oder -propionat zum Nährmedium Erfolg versprechend. Die Zugabe von DMSO zum Nährmedium konnte in verschiedenen Fällen die Ausbeute an Sekundärmetaboliten erhöhen bzw. die Produktion neuer Metaboliten induzieren[83]. Auch die Variation der Spurenelementlösung Spur 11 erschien sinnvoll, da

Nährmedienbestandteile unter Umständen die Sekundärmetabolitenproduktion hemmen oder fehlende Spurenelemente die Bildung von Substanzen verhindern können[84]. Folgende Nährmedienvariationen wurden untersucht:

- Zusatz von 1 g/L Natriumpropionat oder 1 g/L Natriumacetat
- Zusatz von 2 oder 5 % DMSO
- Variation jedes einzelnen Bestandteils der Spurenelementlösung Spur 11 (jeweils ohne oder mit der doppelten Menge)
- Verwendung der doppelten Menge bzw. kein Zusatz von Spur 11
- Verwendung von Leitungswasser anstatt deionisiertem Wasser
- Verwendung von Haferflocken verschiedener Hersteller

Durch die dargestellten Variationen kam es nicht zur erneuten Produktion von Hexacyclinsäure (**6**). Erst ein zweiter Screening-Ansatz mit neuen Agarplatten der zuvor erwähnten Einlagerungen führte zum Erfolg. Dabei erbrachten die von Glycerineinlagerungen angeimpften Agarplatten unter Standardbedingungen die höchsten Ausbeuten an **6**. Es stellt sich die Frage nach der Ursache der schlechten Reproduzierbarkeit der Hexacyclinsäure-Produktion. Da im ersten Ansatz aus denselben Einlagerungen keine produzierende Kultur erhalten werden konnte, kann das „Alter“ der Abimpfung nicht entscheidend sein. Durch HPLC-MS-Messungen konnte Hexacyclinsäure (**6**) in den Kulturen nachgewiesen werden, allerdings in für die Isolierung zu geringen Mengen.
Erneut stellte sich die Frage nach dem Sinn von **6** für den Produzenten. Ein Genverlust mit zunehmendem Alter der Kulturen kann ausgeschlossen werden, da die Biosynthese offensichtlich nicht komplett eingestellt wird. Vielmehr scheint der Stamm sensibel auf einen der Fermentationsparameter zu reagieren. Geringfügige Schwankungen in den Zusammensetzungen und der Qualität der Nährmedienbestandteile könnten dazu führen, dass zeitweise ein inhibierender Effekt auftritt oder aber ein induzierender fehlt.

3.3 Neue Metaboliten aus dem Stamm S 1013

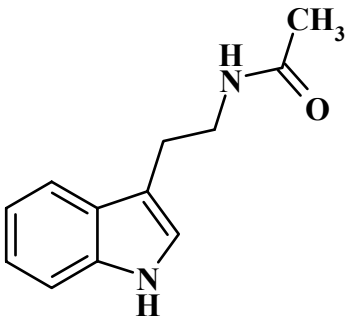
3.3.1 *N*-Acetyl-tryptamin (42)

Aus Ruhefermentationen, die in 3 L P-Kolben mit 1 L des Nährmediums NL1147 (Zusatz 1 g/L NaBr) durchgeführt wurden, konnte nach 6 Wochen Kultivierung bei 28 °C ein neuer Sekundärmetabolit (**42**) isoliert werden. Neben diesem neuen Metaboliten traten keine weiteren Substanzen in ausreichender Menge auf.

Die Isolierung aus dem Kulturfiltrat erfolgte analog zur Aufreinigung von Hexacyclinsäure über Chromatographie an Kieselgel und Sephadex LH-20. **42** konnte in Ausbeuten von 3 mg/L als weißer Feststoff erhalten werden, der sich im DC mit Anisaldehyd rötlich-braun anfärben ließ.

Anhand eines ESI-Massenspektrums konnte ein Molekulargewicht von 204 g/mol ermittelt werden. Im ^{1}H-NMR-Spektrum sind 14 Protonen erkennbar, zwei davon, mit chemischen Verschiebungen von $\delta_H = 5.55$ und $\delta_H = 8.20$, treten als breite Signale auf. Das ^{13}C-NMR-Spektrum zeigt 12 Signale, von denen eines im Ester-/Amid-Verschiebungsbereich, sechs im aromatischen und zwei im olefinischen angesiedelt sind. In Einklang mit der Masse lässt sich die Summenformel $C_{12}H_{14}N_2O$ aufstellen. Die daraus berechnete Anzahl der Doppelbindungsäquivalente zeigt sieben Doppelbindungen bzw. Ringe an.

Bereits anhand eindimensionaler NMR-Spektren lassen sich eine isoliert stehende Methylgruppe sowie ein ortho-substituierter Aromat identifizieren. Als weiteres Strukturelement tritt eine Ethylgruppe auf, deren Kohlenstoffatome jeweils einfach substituiert sind. Eine von diesen Daten geleitete Suche in der Datenbank Antibase[85] ergab Übereinstimmung mit *N*-Acetyl-tryptamin (**42**). **42** wurde bereits aus Myxobakterien und marinen Bakterienstämmen isoliert[86,87].



N-Acetyl-tryptamin (**42**)

3.3.2 7-*O*-Methyl-gabosin E (43)

Im Dünnschichtchromatogramm einer Kultivierung des Stammes S 1013 unter $^{18}O_2$-Atmosphäre (s. Kapitel 4.5.2) konnte eine Substanz (**43**) identifiziert werden, die zwar das gleiche Anfärbeverhalten wie die Gabosine D (**35**) und E (**38**) zeigte, aber einen größeren R_f-Wert aufwies (0.12 in Chlorofom/Methanol 9:1). Durch Chromatographie an Kieselgel und Sephadex LH-20 wurde **43** in Ausbeuten von 2.5 mg/L isoliert. In den ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren zeigte sich im Vergleich zu Gabosin E (**38**) eine zusätzliche, an ein Heteroatom gebundene Methylgruppe bei $\delta_H = 3.36$. Deren Position im Molekül ließ sich anhand ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie eindeutig lokalisieren. **43** wurde als 7-*O*-Methyl-gabosin E identifiziert.

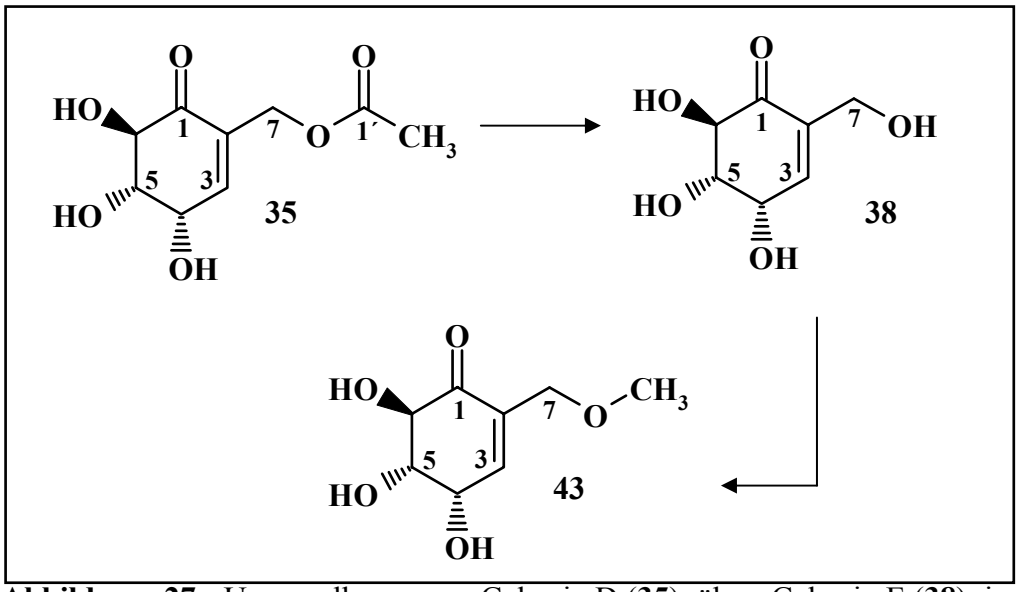


Abbildung 27: Umwandlung von Gabosin D (**35**) über Gabosin E (**38**) in 7-*O*-Methyl-gabosin E (**43**)

Da bisher immer nur eine Stereoform der Gabosine je Stamm isoliert werden konnte[70], wurde davon ausgegangen, dass **43** dieselbe Stereochemie wie Gabosin E (**38**) besitzt, was durch den Drehwert bestätigt wird.

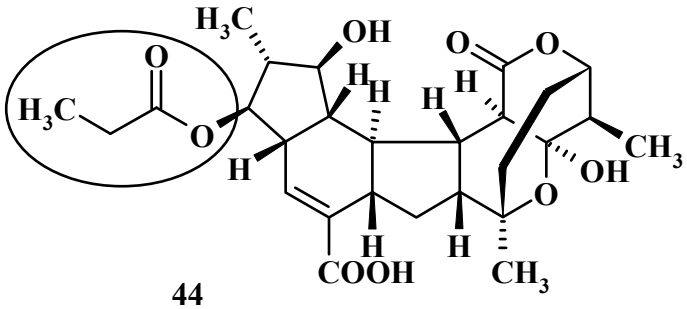
Zum Erntezeitpunkt nach 120 Stunden wurden weder Gabosin D (**35**) noch Gabosin E (**38**) nachgewiesen. Es kann deshalb angenommen werden, dass Gabosin E, welches ab der 90. Stunde aus Gabosin D entsteht, im weiteren Verlaufe in **43** umgewandelt wird.

3.3.3 14-Desacetyl-14-propionyl-hexacyclinsäure (44)

Bei der Fütterung von [1-^{13}C, $^{18}O_2$]Propionat (s. Kapitel 4.4.2) wurde neben Hexacyclinsäure (**6**) eine Substanz (**44**) produziert, die zwar dasselbe Anfärbeverhalten wie **6** besitzt, aber einen leicht größeren R_f-Wert aufweist. Durch Chromatographie an Kieselgel und Sephadex LH-20 konnte **44** in Ausbeuten von 2 mg/L isoliert und von **6** getrennt werden.

Das Protonenspektrum unterscheidet sich nur wenig von dem der Hexacyclinsäure (**6**), das im Spektrum auftretende charakteristische Methylgruppensignal bei $\delta_H = 2.06$ fehlte jedoch, was auf den Verlust der Acetylgruppe hindeutet. Stattdessen zeigte sich eine zusätzliche, zum Triplett aufgespaltene Methylgruppe bei $\delta_H = 1.17$ sowie im aliphatischen Bereich ein weiteres Signal mit einer zwei Protonen entsprechenden Intensität ($\delta_H = 2.30$).

Das ESI-Massenspektrum konnte aufgrund der mehrfachen Isotopenmarkierungen nicht zur Bestimmung der Masse herangezogen werden, jedoch zeigten UV- und IR-Spektren eine gute Übereinstimmung mit denen von **6**. Anhand ein- und zweidimensionaler NMR-Spektren konnte **44** als 14-Desacetyl-14-propionyl-hexacyclinsäure identifiziert werden.



44

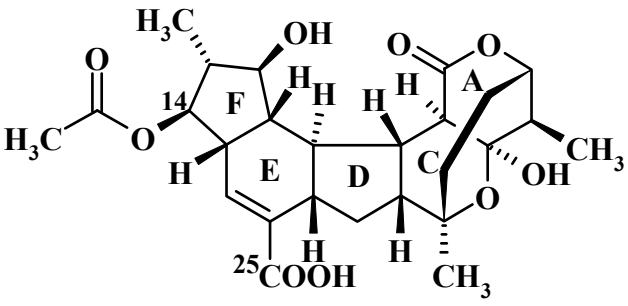
Die Bildung von **44** lässt sich durch den Druck erklären, den das in unnatürlichen Konzentrationen vorliegende Natriumpropionat auf die Acetyl-Transferase ausübt. Es zeigt sich, dass das Enzym durch geringe Selektivität gewissen Spielraum für eine Vorläufer-dirigierte Biosynthese lässt. Zur Klärung des Potentials für Vorläufer-dirigierte Biosyntheseexperimente bedarf es weiterer Untersuchungen, die jedoch nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit sind.

4. Untersuchungen zur Biosynthese der Hexacyclinsäure

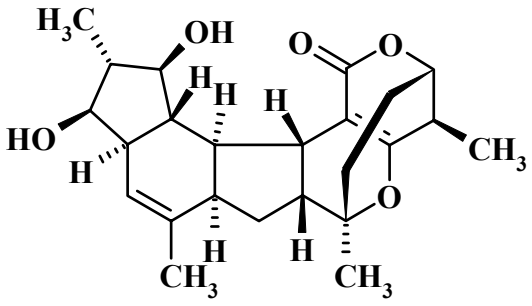
4.1 Zur Hexacyclinsäure strukturverwandte Substanzen

4.1.1 Strukturvergleich von Hexacyclinsäure und FR182877

Nahezu zeitgleich zur Veröffentlichung der Struktur sowie den Untersuchungen zur Biosynthese der Hexacyclinsäure[88] publizierten B. Sato *et al.* die strukturverwandte Substanz FR182877 (**45**)[89,90,91,92]. **45** wurde im Zuge eines *in vitro* Screenings auf neue, antimitotisch wirksame Substanzen aus dem Kulturfiltrat des Stammes *Streptomyces* sp. No.9885 isoliert, die Ausbeute betrug 2.38 mg/L.



Hexacyclinsäure (**6**)



FR182877 (**45**)

Abbildung 28: Strukturvergleich zwischen **6** und **45**

6 und **45**[92] sind vom Grundgerüst her nahezu identisch, lediglich die Stereochemie der Verknüpfung im D/E/F-Ringsystem unterscheidet sich. Während bei der Hexacyclinsäure (**6**) eine cis/trans-Verknüpfung vorliegt, weist **45** eine trans/cis-Verknüpfung auf. Das Kohlenstoffatom C-25 von **6** liegt im Vergleich zur Methylgruppe von FR182877 (**45**) als Carboxylgruppe vor. Außerdem ist die freie Hydroxygruppe an C-14 von **45** bei der

Hexacyclinsäure acetyliert. Neben diesen Modifikationen tritt ein weiterer Unterschied auf, der für die biologische Wirkung extrem wichtig ist. Die Ringe A und C sind in FR182877 (**45**) durch eine Doppelbindung verknüpft, die im Falle der Hexacyclinsäure (**6**) durch eine formale Wasseraddition hydratisiert vorliegt. In Methanol erweist sich die gespannte Doppelbindung als instabil, sie reagiert an Luft langsam zum FR182877-epoxid.
Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft von **6** und **45** kann eine ähnliche Biosynthese vermutet werden. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass zwei derart ähnliche Metaboliten dieser neuen Polyketid-Substanzklasse nahezu zeitgleich aus gänzlich verschiedenen Stämmen isoliert wurden. Dies spricht dafür, dass das verantwortliche Biosynthesegen kein Unikat ist, d.h. es könnten durchaus weitere „Hexacycline" existieren.

4.1.2 Zur biologischen Aktivität von FR182877

Das Screeningprogramm, das zur Isolierung von FR182877 (**45**) führte, basiert auf Säugetierzellen (BHK-cells), die charakteristische morphologische Veränderungen erfahren, wenn sie antimitotischen Substanzen ausgesetzt werden[89,90]. Antimitotische Substanzen, wie Taxol (Paclitaxel®)[93] oder die Vinca-Alkaloide[94] nehmen auf die Polymerisation der Mikrotubuli in Zellen Einfluss: die Zellen können sich nicht mehr teilen und bleiben in ihrem Wachstum in der G_2/M-Phase gehemmt. FR182877 gehört wie Taxol und die Epothilone zur Gruppe der Mikrotubuli-stabilisierenden Wirkstoffe, während Antitubulin-Wirkstoffe wie Vincristin den Aufbau der Mikrotubuli verhindern. Die zur Hemmung erforderliche Konzentration an FR182877 ist etwa drei- bis fünfmal so hoch wie im Falle des Taxols[89]. Es konnte gezeigt werden, dass die antimitotische Wirkung mit der Umwandlung von **45** in sein Epoxid verloren geht. Dies erklärt möglicherweise die Inaktivität der Hexacyclinsäure in cytotoxischen Tests.
In weiterführenden vergleichenden Untersuchungen der Aktivität von natürlichem (-)-FR182877 (**45**) und dem (+)-FR182877-Enantiomer konnten Sørensen und Mitarbeiter zeigen, dass **45** aufgrund der Ausbildung einer kovalenten Bindung zum Enzym spezifisch eine Carboxylesterase (CE-1) aus Mäusen hemmt, das Enantiomer hingegen nicht. Als elektrophile Strukturelemente, die zur Knüpfung einer kovalenten Bindung an Enzyme befähigt sind, wurden die Brückenkopf-Doppelbindung und das Lacton von FR182877 (**45**) vorgeschlagen[95].

Das Beispiel Hexacyclinsäure / FR182877 verdeutlicht die Bedeutung der Forderung, bei der Suche nach neuen Wirkstoffen nicht nur Naturstoffe als Leitstrukturen einzusetzen, sondern auch deren Grundgerüst zu variieren.

4.1.3 Überlegungen zur Biosynthese von FR182877

Noch bevor die Isolierung und Strukturaufklärung von FR182877 (**45**) publiziert wurde, stellten Sørensen und Mitarbeiter Biosyntheseüberlegungen zu **45** an und entwickelten daraus eine biomimetische Synthesestrategie[96]. Aufgrund der starken Ähnlichkeit von FR182877 zur Hexacyclinsäure (**6**) soll die Strategie genauer betrachtet werden.

Sørensen definierte als potentiellen Vorläufer (**46**) ein System, dessen Biogenese er nicht weiter spezifiziert. **46** soll eine intramolekulare Diels-Alder-Reaktion eingehen, wodurch das linke 5/6-Ringsystem (F/E) mit der erforderlichen Stereochemie entsteht (**47**). In einer Reaktion können auf diese Weise zwei Ringe aufgebaut und vier neue Stereozentren gebildet werden. Die nachfolgend durch eine Knoevenagel-Cyclisierung erhaltene Alkyliden-dicarbonyl-Verbindung (**48**) sieht Sørensen als möglichen Vorläufer für verschiedene, strukturell recht unterschiedliche Naturstoffe[97]. Neben FR182877 (**45**) und Hexacyclinsäure (**6**) nennt er Macquarimicin A (**49**) und Cochleamycin A (**50**) als biosynthetisch verwandte Strukturen (s. Abb. 29). Als abschließender Biosyntheseschritt zu **45** wird eine hetero-Diels-Alder-Reaktion angenommen.

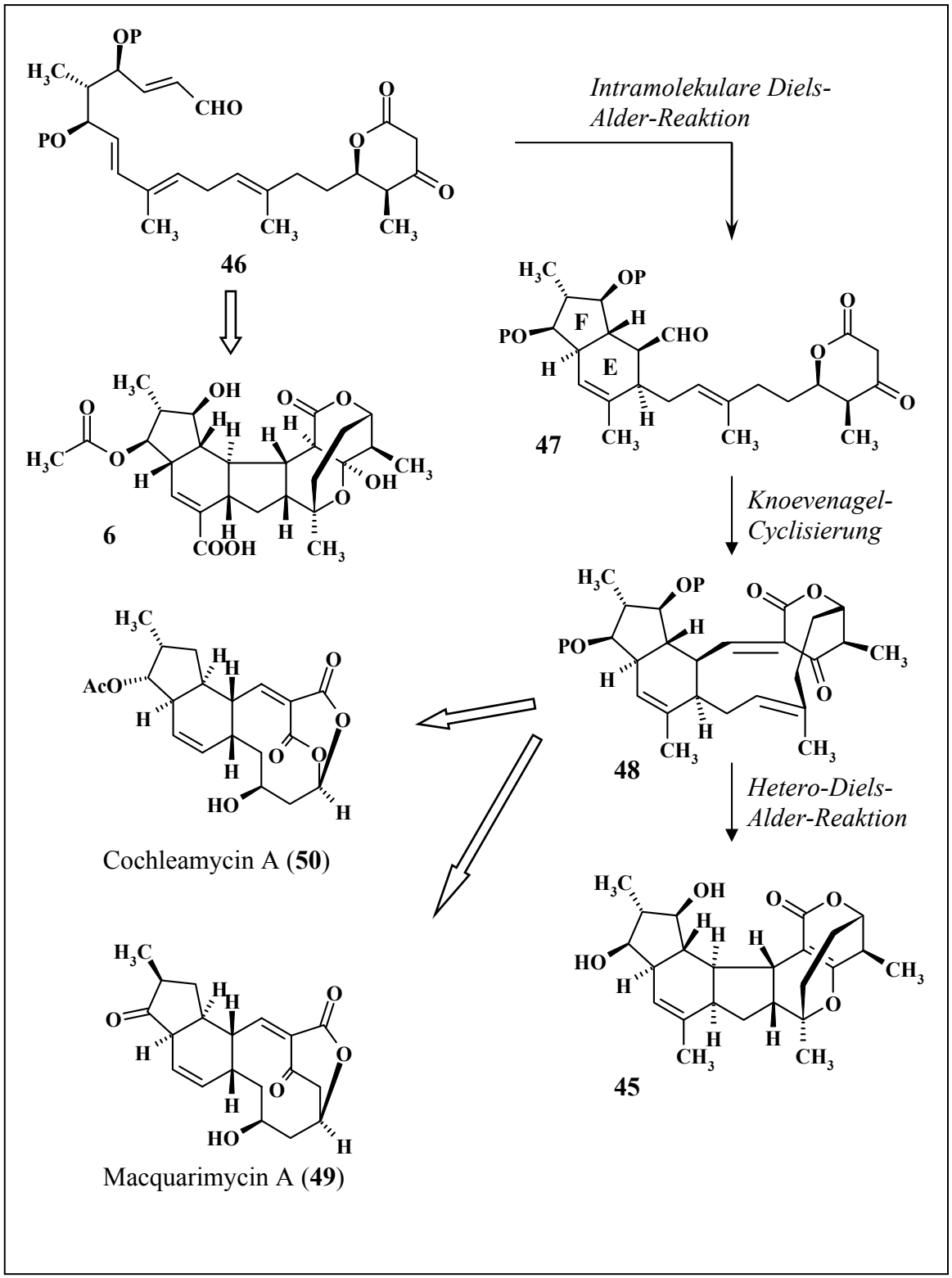


Abbildung 29: Vorschlag von Sørensen et al. zur Biosynthese des FR182877 (**45**) sowie möglicherweise verwandter Strukturen[96,97]

Seinen Vorschlag zur biomimetischen Synthese untermauerte Sørensen durch eine entsprechende Synthese von (+)-FR182877. Ein Vergleich der spektroskopischen Daten mit den von Sato *et al*. publizierten erbrachte mit Ausnahme des Drehwertes eine

Übereinstimmung. Der im Vergleich zu natürlichem **45** komplementäre Drehwert deutete auf eine zunächst falsch abgeleitete Stereochemie von FR182877 (**45**) hin und führte zu deren Korrektur[92].

In weiteren synthetischen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Diels-Alder-kompatible Systeme wie das von **46** spontan intramolekular cyclisieren[97].
Aufgrund der sehr interessanten antimitotischen Wirkung in Verbindung mit einem für die Totalsynthese herausfordernden Grundgerüst wurden in verschiedenen Arbeitsgruppen Projekte zur Darstellung von FR182877 begonnen. So konnten Evans und Mitarbeiter über eine alternative Strategie (-)-FR182877 synthetisieren[98]. Arbeiten zur Synthese der Hexacyclinsäure laufen zurzeit in der Arbeitsgruppe Kalesse[99].

4.1.4 Hexacyclinsäure und FR182877 aus der Sicht eines Synthetikers

Rein synthetisch betrachtet können Hexacyclinsäure (**6**) und FR182877 (**45**) aus ein und demselben Vorläufermolekül dargestellt werden. Die unterschiedliche Verknüpfung der Ringe D, E und F lässt sich durch das Beschreiten verschiedener Übergangszustände erklären.
Theoretisch sind vier Übergangsstrukturen denkbar (s. Abb. 30), von denen der *endo*-*Z*-anti-Zustand (**51**) jedoch aufgrund zu großer Ringspannung nicht realisierbar ist. Man unterscheidet *endo*- und *exo*-Anordnungen, deren Benennung sich nach der Orientierung der Dien- und Dienophil-verbindenden Kette richtet. Als *endo* wird derjenige Übergangszustand bezeichnet, in dem die Kette am Dienophil zum Dien hin zeigt. Bei beiden Fällen werden *syn*- bzw. *anti*-Additionen unterschieden.
Entsprechend der „*endo*"-Regel treten vermehrt die Übergangszustände beschritten, bei denen eine „maximale Häufung von Doppelbindungen" erreicht wird[100]. Dazu zählen auch die π-Systeme der aktivierenden Liganden. In der Synthese kann diese Tatsache dazu benutzt werden, Reaktionen durch die Platzierung von aktivierenden Liganden zu steuern. Diese Möglichkeit der Steuerung ist bei intramolekularen Reaktionen durch sterische Effekte eingeschränkt.

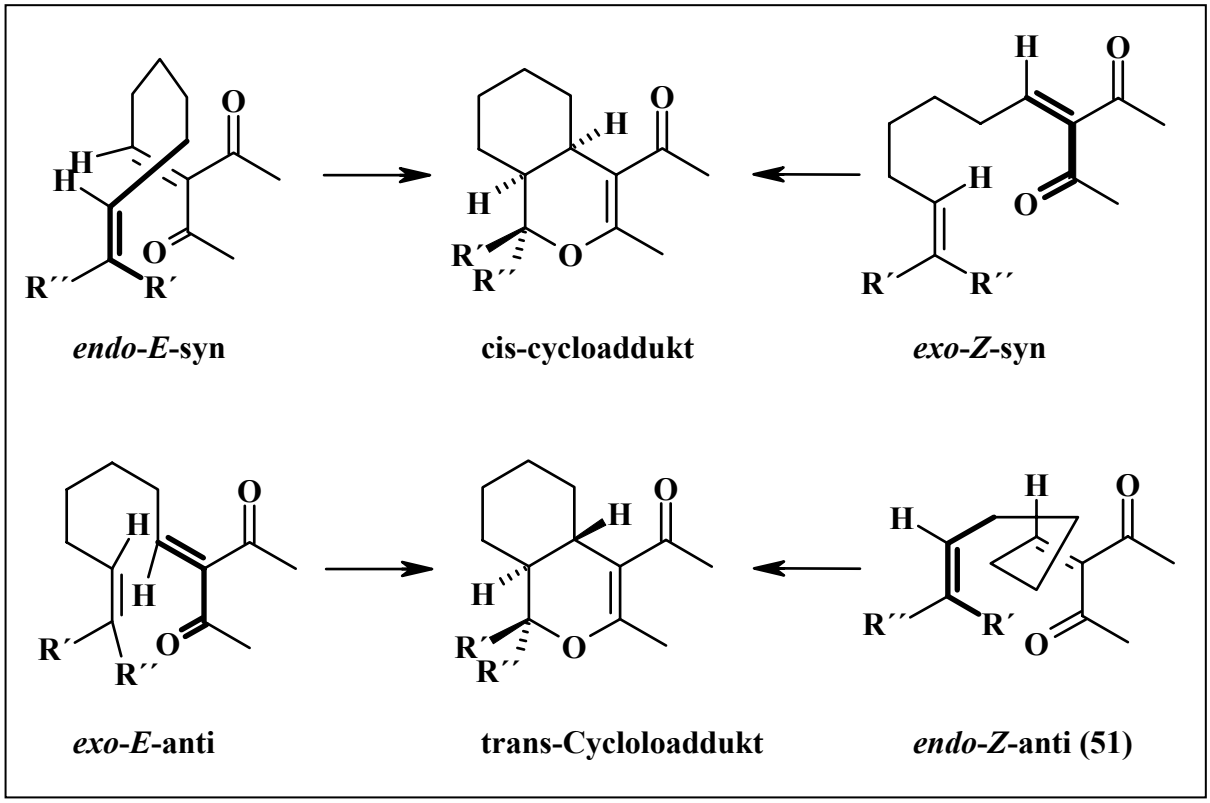


Abbildung 30: Übergangszustände und resultierende Cycloaddukte am Beispiel einer Hetero-Diels-Alder-Reaktion

Übertragen auf Hexacyclinsäure (**6**) und FR182877 (**45**) könnte ein sehr ähnliches Ausgangsmolekül durch eine Variation der Dienophil-Aktivierung verschiedene Übergangsstrukturen einnehmen, die entweder zu **52** oder **53** führen (s. Abb. 31).

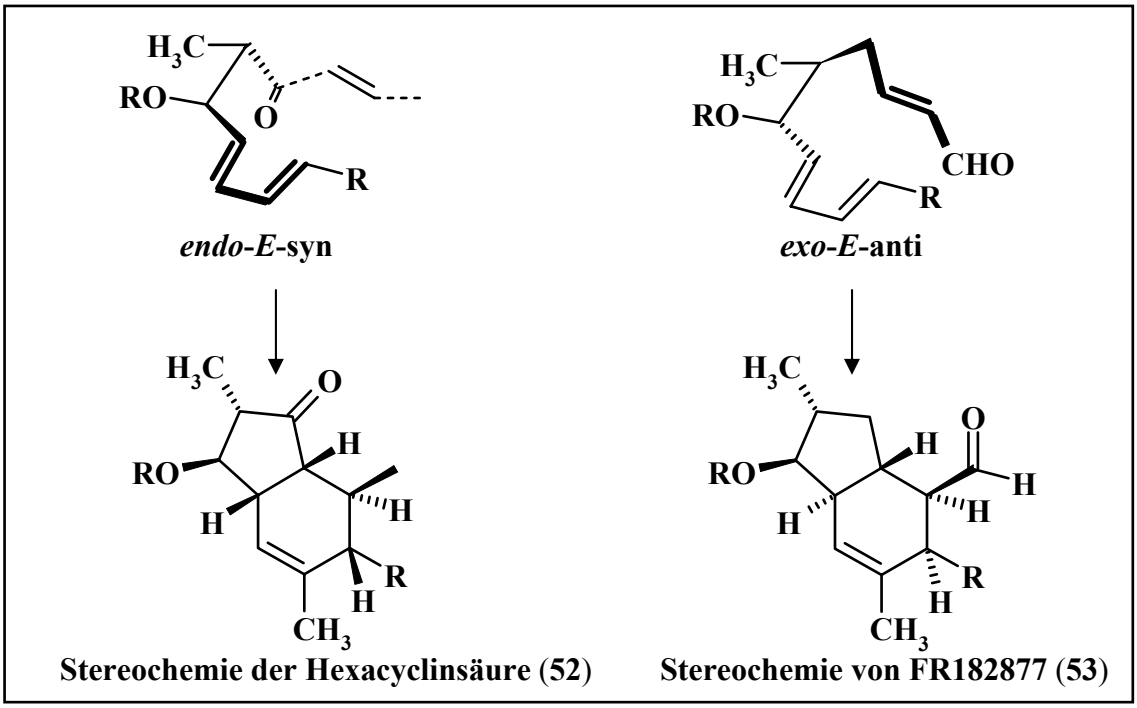


Abbildung 31: Durch Dienophil-Aktivierungen induzierte Übergangszustände

Auf dem Weg zu **6** muss ein *endo-E*-syn- und zur Synthese von FR182877 ein *exo-E*-anti-Übergangszustand durchlaufen werden. Die von Synthetikern verwendete Art der Reaktionssteuerung durch Aktivierung des Dienophils ist im Vergleich mit der Natur allerdings nicht konkurrenzfähig, da ohne Enzyme immer Gemische entstehen.

4.2 Kennt die Natur die Diels-Alder-Reaktion?

2002 jährte sich der Geburtstag von Kurt Alder zum 100. Mal. 75 Jahre sind vergangen seit Alder und sein Mentor Otto Diels in einem Artikel jene [4+2]-Cycloaddition beschrieben, die nach ihnen benannt wurde[101]. Seitdem hat sich die Diels-Alder-Reaktion zu einem besonders für die Totalsynthese von Naturstoffen unentbehrlichen Werkzeug entwickelt[102]. Beim konzertierten Ringschluss zwischen einem 1,3-Dien und einem Dienophil werden auf Kosten von zwei π-Bindungen zwei σ-Bindungen gebildet. Im Falle einer intramolekularen Reaktion entstehen dadurch zwei annelierte Ringe mit vier Stereozentren (s. Abb. 31).

Kennt die Natur die Diels-Alder-Reaktion? Diese Frage stellte Laschat bereits 1996[103], und noch immer wird die Existenz einer Diels-Alderase, deren alleinige Funktion in der Katalyse einer Diels-Alder-Reaktion besteht, diskutiert[104,105]. Alternativ besteht für den Aufbau von Diels-Alder-Produkten die Möglichkeit, dass das Enzym, welches in der Biosynthese den vorhergehenden Reaktionsschritt katalysiert, auch sich anschließende Cyclisierungsreaktionen ermöglicht. Dies könnte durch eine entsprechende räumliche Organisation des Edukts geschehen, in der die miteinander reagierenden Molekülteile in eine dem Übergangszustand ähnelnde Konstellation (Prä-ÜZ) geführt werden. Das Problematische an einer Diels-Alderase ist, dass der entsprechende Übergangszustand der Struktur des Produktes relativ ähnlich ist. Demzufolge könnte auch das Produkt an das Enzym binden, was ein Fortschreiten der Reaktion erschwert[105].

Während verschiedene Naturstoffe durch spontane Cyclisierungsreaktionen entstehen, erkennbar am in der Natur racemisch vorliegenden Gemisch, spricht für die Beteiligung eines Enzyms, dass viele Naturstoffe nur in einer stereoisomeren Form gebildet werden. So ist die Katalyse von konzertierten Cycloadditionen durch Biomoleküle im Falle von Antikörpern[106] und katalytisch-aktiven Ribonucleinsäuren (Ribozymen)[107] bereits seit längerem bekannt und akzeptiert.

Mit ihrer hexacyclischen Struktur gehören Hexacyclinsäure (**6**) und FR182877 (**45**) zu einer wachsenden Gruppe von Substanzen, bei deren Biosynthese eine enzymkatalysierte Diels-Alder-Reaktion vermutet wird. Die Diskussion beschränkt sich dabei nicht auf eine

Stoffklasse, sie wird vielmehr bei Polyketiden (Lovastatin (**52**)[108,109], Solanapyrone[110] und Ikarugamycin (**53**)[111]), Isoprenoiden (Eudesmanolide (**54**)[112]) und Alkaloiden (Catharanthin (**55**) und Vindolin (**56**)[113]) geführt.

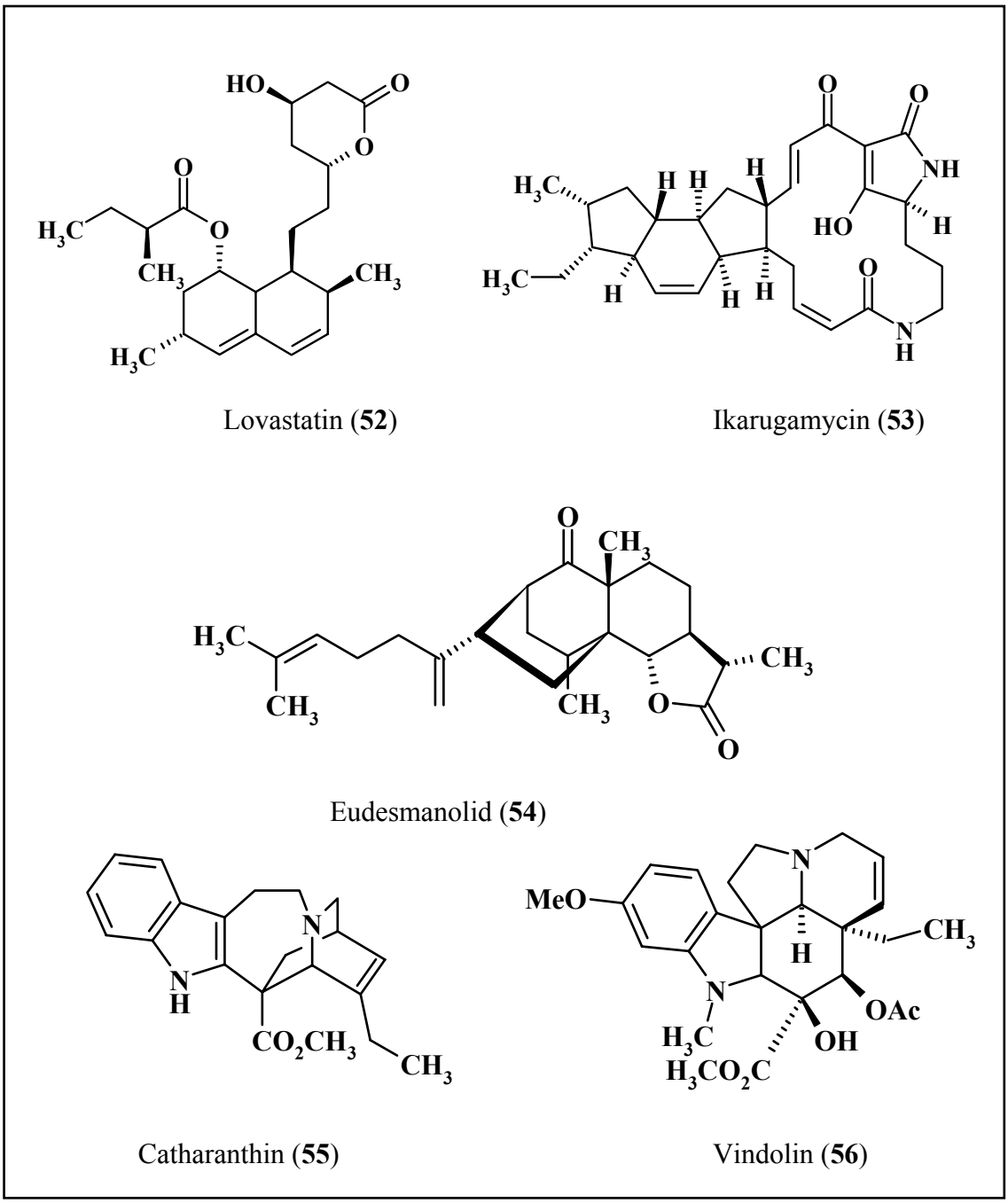


Abbildung 32: Einige Metaboliten, bei deren Biosynthese die Beteiligung einer Diels-Alder-Reaktion vermutet wird

Ikarugamycin (**53**) und die Spinosyne[114,115] besitzen ein 5/6/5-Ringsystem ähnlich dem der Hexacyclinsäure, bei dessen Aufbau die Beteiligung einer Diels-Alder-Reaktion vermutet wird.

Da die Beteiligung einer Diels-Alder-Reaktion an der Biosynthese von Lovastatin (**52**) als nahezu bewiesen angesehen wird, sollen die Ergebnisse hier näher erläutert werden. Lovastatin (Mevinolin®) wird von dem Pilz *Aspergillus terreus* (ATCC 20542) produziert und findet in der Medizin als Inhibitor der menschlichen Cholesterin-Biosynthese Anwendung[116]. Vederas und Hutchinson *et al*. konnten die Enzyme *lovB* (***L***ovastatin ***N***ona***k***etid ***S***ynthase, LNKS) und *lovC* isolieren[109] und ihre Funktionen zuordnen. Demnach findet auf der Stufe des Hexaketids an der Polyketidsynthase eine Diels-Alder-Reaktion statt. Die noch nicht reduzierte Carbonylgruppe der letzten Acetat-Einheit aktiviert dabei das Dienophil. Erst im Anschluss an die Cyclisierung schreitet die Polyketid-Synthese fort. Als Beweis wurde ein *in vitro*-Experiment mit dem aufgereinigten *lovB*-Enzym durchgeführt, in dem synthetisierte Vorläufer in Anwesenheit des Enzyms eine Diels-Alder-Reaktion eingehen. Die daraus resultierende Stereochemie ist identisch mit der des Lovastatins und kann weder durch thermische noch durch Lewis-Säure-katalysierte Reaktion erhalten werden.
Ein weiteres Beispiel ist die Macrophomatsynthase (MPS), deren erfolgreiche Kristallisation kürzlich beschrieben wurde[117]. Wie *lovB* überführt die MPS durch eine zuvor katalysierte Reaktion, in diesem Fall eine Decarboxylierung, das Edukt in einen reaktiven Zustand. Aus diesem energetisch angehobenen Zustand heraus findet die Diels-Alder-Reaktion statt. Die Produktinhibierung wird dabei durch eine zweite Decarboxylierung direkt nach der Cyclisierungsreaktion verhindert. Zusätzlich besitzt MPS eine flexible Schleife im Enzym, von der vermutet wird, dass sie möglicherweise Edukte an das Enzym heranträgt und Produkte ausschleust. Anhand der Kristallstruktur konnte gezeigt werden, dass das aktive Zentrum ausreichend Spielraum für größere strukturelle Umformungen während der Katalyse bietet.

Die eingangs gestellte Frage, ob die Natur zur Biosynthese von Naturstoffen Diels-Alder-Reaktionen nutzt, kann mit einem „Ja“ beantwortet werden. Ob es aber ein Enzym gibt, dessen einzige Funktion in der Vermittlung dieser Reaktion besteht, bleibt weiterhin ungeklärt. Es sollte jedoch überlegt werden, ob die Natur nicht viel effektiver arbeitet, indem mehrere Reaktionen hintereinander von demselben Enzym katalysiert werden.

4.3 Bekannte Fütterungsexperimente mit ^{13}C-markierten Vorläufern

Im Folgenden werden Untersuchungen präsentiert, die von R. Höfs während ihrer Dissertation durchgeführt wurden[71,118].

4.3.1 Fütterung von [1-^{13}C]Acetat, [2-^{13}C]Acetat und [1,2-$^{13}C_2$]Acetat

Zur Klärung der Biogenese der Hexacyclinsäure (**6**) wurden zunächst Fütterungen von Isotopenmarkiertem Natriumacetat vorgenommen. Nach Fütterung von [1-^{13}C]-markiertem Acetat konnte eine Anreicherung in sieben Positionen des Kohlenstoffgerüstes ermittelt werden. Die anschließende Fütterung von [2-^{13}C]Acetat ergab ebenfalls eine Isotopen-Markierung von sieben Kohlenstoffatomen. Dies deutet auf den Einbau von sieben Acetat-Einheiten hin, deren Einbaurichtung durch Kombination der beiden Experimente miteinander bestimmt wurde. Dass diese sieben Acetat-Bausteine intakt eingebaut werden, konnte durch Fütterung mit doppelt markiertem [1,2-$^{13}C_2$]Acetat bewiesen werden.

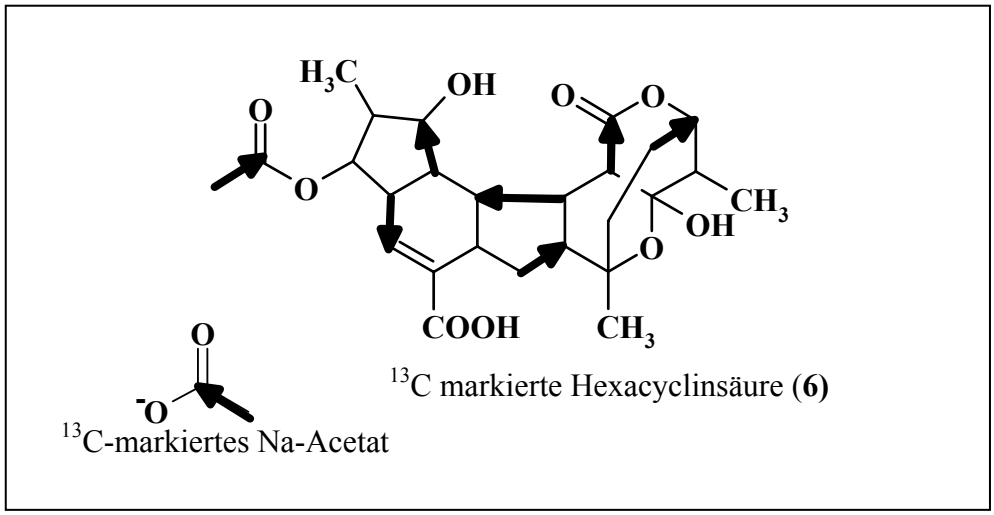


Abbildung 33: Einbau von markiertem Acetat in **6**

Das sich aus den Ergebnissen ergebende Bild (Abb. 33) lässt noch keinen Schluss auf die Biosynthese im Hinblick auf Startereinheit, Faltung und Einbaurichtung einer Polyketidkette zu. Es konnte lediglich die Vermutung bestätigt werden, dass es sich bei **6** um ein Polyketid handelt.

4.3.2 Fütterung von [1-^{13}C]Propionat und [3-^{13}C]Propionat

Zur Klärung der Herkunft der drei Methylgruppen bzw. der Carboxylgruppe wurde der Einbau von markiertem Propionat untersucht. Wie erwartet bewirkte die Zugabe von [1-^{13}C]Propionat die Anreicherung in vier Kohlenstoffatomen der Hexacyclinsäure. Ein analoger Zusatz von [3-^{13}C]Propionat zur wachsenden Kultur bestätigte dies und zeigte die Einbaurichtung der vier Propionat-Bausteine an (s. Abb. 34).

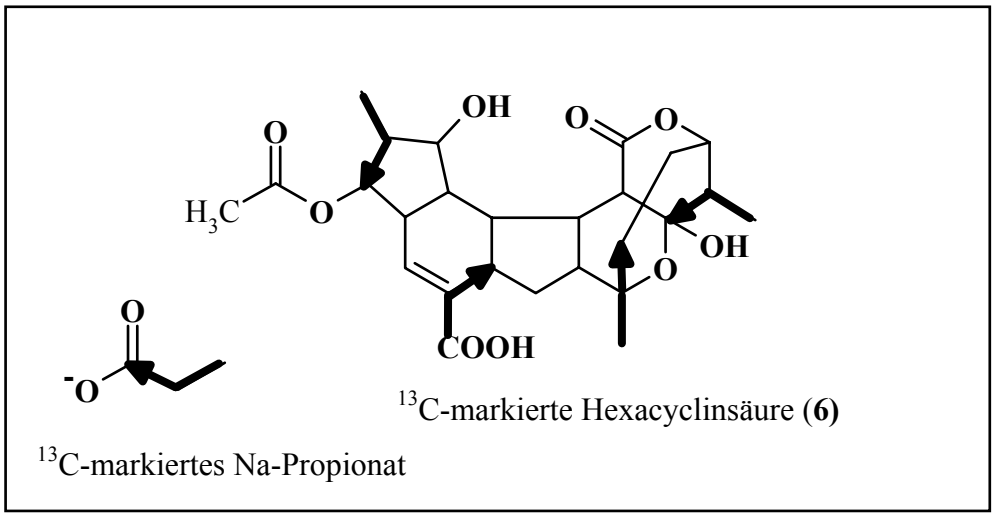


Abbildung 34: Einbau von markiertem Propionat in **6**

4.3.3 Fütterung von [1,4-$^{13}C_2$]-Succinat

Zur Klärung der Startereinheit war es nötig, Succinat zu füttern, da diese mit dem bisher erhaltenen Einbaumuster noch nicht eindeutig bestimmt werden konnte. Abb. 35 zeigt zwei Möglichkeiten für die Startereinheit: einmal Acetat (**57**) und einmal Succinat (**58**).

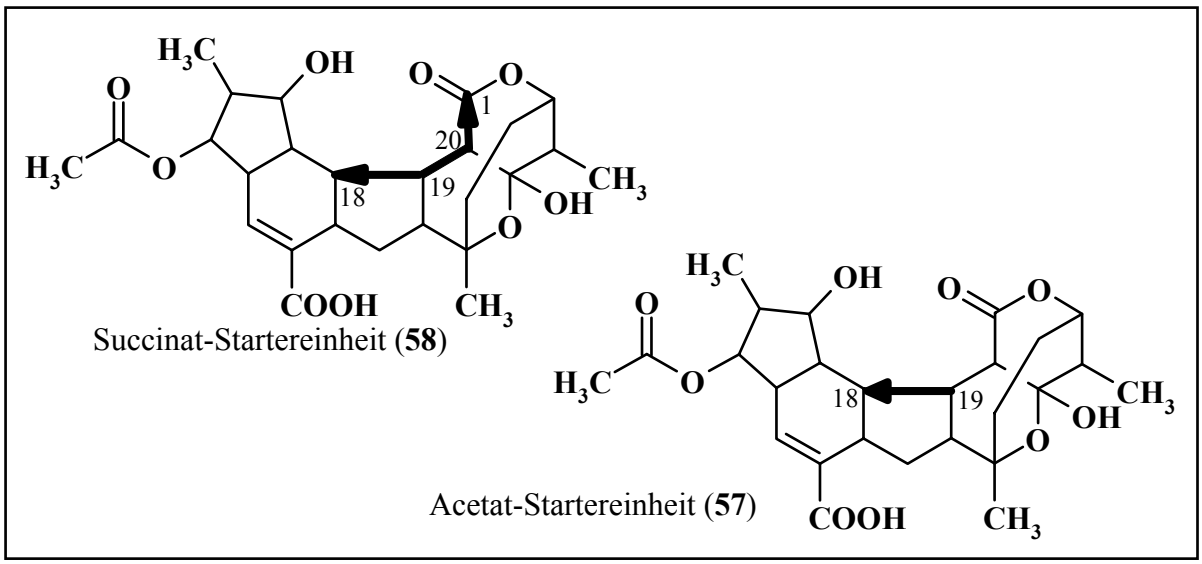


Abbildung 35: Succinat bzw. Acetat als mögliche Startereinheiten bei der Biosynthese von **6**

Succinat wurde [1,4-$^{13}C_2$]-markiert zugesetzt und sollte bei einem erfolgreichen Einbau in das Molekül zu einer Anreicherung der Kohlenstoffatome C-18 und C-1 führen. Es konnte jedoch keine Isotopen-Anreicherung in **6** nachgewiesen werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Acetat als Startereinheit benutzt wird.

4.3.4 Diskussion der Fütterungsergebnisse

Mit den beschriebenen Experimenten ist der Ursprung aller Kohlenstoffatome aufgeklärt. Hexacyclinsäure (**6**) wird aus sieben Acetat- und vier Propionat-Einheiten aufgebaut. Startereinheit der Polyketidsynthese ist das Acetat C-18/C-19. Dort beginnend kann, wie in Abb. 36 gezeigt, eine Polyketid-Kette derart gefaltet werden, dass sie als Vorläufer für **6** dienen kann. Aufgrund der Tatsache, dass im Verlauf der Biosynthese viele Variationen an der wachsenden Polyketidkette nötig sind, muss die Polyketidsynthase vom Typ I sein. Die Synthasen des Typs II zeigen nicht dieses Funktionalisierungs-Repertoire.

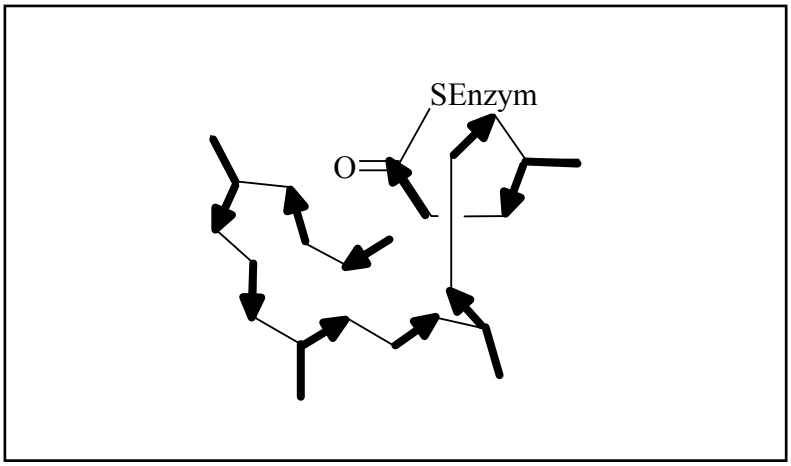
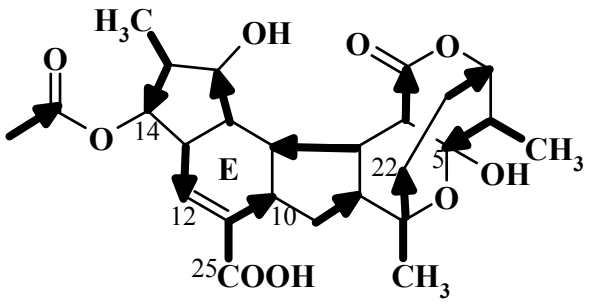


Abbildung 36: Polyketidkette aus Acetat- und Propionat-Einheiten

In Abb. 36 ist eine vereinfachte Polyketid-Kette aus Acetat- und Propionat-Einheiten ohne Funktionalisierungen dargestellt. Ob tatsächlich zunächst die Synthese der kompletten Polyketidkette und dann erst die Cyclisierungsreaktionen stattfinden, soll in Kapitel 4.6 eingehender diskutiert werden.

Durch die Untersuchungen von R. Höfs wurde das Einbaumuster bewiesen, jedoch treten bei den Fütterungsexperimenten mit markiertem Natrium-[1-^{13}C]propionat im Ring E zusätzlich zu der regulär erwarteten Anreicherung in C-10 noch schwache Markierungen in den Signalen C-12 und C-25 auf. Dies lässt sich möglicherweise über eine Metabolisierung des Propionats im Stoffwechsel erklären.



Position	Einbau ^{13}C (%)
C-5	85.6
C-14	42.6
C-10	61.6
C-22	76.8
C-12	2.0
C-25	1.7

Abbildung 37: Ungewöhnliche ^{13}C-Anreicherung in C-12

Alternativ wäre im Zuge der Cyclisierung ein Umlagerungsmechanismus denkbar, allerdings sollten in diesem Falle die ungewöhnlichen Markierungen in C-12 und C-25 in vergleichbarer Größenordnung wie die anderen Markierungen vorliegen.

Eine Klärung dieses Problems sollte durch ein Fütterungsexperiment mit uniform-^{13}C-markiertem Propionat möglich sein. Im Falle einer Umlagerung würde durch Bindungsspaltung die Kopplung zwischen den getrennten Kohlenstoffatomen im NMR-Spektrum wegfallen.

4.4 Fütterungsexperimente mit ^{13}C- und ^{18}O-markierten Vorläufern

Für die unter Standardbedingungen durchgeführten Fütterungsexperimente wurde auf das von R. Höfs optimierte Fütterungsschema zurückgegriffen. Die markierten Vorläufersubstanzen (800 mg) wurden dazu in sterilem Wasser gelöst und neutralisiert. In 1 mL Portionen erfolgte die Fütterung nach 80, 86, 94, 100 und 106 Stunden. Aufgearbeitet wurde nach 120 Stunden.

4.4.1 Fütterung von [1-^{13}C, $^{18}O_2$]Acetat

Zur Interpretation von Mechanismen bei der Biosynthese eines Metaboliten kann die Kenntnis der Herkunft der im Molekül enthaltenen Sauerstoffatome sehr hilfreich sein. Dies wird am Beispiel der von Sørensen und Mitarbeitern vorgeschlagenen Beteiligung einer Hetero-Diels-Alder-Reaktion in der Biosynthese von FR182877 und Hexacyclinsäure deutlich. Eine

derartige Cyclisierung würde zum Einbau des aus einer Propionat-Einheit stammenden Sauerstoffatoms in das Ringsystem des Halbketals führen (s. Abb. 29, S. 54).

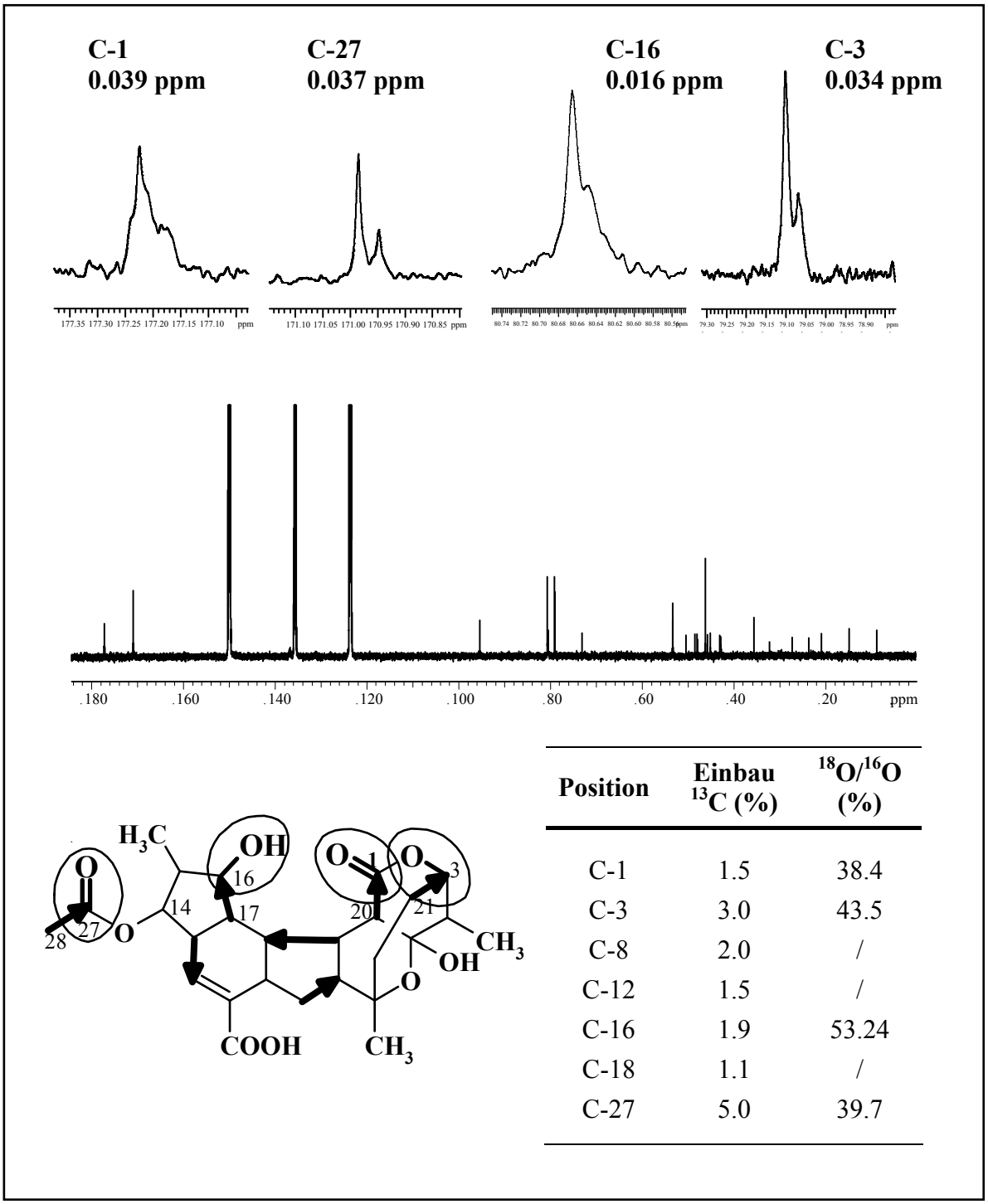
Der Verbleib von Sauerstoffatomen aus Vorläufermolekülen lässt sich experimentell durch ^{18}O-Markierung und Zufütterung dieser Vorläufer verfolgen. Ein am Kohlenstoffatom gebundenes ^{18}O-Isotop bewirkt durch seinen Isotopie-Effekt eine Verschiebung des entsprechenden Kohlenstoff-Signals im ^{13}C-NMR-Spektrum[119]. Je nach Einbaurate der Sauerstoff-Markierung in das Molekül zeigt sich neben dem regulären ^{13}C-Signal ein um einen charakteristischen Wert verschobenes. Ein Vergleich der Signalintensitäten lässt sich zur groben Abschätzung des ^{16}O/^{18}O-Verhältnisses verwenden. Da die ^{13}C-Verschiebung nur etwa 0.016 bis 0.050 ppm je ausgetauschtem ^{18}O-Atom ausmacht, werden für die Fütterungsexperimente oftmals zusätzlich ^{13}C-angereicherte, also doppelt markierte Verbindungen verwendet. Dadurch erhöht sich die Intensität der jeweiligen Kohlenstoff-Signale erheblich und die Isotopen-Verschiebung ist in vielen Fällen besser bestimmbar.

Die Größe des Effektes ist stark von der Art der funktionellen Gruppe abhängig[120,121,122]. So führen ^{18}O-Atome in Carbonylen zu einem größeren Effekt (0.034 - 0.050 ppm) als beispielsweise in sekundären Alkoholen (0.016 - 0.023 ppm)[121]. Während die Größe des Shifts bei Carbonylen nicht vom Lösungsmittel abhängt, verändert sich dieser bei Alkoholen beispielsweise mit dem Wechsel von Chloroform-d_1 auf Pyridin-d_5 um bis zu 0.003 ppm. Ein Einbau mehrerer ^{18}O-Atome an einem Kohlenstoffatom führt zum additiven Effekt[123].

Die Zufütterung von [1-^{13}C, $^{18}O_2$]Acetat zur Kulturlösung bewirkte wie im Falle der [1-^{13}C]Acetat-Fütterung eine ^{13}C-Anreicherung in sieben Kohlenstoffatomen der Hexacyclinsäure. Dies belegt den erfolgreichen Einbau der Acetat-Bausteine in das Molekül. Vier der angereicherten Signale zeigen zudem eine deutliche Aufspaltung. Die Differenz zu den hochfeldverschobenen Signalen beträgt 0.037 ppm (C-27), 0.017 ppm (C-16), 0.034 ppm (C-3) und 0.039 ppm (C-1). Während die Signale der Atome C-27, C-16 und C-3 jeweils einen ^{18}O-Shift zeigen und somit eindeutig zu interpretieren sind, weist C-1 des Lactons ein komplexeres Aufspaltungsmuster auf. Erwartet wird ein doppelter Isotopenshift, der zum einen vom Carbonyl-Sauerstoffatom und zum anderen vom verbrückenden Ringsauerstoff der Acetat-Einheit C-3/C-21 verursacht wird.

Die Abspaltung der Polyketidkette von der Synthase erfolgt durch nucleophilen Angriff der Hydroxylgruppe von C-3 auf C-1, wobei das aus der Acetateinheit C-3/C-21 stammende Sauerstoffatom in den entstehenden Lactonring eingebaut wird. Das Carbonyl-Sauerstoffatom an C-1 bleibt erhalten. Dass der Isotopeneffekt des Ringsauerstoffatoms nicht auf C-1 übertragen wird, liegt an der geringen Einbaurate der beiden Acetatbausteine und am

statistischen Einbau durch die Vermischung mit unmarkiertem Acetat im Organismus. So liegt bei Einbauraten des Vorläufers von 3 % in C-3 und einem $^{18}O/^{16}O$-Verhältnis von 43.5 % die Wahrscheinlichkeit bei knapp 1.5 %, dass ein zweiter ^{18}O-Isotopieeffekt auf C-1 wirken kann.



Position	Einbau ^{13}C (%)	$^{18}O/^{16}O$ (%)
C-1	1.5	38.4
C-3	3.0	43.5
C-8	2.0	/
C-12	1.5	/
C-16	1.9	53.24
C-18	1.1	/
C-27	5.0	39.7

Abbildung 38: ^{13}C- und ^{18}O-Einbau in Hexacyclinsäure (**6**) nach Fütterung von [1-^{13}C, $^{18}O_2$]Acetat. (Sämtliche Einbauraten: siehe Anhang)

4.4.2 Fütterung von [1-^{13}C, $^{18}O_2$]Propionat

Entsprechend der Fütterung von einfach markiertem [1-^{13}C]Propionat werden vier Kohlenstoffatome ^{13}C-angereichert. Wie anhand der Struktur erwartet, sind jedoch nur zwei der vier durch Propionat-Einbau eingeführten C-Atome durch Isotopen-Shifts markiert.
Das Ergebnis dieser Untersuchung, dargestellt in Abb. 39**,** ist besonders wertvoll für die Analyse der Cyclisierungsmechanismen.

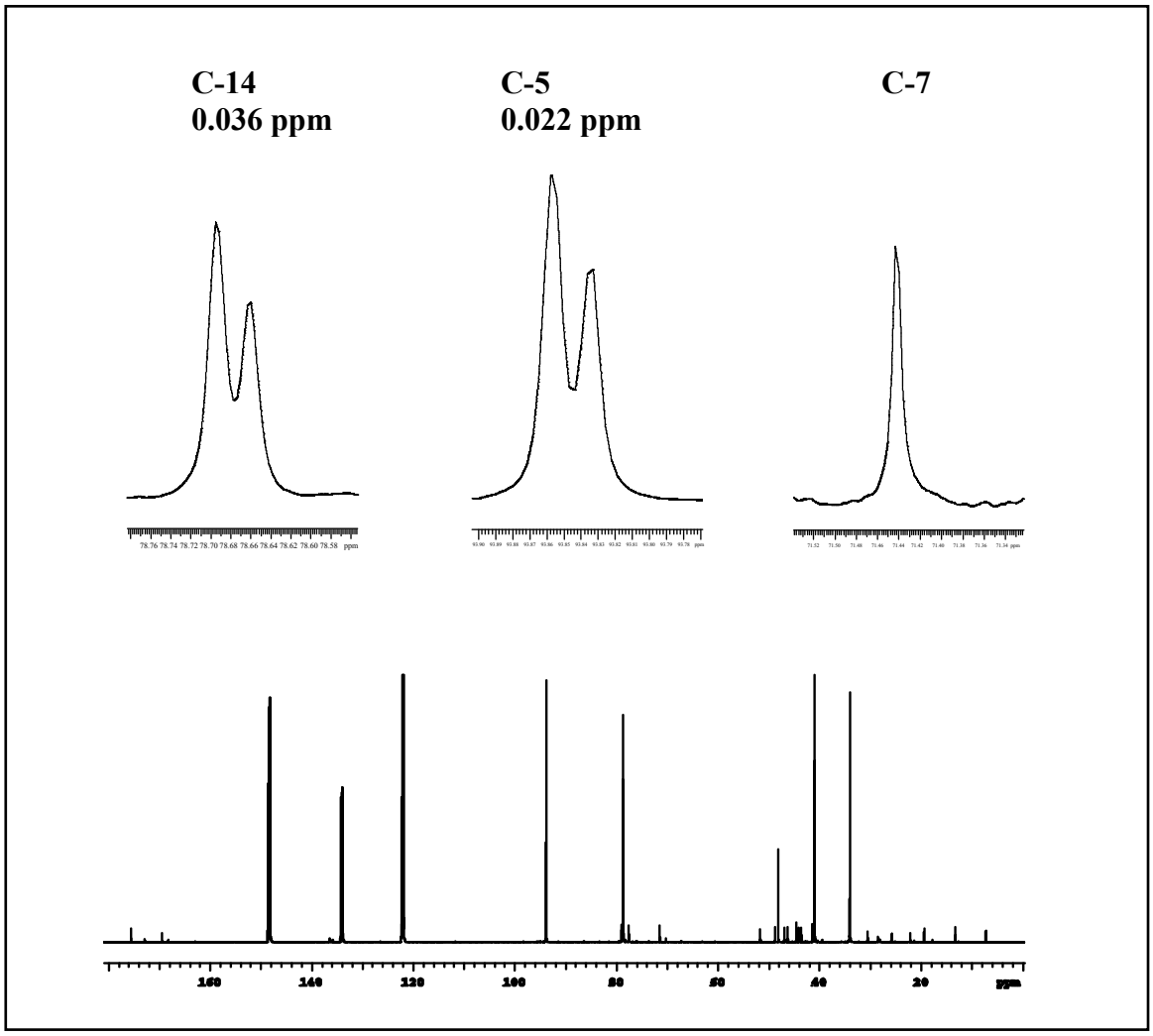
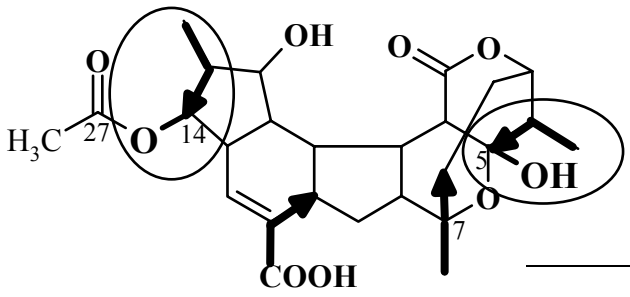


Abbildung 39: ^{13}C- und ^{18}O-Einbau in Hexacyclinsäure (**6**) nach Fütterung von [1-^{13}C, $^{18}O_2$]Propionat. (Sämtliche Einbauraten: siehe Anhang)



Position	Einbau ^{13}C (%)	$^{18}O/^{16}O$ (%)
C-5	31.9	70.1
C-10	25.5	/
C-14	32.7	71.3
C-22	22.8	/

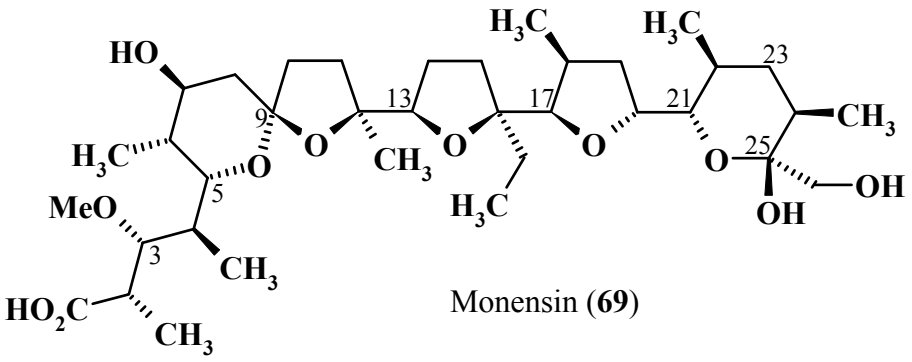
Abbildung 39 (Fortsetzung)

Zum einen bleibt das Sauerstoffatom an C-14 erhalten (0.036 ppm), die Relevanz dieses Befundes wird bei der Vorstellung eines hypothetischen Biosyntheseweges in Kapitel 4.6 eingehender erläutert. Zum anderen zeigt C-5 eine ^{18}O-Markierung (0.022 ppm), nicht aber C-7. Dem entsprechend könnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass das aus Propionat stammende Sauerstoffatom an C-5 anstatt in den Ring des cyclischen Halbketals eingebaut zu sein als freie Hydroxyl-Gruppe vorliegt. Diese Argumentation ist aber so nicht haltbar, da C-27, das von dem ^{18}O-Effekt von C-14 beeinflusst werden sollte, ebenfalls keine eindeutige Aussage zulässt. Zwar beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass C-27 über ein ^{18}O-Atom an das Grundgerüst gebunden ist etwa 23.3 %*, aber zusätzlich treten $^{2}J_{CC}$-Kopplungen auf, die die Signalintensität erheblich herabsenken. Das mögliche [^{13}C-^{18}O]-Signal von C-27 ist dementsprechend nicht aussagekräftig genug.

Durch alternative Messung von ^{13}C-NMR-Spektren in Methanol und Aceton konnte bewiesen werden, dass sich die Größe der Isotopenshifts nicht lösungsmittelabhängig verändert. Dadurch ist der Vergleich mit entsprechenden Daten aus der Literatur möglich. Eine gute Vergleichsmöglichkeit bietet das Monensin (**69**), das ebenfalls ein Halbketal aufweist und zu dem entsprechende Daten bekannt sind[124,125,126,127]. Aus ^{18}O-Markierungsexperimenten mit

* Bei einer Einbaurate von 32.7 % in C-14 und einem $^{18}O/^{16}O$-Verhältnis von 71.3 %.

Acetat und Propionat sowie $^{18}O_2$ erhielten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander annähernd gleiche Werte (Abb. 40).



Monensin (**69**)

C-Atom	[1-^{13}C, $^{18}O_2$]-Acetat (ppm)	[1-^{13}C, $^{18}O_2$]-Propionat (ppm)	[$^{18}O_2$]-Atmosphäre (ppm)
C-5	/	0.03	/
C-9	0.03	/	/
C-12	/	/	/
C-21	/	/	0.029
C-25	0.02	/	0.029

Abbildung 40: ^{18}O-Markierungsmuster einiger Kohlenstoffatome des Monensins

Auch in den oben vorgestellten Arbeiten wurde beobachtet, dass ^{18}O-Isotopen-Effekte bei Vorläuferfütterungen nicht auf die benachbarten C-Atome übertragen wird. So zum Beispiel bei der ^{18}O-markierten Acetat-Fütterung, die zwar zu einer Isotopie-Verschiebung an C-9, nicht aber an C-12 führte.

Cane und Mitarbeiter konnten durch chemischen Abbau und Oxidation beweisen, dass das über Acetat eingebaute Sauerstoffatom im Monensin als freie OH-Gruppe vorliegt und dass diese einen Verschiebungseffekt von 0.02 ppm in C-25 verursacht[124]. Durch Kultivierung unter [$^{18}O_2$]-Atmosphäre konnte hingegen der Einbau von ^{18}O in den Ring des Halbketals erreicht werden. Der Isotopie-Effekt bewirkt dann sowohl an C-21 als auch an C-25 eine Verschiebung von 0.029 ppm.

Im Falle der Hexacyclinsäure liegt die ^{18}O-Verschiebung an C-5 mit 0.022 ppm in der Größenordnung des Effektes, der beim Monensin von der freien Hydroxylgruppe

hervorgerufen wird. Dies bestätigt die Vermutung, dass das aus der Propionateinheit kommende ^{18}O-Atom nicht in den Ring integriert wird.
Eine Hetero-Diels-Alder-Reaktion, bei der das Propionat-Sauerstoffatom von C-5 in das Ringsystem eingebaut werden müsste, kann somit eindeutig ausgeschlossen werden, da in diesem Fall der Isotopie-Effekt an C-5 deutlich größer hätte ausfallen müssen. Zumindest für die Hexacyclinsäure kann Sørensens Biosynthesevorschlag also nicht zutreffen.

4.4.3 Scrambling in der Biosynthese

Je nach Menge des zugefütterten Propionats können immer wieder schwache Anreicherungen anderer Kohlenstoffatome beobachtet werden, die nachweislich aus Acetat-Einheiten stammen. Dieses Phänomen wurde schon früher bei Experimenten am Kendomycin[128] und Manumycin A[129] beobachtet und ist auf eine Metabolisierung des Propionats im Zitronensäure-Cyclus zurückzuführen. Propionat wird dabei in Acetat umgewandelt[128]. Eine Möglichkeit zur Minimierung dieses „Scramblings“ ist die Verringerung der gefütterten Substanzmenge.
Im Falle der [1-^{13}C, $^{18}O_2$]Propionat-Fütterung beispielsweise konnten zusätzlich zu den vier ^{13}C-Anreicherungen des Propionats noch sieben deutlich schwächere Markierungen beobachtet werden, deren Ursprung im C-1 von Acetatgruppen liegt. Dies führte aufgrund von $^{2}J_{CC}$-Kopplungen zu einem komplizierteren NMR-Spektrum.

4.5 Weitere Fütterungsexperimente

4.5.1 Fütterung von deuteriertem Acetat

Zur weiteren Analyse der Cyclisierungsmechanismen in der Biosynthese von Hexacyclinsäure schien eine Fütterung von deuteriertem [$^{2}H_3$]Acetat sinnvoll. Deuteriumatome haben in NMR-Experimenten eine andere Resonanzfrequenz als Wasserstoffatome. Dadurch bewirkt eine Substitution von ^{1}H durch ^{2}H das Wegfallen des jeweiligen Signals im Protonen-NMR-Spektrum, bzw. bei nicht-vollständigem Austausch eine Abschwächung der Signalintensität.

Da Deuterium-Kopplungen zu ^{1}H sehr klein sind, werden die mit ^{2}H koppelnden Protonen nur geringfügig verbreitert. Im ^{13}C-NMR-Spektrum führen die Isotopie-Effekte hingegen ähnlich wie bei ^{18}O-Isotopen zu einer Hochfeldverschiebung des ursprünglichen Signals[130,131]. Die Größe dieses Shifts beträgt etwa 0.3 ppm je substituiertem Proton, die verschobenen Signale sind somit wesentlich besser separiert als im ^{18}O-Experiment. Zusätzlich führt die Kohlenstoff-Deuterium-Kopplung aufgrund einer Spinquantenzahl von 1 im Falle des Deuteriums zu einer Erhöhung der Multiplizität des Kohlenstoffsignals.

Neben der Analyse von deuterierten Substanzen mit Deuterium-NMR können auch die Massenspektren herangezogen werden. Es muss allerdings beachtet werden, dass bei Deuterium-Atomen in aciden Positionen stets die Gefahr des Austauschs gegen Protonen aus Wasser oder einem Lösungsmittel besteht.

Für den Fall, dass der in Kapitel 4.6 postulierte Biosyntheseweg beschritten wird, sollte der Einbau von deuteriertem Acetat zu folgendem Markierungsmuster führen.

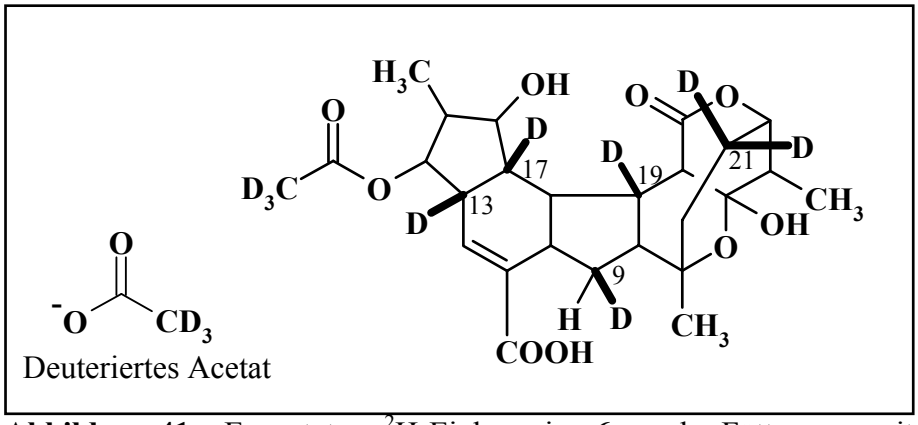


Abbildung 41: Erwarteter ^{2}H-Einbau in **6** nach Fütterung mit [$^{2}H_3$]Acetat

Von den drei Deuterium-Atomen des Vorläufers müsste bei der Kettenverlängerung jeweils eins ersetzt werden. Von den verbleibenden zwei Deuterium-Atomen sollten in den Positionen C-9, C-13, C-17 und C-19 jeweils eines und in der Position C-21 zwei übrig bleiben.

In Fütterungsexperimenten mit [$^{2}H_3$]Acetat wurde Hexacyclinsäure nur in Ausbeuten von maximal 0.2 mg/L produziert. Die erhaltene Menge reichte für eine Auswertung der NMR-Spektren nicht aus, so dass die Wiederholung dieser Fütterungen zukünftigen Arbeiten vorbehalten bleibt.

4.5.2 Kultivierung des Stammes S 1013 unter [$^{18}O_2$]-Atmosphäre

Für die Aufklärung der Biosynthese ist des Weiteren der Ursprung der nicht über Acetat oder Propionat eingeführten Sauerstoffatome interessant. Die Carboxylgruppe in **6** wird durch Oxidation einer Methylgruppe gebildet, die beiden O-Atome müssen demnach aus Luftsauerstoff stammen. Dies lässt sich experimentell durch eine Kultivierung unter [$^{18}O_2$]-Atmosphäre nachweisen. Wie auch bei der Fütterung ^{18}O-markierter Vorläufer würden die eingeführten Isotope eine Verschiebung des entsprechenden Kohlenstoffsignals im ^{13}C-NMR-Spektrum bewirken.

Der Stamm S 1013 wurde dazu in einer geschlossenen Apparatur in acht 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen kultiviert. Alle anderen Fermentationsparameter blieben gleich den unter Standardbedingungen genutzten. Aufgrund anderer Belüftungsverhältnisse in der geschlossenen Apparatur wurde zunächst eine Wachstumskurve aufgenommen, um den Beginn der Hexacyclinsäure-Produktion zu bestimmen. Als optimaler Zeitpunkt, die Atmosphäre in der Apparatur gegen ein $^{18}O_2/N_2$-Gemisch auszutauschen wurde die 80. Stunde ermittelt. In Probeexperimenten mit unmarkiertem Sauerstoff konnte eine ausreichende Produktion von bis zu 2.8 mg/L erreicht werden. Bei Fermentation unter [$^{18}O_2$]-Atmosphäre wurde Hexacyclinsäure jedoch nicht in ausreichenden Mengen gebildet.

4.6 Hypothetischer Biosyntheseweg der Hexacyclinsäure

Die genannten Fütterungsexperimente belegen die Biogenese aller Atome der Hexacyclinsäure (**6**), ausgenommen die Sauerstoffatome der Carboxylgruppe (C-25) und O-6 des Halbketals. Als Polyketid wird **6** von einer Polyketidsynthase des Typs I aus sieben Acetat- und vier Propionat-Einheiten aufgebaut. Im Folgenden soll ein möglicher Biosyntheseweg der Hexacyclinsäure präsentiert werden. Allerdings kann in Bezug auf verschiedene Fragestellungen nur spekuliert werden.

Geht man davon aus, dass **6** und FR182877 (**45**) über eine Diels-Alder-Reaktion aufgebaut werden, lässt sich die Stereoisomerie ihrer Grundgerüste durch das Beschreiten verschiedener Übergangszustände erklären (vgl. Kapitel 4.1.4).

Wie unter 4.1.3 beschrieben neigen entsprechende Diels-Alder-kompatible Systeme dazu, intramolekular zu cyclisieren. Würde das PKS-Produkt (**61**, Abb. 42) nach Ablösen vom Enzym durch Bildung des Lactonringes selbständig cyclisieren, müßte ein Isomerengemisch

entstehen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass bei der Cyclisierung in irgendeiner Weise ein steuernder enzymatischer Einfluss vorhanden ist. Möglich wäre, dass die Diels-Alder-Reaktion ähnlich wie beim Lovastatin (**52**)[108,109] bereits während der noch laufenden Polyketid-Synthese stattfindet, z.B. auf der Stufe des Hexaketids. Alternativ könnte auch ein spezielles Enzym, eine Diels-Alderase, für die Cyclisierung verantwortlich sein.
Im Folgenden wird die Biosynthese unter der Annahme diskutiert, dass die Polyketidsynthase zusätzlich eine entsprechende Steuerungsfunktion übernimmt, da es bislang kein Beispiel für eine separate Diels-Alderase gibt.

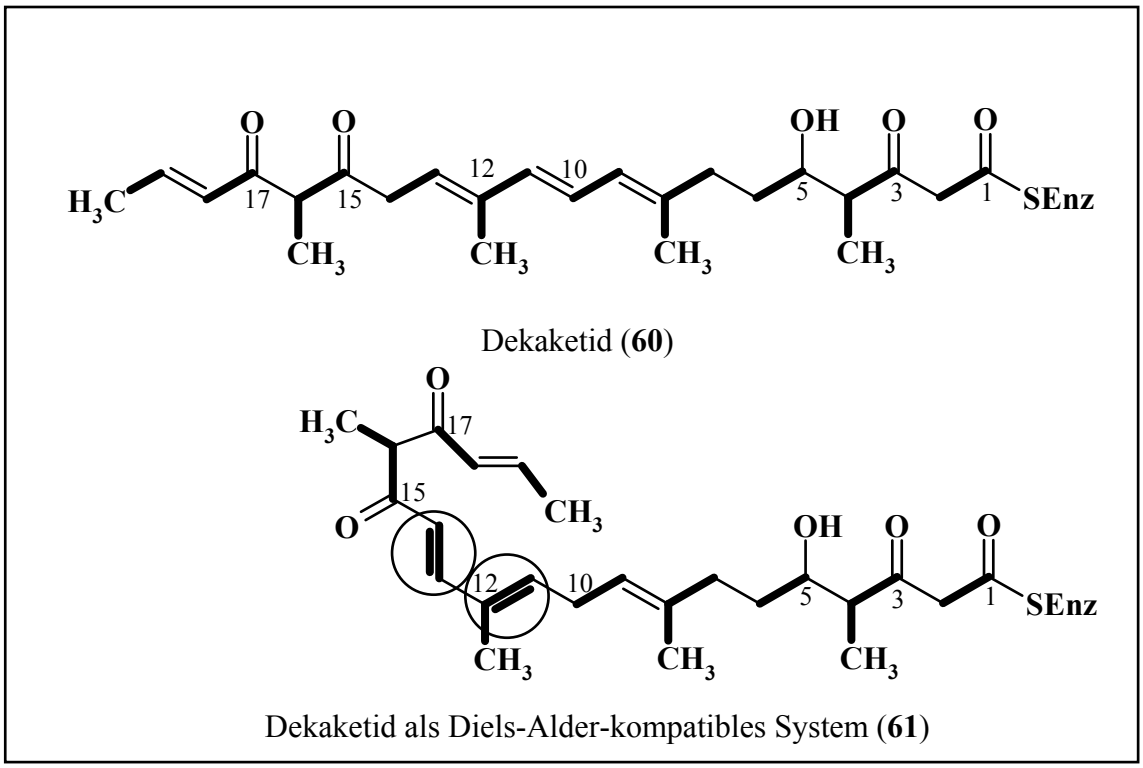


Abbildung 42: Dekaketid in linearer Form (**60**) und gefaltet als potentielles Diels-Alder-Edukt (**61**). Die Nummerierungen der Kohlenstoffatome entsprechen nicht denen von **6**

Abb. 42 zeigt ein lineares Dekaketid (**60**), das während der Biosynthese der Hexacyclinsäure gebildet werden könnte. Laut Fütterungsexperimenten mit ^{18}O-markierten Verbindungen verbleiben die Sauerstoffatome an den Positionen* C-1, C-3, C-5, C-15 und C-17 im Molekül. Alle Doppelbindungen in **60** werden als in der trans-Form vorliegend angenommen, da eine cis-Konfiguration im primären PKS-Produkt, wenn auch bereits des Öfteren diskutiert[132], bisher nicht bekannt ist. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind die Doppelbindungen zwischen den einzelnen Bausteinen lokalisiert, direkt „auf" einer Einheit gebildete sind in der Literatur bisher selten beschrieben worden[133].

* Die Nummerierung der Kohlenstoffatome entspricht nicht der der Hexacyclinsäure.

Von den vier Doppelbindungen des Dekaketids würden drei für eine Diels-Alder-Reaktion benötigt werden, zwei von ihnen (C-10/C-11 und C-12/C-13) haben in **60** jedoch nicht die dafür erforderliche Position. Ein Vergleich mit dem ebenfalls in Abb. 42 dargestellten Dien-/Dienophil-System **61** verdeutlicht dies.

Zum Aufbau der erforderlichen Dien-/Dienophil-Struktur ist die Verschiebung der Doppelbindungen von den Positionen C-10/C-11 und C-12/C-13 nach C-11/C-12 bzw. C-13/C-14 notwendig. Diese Umlagerung wäre allerdings auf der Stufe eines Hexaketids (**62**) wahrscheinlicher als im Dekaketid.

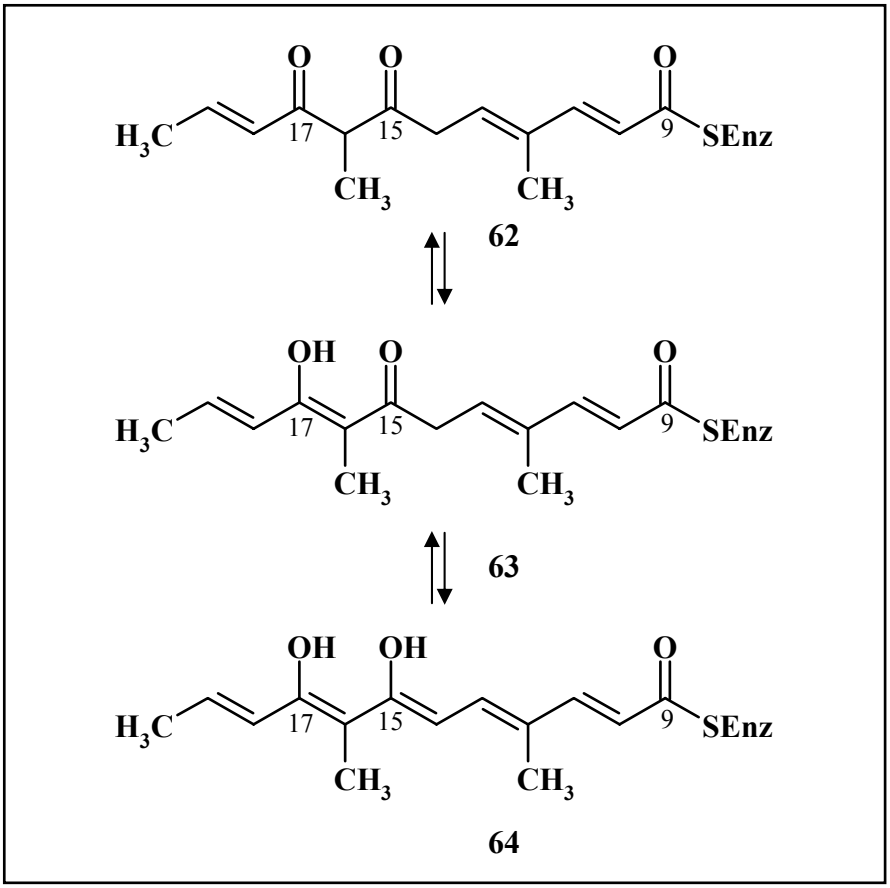


Abbildung 43: Keto-Enol-Tautomerie am Hexaketid **62**

Aufgrund der zwei α-ständigen Carbonylgruppen ist 16-H acide, was dazu führt, dass **62** als Enol vorliegt (s. Abb. 43). Eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert diesen Zustand. Aus der Enolform des Ketons an C-17 heraus kann sich das System (**63**) über eine zweite Keto-Enol-Tautomerie ins konjugierte Pentaen umwandeln, das im Hexaketid (**64**) durch die α-Stellung zur Carbonylgruppe an C-9 zusätzlich stabilisiert wird.

In dieser Form ist eine säurekatalysierte Umlagerung der Bindungen am Enzym, wie in Abb. 44 gezeigt, denkbar. Das für eine Säurekatalyse benötigte Proton könnte von einer sauren

Aminosäure des Enzyms, z.B. Glutaminsäure oder Asparaginsäure, bereitgestellt werden. Es bildet sich das Keton an C-15 zurück, die verschobenen Doppelbindungen liegen jetzt auf den Polyketidbausteinen.

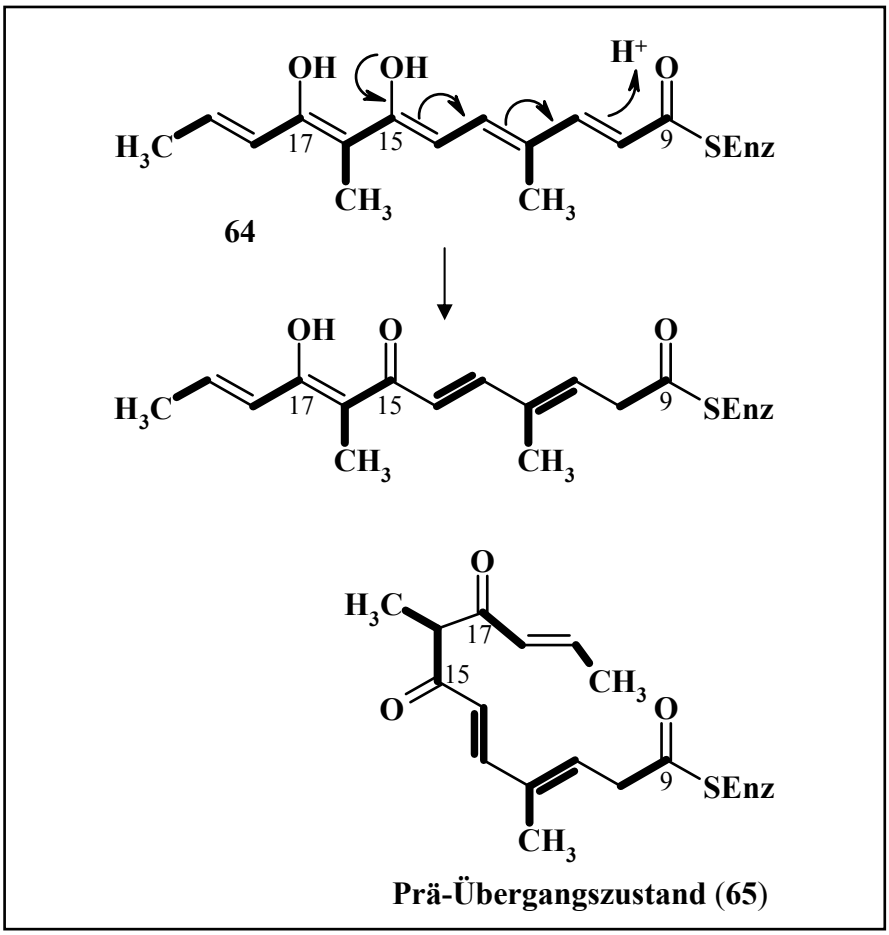


Abbildung 44: Doppelbindungsverschiebung am Hexaketid (**64**)

In einer für die Diels-Alder-Reaktion vorgefalteten Struktur ist die Stabilisierung des β-Keto-Enols durch eine Wasserstoffbrückenbindung aus sterischen Gründen nicht mehr möglich. Ob in der folgenden Diels-Alder-Reaktion das Keton oder sein Enol vorliegt, ist aber unerheblich.

Auf der Stufe des Hexaketids könnten Dien und Dienophil am Enzym in einen Prä-Übergangszustand (**65**) überführt werden, aus dem heraus die Cyclisierung stattfindet. Diese „Vorfaltung" müsste bei der Biosynthese der Hexacyclinsäure anders ausfallen als beim Metaboliten FR182877.

Das Hexaketid **65** kann nun aus der Vorfaltung am Enzym heraus einen *endo-E*-syn-Übergangszustand durchlaufen und zum bicyclischen Diels-Alder-Produkt reagieren (s. Abb. 45, S. 76).

Für die folgende C-C-Bindungsknüpfung von C-2 an C-20 wird an der endständigen Methylgruppe (C-20) eine Aktivierung in Form eines Aldehyds benötigt. Da Cytochrom-P_{450}-abhängige Oxidasen erst nach dem Ablösen vom Enzym, also als Post-PKS Enzyme wirken können, muss zunächst die Polyketidsynthese bis zum Dekaketid abgeschlossen sein (s. Abb. 45). Durch Bildung des Lactonringes zwischen C-1 und der Hydroxylgruppe an C-5 wird **66** abgelöst. Eine Oxidation der endständigen Methylgruppe nach erfolgter Diels-Alder-Reaktion wird in ähnlicher Weise bei der Biosynthese des Cochleamycin A (**50**) vermutet[134].

Durch die beiden α-ständigen Ketogruppen ist das Kohlenstoffatom C-2 methylenaktiv und kann den zuvor durch Oxidation gebildeten Aldehyd (C-20) in einer Knoevenagel-ähnlichen Reaktion nucleophil angreifen. Es entsteht dabei eine Alkyliden-Dicarbonyl-Verbindung (**67**) ähnlich der von Sørensen *et al.* diskutierten[96,97].

Die von ihm für den nächsten Biosyntheseschritt vorgeschlagene Hetero-Diels-Alder-Reaktion kann für die Hexacyclinsäure aufgrund der ^{18}O-Markierungsexperimente ausgeschlossen werden. In Abb. 45 wird ein alternativer Mechanismus vorgeschlagen. C-20 besitzt aufgrund der beiden elektronenziehenden α-ständigen Ketogruppen eine geringe Elektronendichte, ein nucleophiler Angriff auf diese Position bietet sich daher an. Dies könnte durch den Angriff eines Wassermoleküls auf C-8 eingeleitet werden. Im Zuge einer Michael-ähnlichen Reaktion erfolgt eine C-C-Bindungsknüpfung zwischen C-9 und C-20 unter Bildung des Ringes D. Das aus dem Wasser freigesetzte Proton kann in der kaskadenartigen Reaktion durch die Umwandlung des Ketons an C-3 in sein Enol abgefangen werden. Die Rück-Tautomerisierung zum Keton ermöglicht dann durch nucleophilen Angriff der an C-8 eingeführten OH-Gruppe die Bildung des Halbketals. Abschließende Modifizierungen sind die Reduktionen der Ketone C-15 und C-17 zu Hydroxylgruppen, die Acetylierung der Position C-15 sowie die Oxidation der an C-12 gebundenen Methylgruppe zur Carbonsäure.

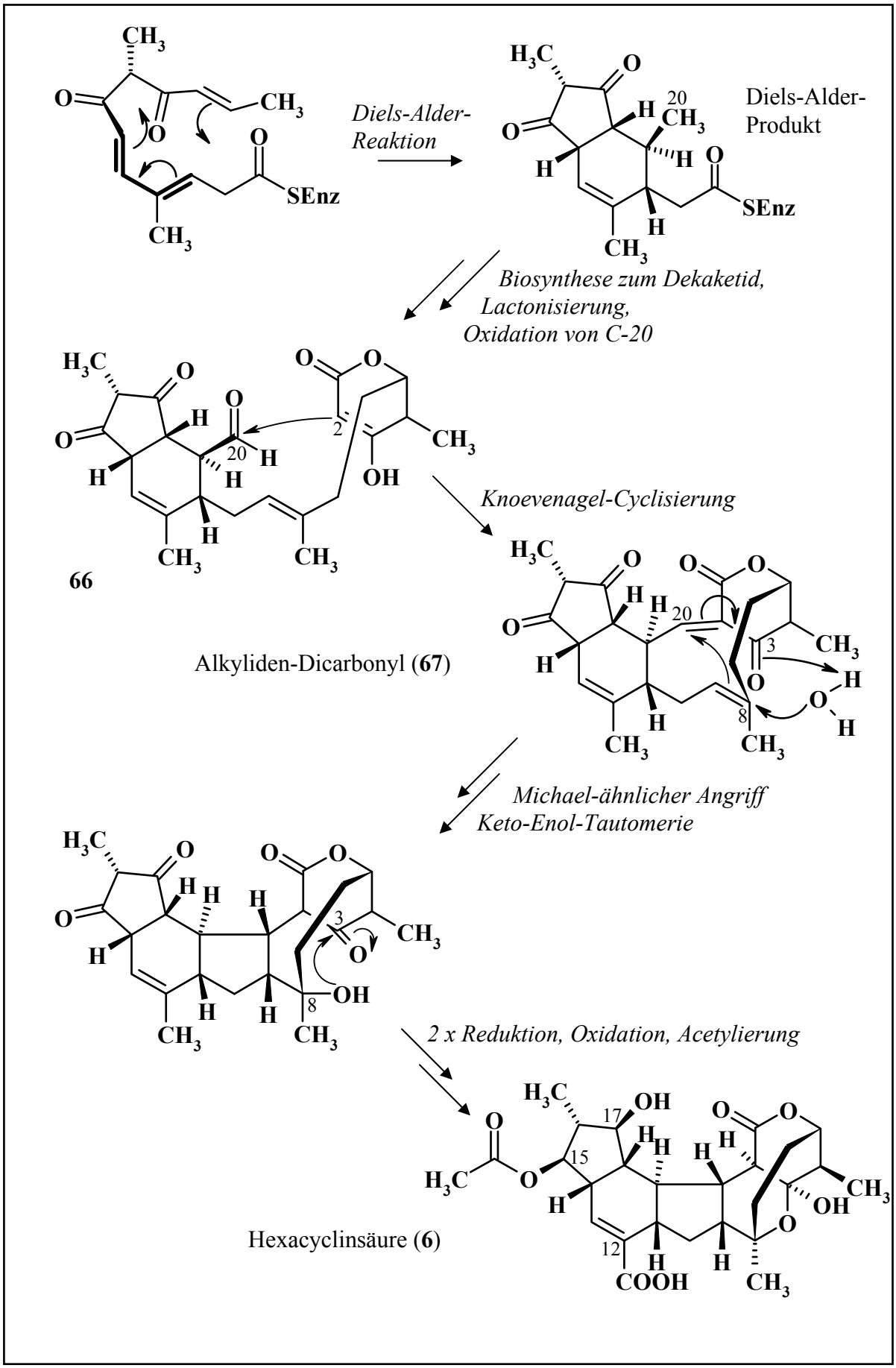


Abbildung 45: Hypothetischer Biosyntheseweg zur Hexacyclinsäure

Sollten Hexacyclinsäure (**6**) und FR182877 (**45**) bis zur Stufe des Halbketals einer vergleichbaren Biosynthese unterliegen, so wäre ein Analogon der Hexacyclinsäure möglicherweise ein Vorläufer von **45**, da zur Dehydratisierung des Halbketals ein erneuter enzymatischer Schritt notwendig ist. Es wäre also durchaus denkbar, dass von der Hexacyclinsäure zunächst eine dehydratisierte Form entsteht, die in der Kulturbrühe oder bei der Aufarbeitung Wasser addiert.

Diese Möglichkeit war Anlaß für den Versuch, mittels HPLC-MS dehydratisierte Hexacyclinsäure-Derivate zu identifizieren. Diese Überlegung ist insofern interessant, da Hexacyclinsäure im Vergleich zu FR182877 nicht antimitotisch aktiv ist, genauso wie das ohne reaktive Doppelbindung vorliegende Cochleamycin B im Vergleich zu Cochleamycin A (**50**) keine cytotoxische Wirkung zeigt. Die Vermutung, dass die Doppelbindung für die Wirksamkeit der Substanzen essentiell ist, liegt somit nahe.

Aufgrund der höheren Empfindlichkeit von Massenspektrometern können Substanzen anhand ihrer Molekulargewichte detektiert werden, die wegen zu geringer Mengen mittels HPLC oder Dünnschichtchromatographie noch nicht sichtbar gemacht werden können. Abb. 79 zeigt verschiedene Ansätze zur Suche nach biosynthetischen Vorläufermolekülen von **6**.

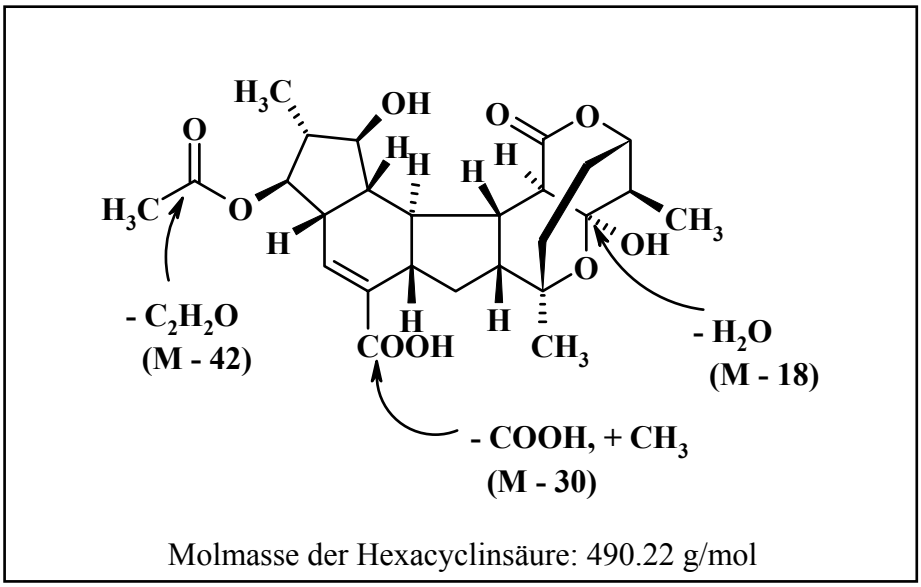
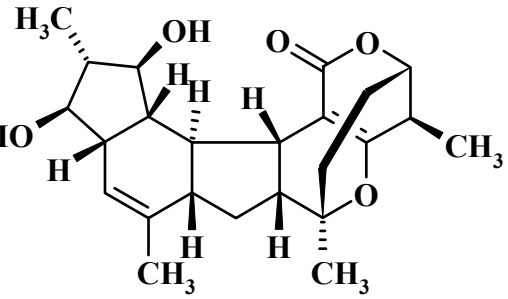


Abbildung 79: Massendifferenzen von Hexacyclinsäure zu potentiellen Vorläufern

Die formelle Dehydratisierung der Hexacyclinsäure (Molmasse 490.22 g/mol) würde beispielsweise zu einer Massendifferenz von 18 g/mol im Vergleich zur Ausgangssubstanz führen. Dementsprechend wurden Rohextrakte verschiedener Kultivierungen und Erntezeitpunkte nach den Molmassen 472, 448 und 460 g/mol sowie verschiedenen Kombinationen der genannten Möglichkeiten untersucht.

Ein Signal bei m/z = 399 trat wiederholt auf, was bei einem $[M-H]^+$-Peak im negativen ESI-Mode der Molmassevon 400 g/mol entspricht. Dies könnte möglicherweise ein Vorläufer der Hexacyclinsäure sein, der nicht acetyliert, nicht zur Carbonsäure oxidiert und zusätzlich dehydratisiert vorliegt, also ein FR182877-Analogon (**68**) wäre. Im HPLC-Diagramm lässt sich der Masse allerdings kein Signal zuordnen. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass der entsprechende Metabolit in nicht-isolierbaren Mengen vorliegt.

68



4.7 Chemische Modifikation der Hexacyclinsäure

In früheren Arbeiten zeigte sich die Hexacyclinsäure (**6**) erstaunlich resistent gegenüber äußeren Einwirkungen und chemischer Beeinflussung[82]. Sie ist in gebräuchlichen Lösungsmitteln lange Zeit beständig, zeigt keinerlei Empfindlichkeit gegenüber Lichteinwirkung und ist für längere Zeit bei 60 °C temperaturstabil. Verdünnte Säuren und Basen bewirken keine Zersetzung von **6**.

Während der Sinn von Stabilitätstests darin liegt, neue Naturstoffe so handhaben zu können, dass sie sich während der Arbeit nicht zersetzen, sind Derivatisierungsversuche darauf ausgerichtet, Derivate mit besserer biologischer Wirkung zu erhalten.

In früheren Arbeiten wurden an der Hexacyclinsäure verschiedene Versuche zur Modifizierung durchgeführt. Der Zusatz von oxidierenden Reagenzien führte ebenso wenig zum Erfolg wie der Versuch einer Epoxidierung. Mit verschiedenen Reagenzien kann dagegen die Veresterung zum Methylester erreicht werden[71,82]. Reaktion mit 2 M wasserfreier methanolischer Salzsäure ermöglichte eine definierte Umsetzung zu 14-Desacetoxy-14-hydroxy-hexacyclinsäure-methylester sowie 14-Desacetoxy-14-hydroxy-5-*O*-methyl-hexacyclinsäure-methylester[82].

Das Hauptanliegen der strukturellen Modifikationen von **6** war es, mit einfachen chemischen Methoden Derivate mit einer biologischen Aktivität vergleichbar mit der des verwandten

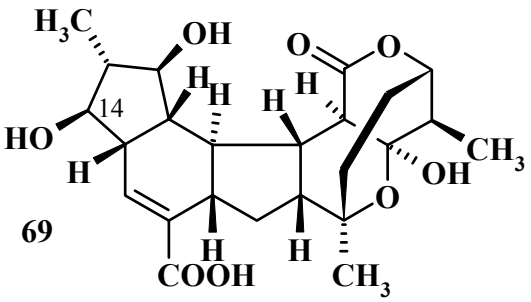
Metaboliten FR182877 (**45**) zu erhalten. Da die Doppelbindung als essentielles pharmakophores Strukturelement von FR182877 und Cochleamycin A vermutet wird, lag das Hauptaugenmerk auf dem Versuch, auch in der Hexacyclinsäure eine Doppelbindung zwischen den Ringen A und C einzuführen. Das entstandene System wäre aufgrund des starren Grundgerüstes stark gespannt und zusätzlich durch eine α-ständige Carbonylgruppe aktiviert, was an der Reaktivität von **45** erkennbar ist.

Um in Hexacyclinsäure (**6**) eine Doppelbindung einzuführen, wurden mehrere Ansätze verfolgt. Standardreagenzien zur Dehydratisierung wie z.B. Mesylchlorid/Triethylamin und p-Toluolsulfonsäurechlorid hatten keinerlei Einfluss auf **6**. Auch durch Zusatz von stark wasserziehenden Substanzen wie P_4O_{10} oder Schwefelsäure erfolgte kein Umsatz bzw. die Hexacyclinsäure zersetzte sich undefiniert.

4.7.1 Umsetzung mit methanolischer Natronlauge

Analog zur Derivatisierung von Hexacyclinsäure (**6**) mit methanolischer Salzsäure[82] wurde die Umsetzung mit wasserfreier methanolischer Natronlauge durchgeführt. Es konnte durch Chromatographie an Kieselgel und Sephadex LH-20 ein Produkt in Ausbeuten von 35 % erhalten werden.

Das Protonenspektrum des Produktes zeigt im Vergleich zum Edukt **6** nicht das charakteristische Methylgruppensignal der Acetylgruppe bei $\delta_H = 2.06$, was auf eine Verseifung der Acetylgruppe hinweist. Der Rest des Moleküls bleibt strukturell unverändert. Dieser Befund steht im Einklang mit der per ESI-MS ermittelten Molmasse von 448 g/mol. Über 2D-NMR-Spektren konnte die Struktur von **69** als 14-Desacetyl-hexacyclinsäure zusätzlich abgesichert werden.



69

Diese Reaktion zeigt einmal mehr die ungewöhnlich hohe Stabilität des Lactonrings gegenüber Säuren und Basen. Weder 2 M Salzsäure noch 2 M Natronlauge in Methanol führen zur Ringöffnung.

4.7.2 Umsetzung mit p-Toluolsulfonsäure

Mit p-Toluolsulfonsäure reagierte Hexacyclinsäure (**6**) in Dichlormethan langsam zu einem definierten Produkt. Nach vier Tagen wurde die Reaktion abgebrochen und die hydrophilere Substanz **69** durch Chromatographie an Kieselgel und Sephadex LH-20 in Ausbeuten von 10 % von nicht umgesetzter Hexacyclinsäure abgetrennt.

Durch den Massenvergleich mit Hexacyclinsäure anhand eines ESI-Massenspektrums wurde ein Unterschied im Molekulargewicht von 42 g/mol ermittelt. Im ^{1}H-NMR-Spektrum fehlt das charakteristische Methylsignal der Acetylgruppe bei $\delta_H = 2.06$, was auf deren Abspaltung hinweist. Durch Vergleich der spektralen Daten mit dem bereits durch Einsatz von 2 M methanolischer Base erhaltenen Derivat (**69**) konnte die Verbindung als 14-Desacetyl-hexacyclinsäure identifiziert werden.

Durch die sauren Bedingungen während der Reaktion wird die Acetoxygruppe langsam hydrolysiert, die eigentlich erhoffte Dehydratisierung findet nicht statt. Da mit verdünnter Salzsäure keine analoge Umsetzung zu beobachten war[82], ist dieses Ergebnis überraschend.

4.7.3 Acetylierung

Die Acetylierung mit Acetanhydrid unter Standardreaktionsbedingungen führte zu Produktgemischen, die sich nicht auftrennen ließen. In der Hoffnung, durch Verlängerung der Reaktionsdauer ein einheitliches Produkt zu erhalten, wurde die Reaktion über den Standardzeitraum hinaus fortgeführt. Nach 3 Tagen konnte im Dünnschichtchromatogramm die Umsetzung zu einem Hauptprodukt festgestellt werden. Chromatographie an Kieselgel und Sephadex LH-20 führten mit einer Ausbeute von 35 % zu **70**.

Das Massenspektrum der Reinsubstanz zeigt eine Differenz zur Hexacyclinsäure von - 18 g/mol. Dieser Wert deutet auf eine Wasserabspaltung hin. Im ^{1}H-NMR-Spektrum kann im Vergleich zur Hexacyclinsäure (**6**) ein in den olefinischen Bereich verschobenes Signal

(δ_H = 5.72) beobachtet werden. Das ^{13}C-Spektrum zeigt zwei olefinische Kohlenstoffatome (δ_C = 141.5 und δ_C = 135.5), eins der beiden erweist sich im APT-Spektrum als quartär:

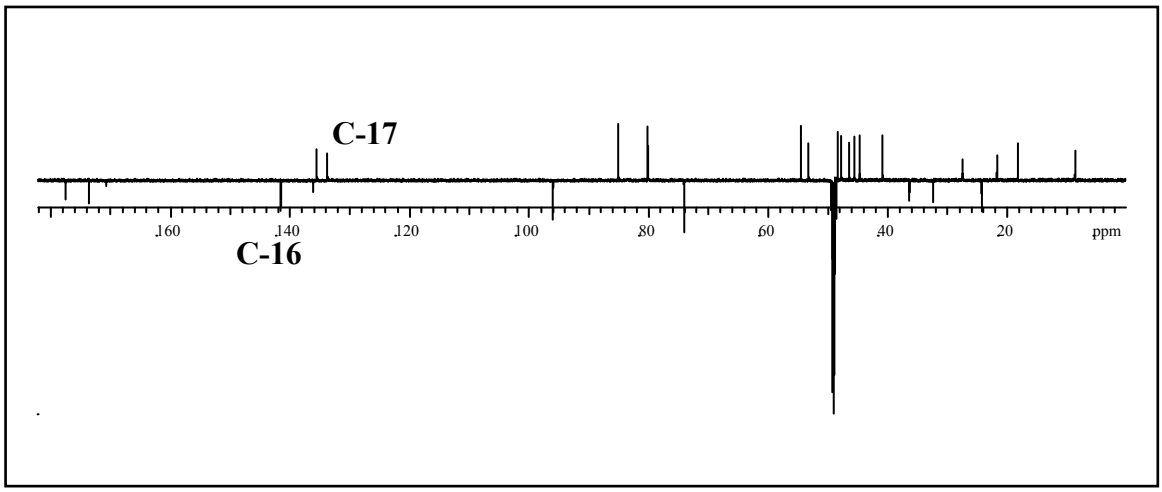
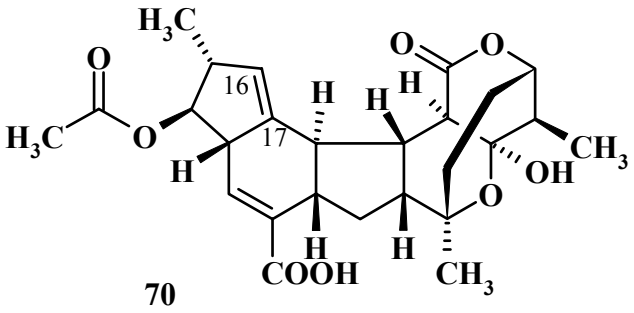


Abbildung 47: APT-Spektrum von **70**

Durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie konnte die Position der Doppelbindung zwischen C-16 und C-17 eindeutig bestätigt werden. Das Derivat ist dem entsprechend 16,17-Anhydrohexacyclinsäure (**70**).



70

Unter den gewählten Reaktionsbedingungen wird Wasser abgespalten. Ob dabei erst acetyliert und dann Essigsäure eliminiert wird, muß offen bleiben. Da 17-H in **6** nicht acide ist und in **70** keine konjugierte Doppelbindung entstanden ist, kann die Regioselektivität der Reaktion nicht erklärt werden. Auch bleibt unklar, warum nicht die Acetylgruppe an C-14 in dergleichen Weise eliminiert wird. Da das Edukt Hexacyclinsäure in Pyridin stabil ist, kann das Lösungsmittel nicht das auslösende Reagenz sein.

4.7.4 Diskussion der chemischen Reaktivität

Durch chemische Reaktionen konnten zwei neue Derivate der Hexacyclinsäure erhalten werden, 14-Desacetyl-hexacyclinsäure (**69**) und 16,17-Anhydrohexacyclinsäure (**70**).
Die erstaunlich hohe Stabilität des Lactonringes gegenüber 2 M Salzsäure und 2 M Natronlauge ist im Zusammenhang mit einer biologischen Wirkung interessant. Sørensen und Mitarbeiter schlugen vor, dass das Brückenkopf-Olefin oder aber das δ-Lacton für die antimitotische Wirkung von FR182877 verantwortlich sein könnten[95]. In **6** ist die Stabilität des Lactonringes so groß, dass mit konzentrierter Säure oder Lauge keine Lactonspaltung bzw. Umesterung erreicht werden kann. Dass also das Lactongerüst für die beschriebene kovalente Bindung an eine Carboxylesterase verantwortlich ist, erscheint eher unwahrscheinlich.
Abb. 48 zeigt Reaktionsschemata der mit Hexacyclinsäure durchgeführten Reaktionen.

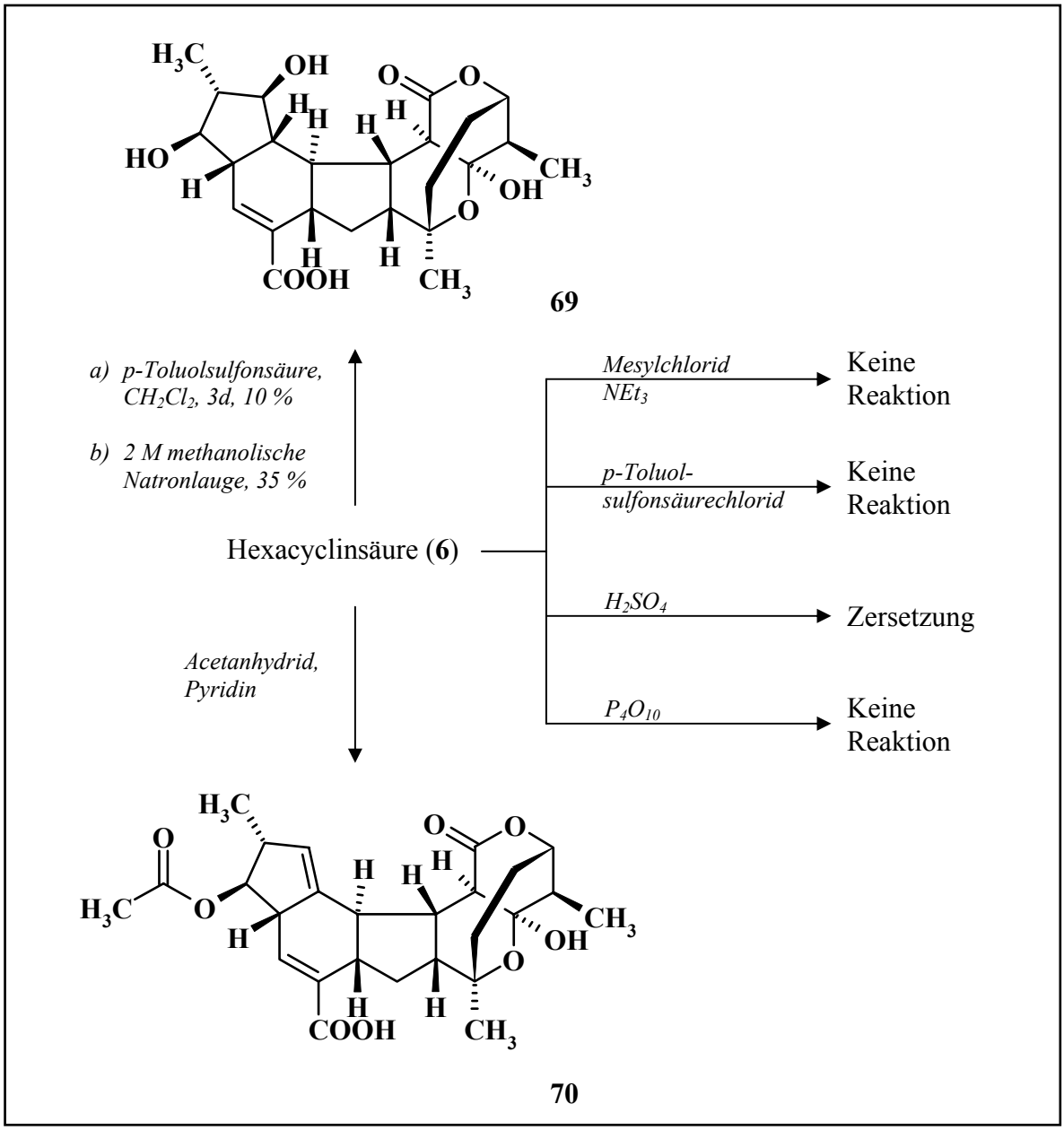


Abbildung 48: Allgemeines Reaktionsschema mit Ansätzen zur Derivatisierung der Hexacyclinsäure

4.8 Biologische Wirkungen der Metaboliten

In ersten Untersuchungen zur biologischen Aktivität wurden die aus dem Stamm S 1013 erhaltenen Metaboliten sowie die Hexacyclinsäure-Derivate in Plattendiffusionstests bezüglich ihrer Wirkungen gegen die Testkeime *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* getestet. Es konnte in keinem Fall eine Hemmung des Wachstums beobachtet werden.

4.9 Ausblick

Um weitere Untersuchungen zur Biosynthese der Hexacyclinsäure durchführen zu können, muß zunächst die Ursache der erneut auftretenden Produktionsprobleme des Stammes S 1013 behoben werden. Ein Ansatz zur Steigerung der Ausbeute von Hexacyclinsäure wäre möglicherweise die Mutagenese des Stammes, z.B. durch Bestrahlung mit UV-Licht[135]. In den Mutanten könnten inhibierende Faktoren ausgeschaltet oder das produzierende Gen mehrfach ins Genom integriert werden.

Eine Fütterung von [$^{13}C_3$]Propionat könnte die unklaren schwachen Einbaumuster im Ring E klären (s. Seite 64). Der intakte Einbau von Propionat-Einheiten lässt sich über Kopplungsmuster der entsprechenden Kohlenstoffatome nachweisen, im Falle einer möglichen Umlagerung gehen diese Kopplungen bei statistischer Zusammensetzung verloren.

Um den vorgeschlagenen Biosyntheseweg der Hexacyclinsäure weiter zu belegen ist die Fütterung von deuteriertem Acetat ein viel versprechender Ansatz. Neben diesen Zufütterungen steht eine erneute Kultivierung unter $^{18}O_2$-Atmosphäre aus, die den Ursprung der Sauerstoffatome an C-25 in **6** sichert.

Noch ungeklärt ist außerdem die Herkunft des Ringsauerstoffs des Halbketals, der möglicherweise aus Wasser stammt. Der Einbau von aus Wasser stammenden Sauerstoffatomen könnte durch eine Kultivierung in $H_2{}^{18}O$ bewiesen werden, was aufgrund des sehr hohen Preises für ^{18}O-markiertes Wasser aber nicht praktikabel ist.

Die Kultivierung unter Beimischung von Monooxygenase-Hemmern wie Ancymidol[136] könnte die Isolierung von Vorläufern ermöglichen. Die postulierte Cytochrom-P_{450}-abhängige Oxidation der endständigen Methylgruppe könnte nicht mehr erfolgen, was nach dem Ablösen vom Enzym zu einem Abbruch der Biosynthese und der Anreicherung von Zwischenprodukten führen sollte.

Durch Zusatz verschiedener Vorläufer wie Butyrat und iso-Butyrat zum Nährmedium könnte versucht werden, die möglicherweise geringe Selektivität der Acetyltransferase auszunutzen und den Stamm S 1013 zur Produktion neuer Hexacyclinsäure-Derivate zu animieren.

Eine weitere Möglichkeit, das Potential des Stammes S 1013 im Sinne des OSMAC auszutesten besteht darin, sub-inhibitorische Mengen eines Antibiotikums zuzusetzen. Davies und Mitarbeiter konnten zeigen, dass sich das Transkriptionsmuster von Bakterien unter Zusatz von geringen Mengen an Erythromycin oder Rifampicin ändert[137]. Der auf den Organismus ausgeübte Stress könnte zur Isolierung neuer Metaboliten führen.

Die Dehydratisierung zwischen Ring A und Ring C der Hexacyclinsäure ist weiterhin von großem Interesse, um an eine Wirkung ähnlich der von FR182877 heranzukommen. Ein möglicher Ansatz dazu wäre die Optimierung der Reaktionsbedingungen mit p-Toluolsulfonsäure.

Weitere Beiträge zur Biosynthese der Hexacyclinsäure sind zu erwarten, wenn es gelingt, den verantwortlichen Gencluster zu isolieren und heterolog zu exprimieren. Durch entsprechende molekularbiologische Untersuchungen, analog zum Lovastatin, könnte sich möglicherweise klären lassen, ob die Biosynthese über eine Diels-Alder-Reaktion abläuft und zu welchem Zeitpunkt diese stattfindet.

5. Chemisches Screening von Streptomycetenstämmen

Das chemische Screening von Streptomycetenstämmen ist ein Verfahren zur Suche nach neuen Sekundärmetaboliten und hat sich in der Vergangenheit vielfach bewährt[138]. Im Zuge der OSMAC-Methode (***O***ne ***S***train – ***Ma***ny ***C***ompounds) werden Streptomycetenstämme zunächst in vier verschiedenen Nährmedien kultiviert, um die Organismen durch unterschiedliche Versorgung mit Nährstoffen zur Produktion eines breiten Substanzspektrums anzuregen. Der Hintergrund dieses Ansatzes ist der noch weitgehend unerforschte Sekundärmetabolismus von Mikroorganismen.

Sekundärstoffe können aus verschiedenen Gründen gebildet werden. Ein Beispiel ist die Produktion von Siderophoren im Falle von Eisenmangel in der direkten Umgebung des Produzenten, aber auch so komplexe Vorgänge wie die Kommunikation untereinander oder die Abwehr von Konkurrenten werden von Sekundärmetaboliten übernommen[139].

Um das Potential von untersuchten Stämmen so weit es geht ausschöpfen zu können, ist es nötig, nicht nur die Nährstoffbedingungen, sondern auch die vielfältigsten Fermentationsparameter zu variieren. Einfache Möglichkeiten der Variation sind beispielsweise die Fermentation bei verschiedenen Temperaturen oder in verschiedenen Kulturgefäßen (Schüttelkolben, Ruhekolben oder Bioreaktoren) sowie die Fermentation mit unterschiedlichen Nährmedienzusätzen. Wie bereits erwähnt wurde, kann Stress, der während der Kultivierung auf Mikroorganismen ausgeübt wird, zur Erweiterung des Metabolitenspektrums führen. Beispiele dafür sind der Zusatz von DMSO, subinhibitorischen Mengen eines Antibiotikums oder auch Cofermentationen mit einem zweiten Stamm[140].

Es ist deutlich erkennbar, dass das hier beschriebene chemische Screening im Gegensatz zum in der Industrie verfolgten Ansatz steht, durch einen hohen Durchsatz an Proben und Testsystemen die Trefferquote zu erhöhen. Unterstützung erhält die intensive Erforschung einer kleineren Anzahl an Stämmen durch Genomprojekte. Beispielsweise konnten durch Annotation des Genoms von *Streptomyces coelicolor* A(3)2[141] mehrere bisher nicht bekannte Gencluster identifiziert werden, die ihrer Sequenz nach den Polyketidsynthasen des Typs I und II sowie den nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen angehören. Da *S. coeliolor* zu den am besten untersuchten Streptomycetenstämmen gehört, stellt sich die Frage, ob diese Gene lediglich nicht mehr funktional sind oder ob zur Detektion der entsprechenden Sekundärstoffe die analytischen Methoden nicht ausreichen. Alternativ bestehen die Möglichkeiten, dass ein inhibierender Faktor auftritt oder dass die Gene unter den Kultivierungsbedingungen nicht abgelesen werden, da ein induzierender Faktor fehlt. Dieser Gedanke ist in Anbetracht der

Tatsache sinnvoll, dass sich die Bedingungen bei der isolierten Kultivierung eines einzelnen Organismus stark von den Lebensbedingungen in der Natur unterscheiden, wo eine ständige Wechselwirkung auch mit fremden Mikroorganismen stattfindet.
Es ist offensichtlich, dass der OSMAC-Ansatz nur ein Versuch sein kann, die natürlichen Bedingungen zu imitieren und dass allein durch Variation der Fermentationsparameter nicht das gesamte Potential eines Stammes ausgeschöpft werden kann.

Mit dem chemischen Screening versucht man, die Aktivitäts-geleitete Vorselektion des biologischen Screenings zu umgehen und dadurch das angesprochene Screeningfenster zu vergrößern. Die Bewertung der Metabolitenmuster erfolgt anhand der physikalischen Eigenschaften und des Anfärbeverhaltens der produzierten Sekundärstoffe verschiedenen Reagenzien gegenüber. Dieser Ansatz beweist seine Stärke gegenüber dem biologischen Screening schon allein damit, dass vermutlich weder Hexacyclinsäure (**6**) noch die Phenalinolactone (**5**, **24**, **25** und **26**) in einem Aktivitätsgeleiteten Screening gefunden worden wären.

5.1 Zur Technik des chemischen Screenings

Die aus Erdproben isolierten Stämme wurden auf Agarplatten mit drei verschiedenen Nährmedien ausgestrichen, das Medium mit dem besten Wachstum wurde jeweils zur Stammhaltung eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte zunächst standardisiert in 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen und 100 mL Nährlösung (vier verschiedene Nährlösungen). Nach Autoklavieren der Medien und Animpfen mit etwa 1 cm^2 einer gut bewachsenen Agarplatte wurden die Kulturen vier Tage bei 28 °C und 180 Upm inkubiert.
Zur Extraktion trennte man die erhaltenen Kulturbrühen per Zentrifugation in Kulturfiltrat und Myzel. Bei der Ernte wurden neben pH-Wert und Farbe noch Geruch und eventuelle Besonderheiten der Stämme notiert. Das Myzel extrahierte man 15 min lang in Aceton im Ultraschallbad, das Kulturfiltrat wurde an XAD-2 adsorbiert und anschließend mit Methanol bzw. Methanol/Wasser (1:1) eluiert.
Die analytische Untersuchung dieser Rohextrakte erfolgte dünnschichtchromatographisch. Dazu löste man die Extrakte in 2 mL Methanol/Wasser (1:1) und tüpfelte 5 µL davon auf Nano-DC-Platten. Zur Untersuchung eines möglichst breiten Polaritätsbereiches wurden die DCs in zwei verschiedenen Laufmittelsystemen entwickelt (Chloroform/Methanol 9:1 und Butanol/Eisessig/Wasser 4:5:1). Die Analyse des Metabolitenspektrums erfolgte bei farbigen

Substanzen visuell sowie über UV-Absorption/Fluoreszenz bei 254 und 366 nm. Durch Farbreaktionen mit drei verschiedenen Ansprühreagenzien (Anisaldehyd, Ehrlich´s Reagenz und Orcin) kann eine breite Palette an funktionellen Gruppen angesprochen werden. So lassen sich z.B. mit Anisaldehyd Steroide oder Alkohole, mit Ehrlichs Reagenz Amine und mit Orcin Zucker nachweisen[142].

Zu den Auswahlkriterien, ob ein Stamm als viel versprechender Sekundärstoffbildner weiter bearbeitet wird, gehört unter anderem die Vielfalt der im DC sichtbar gemachten, verschieden anfärbenden Substanzen. Oftmals können häufig in Streptomyceten auftretende Verbindungen bereits anhand von Laufwerten und Anfärbeverhalten identifiziert werden. Ein weiterer wesentlicher Faktor ist das Wachstum des Stammes in den verschiedenen Medien sowie die Reproduzierbarkeit des Substanzspektrums.

Diejenigen Stämme, die aufgrund ihres guten Wachstums und interessant erscheinender Substanzmuster im DC zur weiteren Bearbeitung ausgewählt wurden, wurden zunächst im 2 - 3 L-Maßstab kultiviert, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Aus den Rohextrakten konnten die in ausreichenden Mengen produzierten Verbindungen durch Chromatographie an Kieselgel und LH-20 isoliert werden. Um bereits bekannte Verbindungen möglichst schnell auszuschließen, wurden mit den ersten, aus ^{1}H-NMR- und Massenspektrometrischen Untersuchungen erhaltenen Informationen Datenbankrecherchen durchgeführt (Antibase[85], Chapman&Hall[143], Scifinder[144]).

Sofern die Substanzmengen aus der ersten Reproduktion nicht ausreichend waren, wurde ein weiteres Scale-up durchgeführt.

5.2 Untersuchte Streptomycetenstämme

Die Bodenproben, aus denen die in dieser Arbeit untersuchten Streptomyceten isoliert wurden, stammen aus China (Shandong, China I- und II-Stämme), Mexico (Pap-Stämme) und den USA (Utah, Alv-Stämme).

In der vorliegenden Arbeit wurden die erhaltenen 45 Stämme einem chemischen Screening unterzogen. Anhand der zuvor beschriebenen Kriterien erfolgte die Einteilung der Stämme in interessante und weniger interessante Stämme (s. Tabelle 5, Anhang). Im Rahmen dieser Arbeit konnten nicht alle der 12 aufgefallenen Stämme weiterbearbeitet werden, es wurden die acht vielversprechendsten ausgewählt: Alv 4, Alv 5, Alv 6, Pap B3, China I 6, China I 8, China II 1, China II 10 und China II 11. Alv 6 zeichnete sich durch ein Metabolitenspektrum

aus, das identisch mit dem des Stammes Alv 5 war und wurde aus diesem Grunde nicht weiter bearbeitet.

Die Stämme Alv 4, Pap B3, China I 6, China I 8, China II 1, China II 10 und China II 11 konnten in jeweils zwei Kultivierungen im 2 - 3 L-Maßstab nicht zur Reproduktion des im Screening erhaltenen Metabolitenmusters gebracht werden.

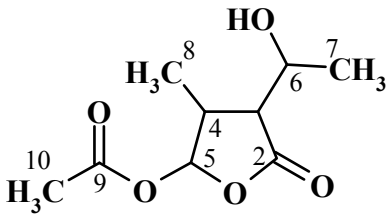
Aus den Stämmen China I 8 und China II 1 konnten neben Streptazolin, einem 1981 erstmalig beschriebenem und aus Streptomyceten häufig zu isolierendem Metaboliten[145], keine weiteren Substanzen in ausreichenden Mengen erhalten werden.

5.3 Der Stamm Alv 5

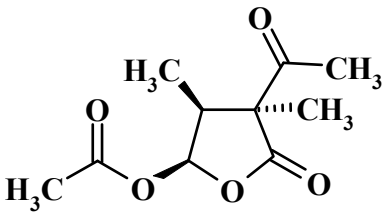
Der Stamm Alv 5 zeigte als einziger der weiter untersuchten Streptomyceten-Stämme ein reproduzierbares Metabolitenspektrum. Aus dem Kulturfiltrat einer Kultivierung im 1 L Maßstab (Ha-Medium) konnte die Substanz **71** in Ausbeuten von 3.0 mg/L durch Chromatographie an Kieselgel und Sephadex LH-20 isoliert werden. **71** färbt mit Anisaldehyd orange bis rot an und besitzt einen R_f-Wert von 0.55 (Chloroform/Methanol 9:1).

Das ESI-Massenspektrum von **71** führte zur molaren Masse von 202 g/mol. Zusammen mit der aus ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Spektren entnommenen Anzahl an Protonen und Kohlenstoffatomen konnte die Summenformel $C_9H_{14}O_5$ aufgestellt werden. Die Berechnung der Doppelbindungsäquivalente ergab drei.

Zwei der Kohlenstoffatome lagen im Carboxylbereich bei δ_C = 169.2 und 176.9. Durch ein- und zweidimensionale NMR-Experimente konnte **71** eindeutig als ein 6-Dihydro-3-desmethyl-Derivat des Acetomycins (**72**) erkannt werden.



71

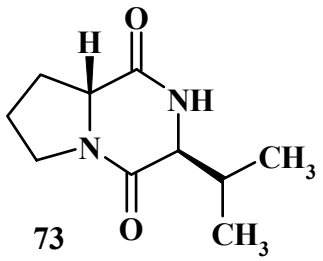


72

71 ist patentiert[146,147] und in der Abteilung Prof. Zeeck als SM-97 A bekannt. Biosynthetisch wird **71** aus zwei Acetateinheiten und einem Molekül Glycerin gebildet und liegt somit als reduzierte Form eines direkten Acetomycin-Vorläufers vor[148].

Da die absolute Stereochemie von **71** unbekannt ist, wurde versucht, die sekundäre Hydroxylgruppe mit Mosher´s Reagenz zu verestern. Die Versuchsbedingungen ließen sich allerdings nicht dahingehend optimieren, dass eine einheitliche Reaktion erfolgte.

Derzeit wird der Stamm Alv 5 von I. Plitzko im Rahmen ihrer Diplomarbeit auf weitere Sekundärstoffe hin untersucht[149]. Aus dem Kulturfiltrat eines 50 L Fermenters mit dem Nährmedium SGG konnte Plitzko ein aus marinen Bakterien bekanntes LL-Diketopiperazin, das Cyclo(L)-prolin-(L)-valin (**73**) sowie Acetomycin (**72**) isolieren[150].



73

5.4 Ausblick

Es wurden nicht alle der als interessant eingestuften Stämme auf die Reproduzierbarkeit ihrer Sekundärstoffproduktion hin untersucht. Dies sollte in zukünftigen Arbeiten nachgeholt werden.

Sieben der acht weiter bearbeiteten Stämme ließen keine Reproduktion des im chemischen Screening beobachteten Metabolitenspektrums zu. Es sollte versucht werden, ob ähnlich wie im Falle der Produktionsprobleme mit dem Stamm S 1013 durch Verwendung frisch aus einer Langzeiterhaltung angeimpfter Agarplatten das ursprüngliche Substanzmuster wiederhergestellt werden könnte.

Durch weitere Optimierungsversuche könnte eine Veresterung vom 6-Dihydro-3-desmethyl-acetomycin (**71**) zum Mosher-Produkt ermöglicht werden, was in Kombination mit einem NOESY-Spektrum die Bestimmung der absoluten Stereochemie gestatten sollte.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Phenalinolactone A bis D aus *Streptomyces* sp. Tü 6071

Vom Arbeitskreis Prof. Dr. H.-P. Fiedler (Universität Tübingen) wurden vier Substanzen zur Verfügung gestellt, die aus dem Kulturfiltrat des Stammes *Streptomyces* sp. Tü 6071 isoliert wurden.

Die Strukturaufklärung der Hauptkomponente 6071-A wurde u.a. mit Hilfe ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie sowie hochaufgelöster ESI-Massenspektrometrie durchgeführt. Die Struktur von 6071-A setzte sich als einzigartige Kombination aus einem diterpenoiden Grundgerüst mit ungewöhnlich substituiertem γ-Lacton, einer 4-*O*-Methyl-α-*L*-amicetose, einem *O*-Acetyl- und einem *O*-5-Methylpyrrolcarbonylrest zusammen. Die Hauptkomponente wurde Phenalinolacton A (**5**) genannt. Die relative Konfiguration des Grundgerüstes konnte anhand von NOESY-NMR-Experimenten bestimmt werden.

Die drei Phenalinolactone B bis D (**24** - **26**) zeigten große Ähnlichkeit zur Komponente A und konnten NMR-spektroskopisch als weitere Vertreter dieser neuen Substanzklasse identifiziert werden.

Erste Biogeneseuntersuchungen wurden durch Fütterung von [1-^{13}C]Acetat und [1-^{13}C]Glucose vorgenommen, brachten jedoch kein Ergebnis bezüglich des Aufbaus des diterpenoiden Grundgerüstes.

Anhand von Vergleichen mit literaturbekannten Naturstoffen wurde die Struktur der Phenalinolactone sowie die Biogenese der verschiedenen Strukturelemente diskutiert. Ein hypothetischer Biosyntheseweg konnte formuliert werden.

2. Beiträge zur Biosynthese und Chemie der Hexacyclinsäure

Durch das Screening verschiedener, aus Langzeiteinlagerungen angeimpfter Kulturen des Stammes *Streptomyces cellulosae* subsp. *griseorubiginosus* S 1013 konnte die Produktion der Hexacyclinsäure (**6**) wiederhergestellt werden.

Im Zuge der Reproduktionsversuche wurde aus Fermentationen in Ruhekulturen das literaturbekannte *N*-Acetyl-tryptamin (**42**) isoliert.

Aus Fütterungsexperimenten mit [1-^{13}C, $^{18}O_2$]markiertem Propionat konnte 14-Desacetyl-14-propionyl-hexacyclinsäure (**44**) erhalten werden. Die Bildung von **44** wurde als Ansatzpunkt für mögliche Vorläufer-dirigierte Biosyntheseexperimente erkannt und diskutiert.

Aus Kultivierungen unter [$^{18}O_2$]-Atmosphäre wurde ein neues Gabosin, das 7-*O*-Methyl-gabosin E (**43**) isoliert und mittels NMR-Spektroskopie in seiner Struktur aufgeklärt. Ausgehend vom Gabosin D (**35**) wurde ein Vorschlag für die Biosynthese gemacht.

In chemischen Derivatisierungsversuchen zeigte das δ-Lacton der Hexacyclinsäure (**6**) eine außerordentlich hohe Stabilität gegenüber konzentrierter Salzsäure und Natronlauge. Durch Umsetzung mit 2 M methanolischer Natronlauge bzw. p-Toluolsulfonsäure ließ sich 14-Desacetyl-hexacyclinsäure (**69**) gewinnen.

Unter Standardbedingungen für die Acetylierung reagierte Hexacyclinsäure (**6**) zu einem Gemisch verschiedener Produkte. Verlängerung der Reaktionsdauer führte zur Umsetzung von **6** zu einer neuen Verbindung, die über Massen- und NMR-Spektroskopie als 16,17-Anhydrohexacyclinsäure (**70**) identifiziert werden konnte.

Die erhaltenen Metaboliten und Hexacyclinsäure-Derivate wurden auf ihre biologischen Wirkungen in Agardiffusionstests gegen vier verschiedene Teststämme untersucht, es konnte jedoch keine Wirkung nachgewiesen werden.

3. Beiträge zur Biosynthese der Hexacyclinsäure

Ein Strukturvergleich von Hexacyclinsäure (**6**) mit FR182877 (**45**) wurde durchgeführt und in der Literatur beschriebene Vorschläge zur Biosynthese von **45** diskutiert.

Die Biogenese aller Sauerstoffatome, außer denen der Carboxylgruppe (C-25) und O-6 des Halbketals wurde durch Fütterungen von [1-^{13}C, $^{18}O_2$]Acetat bzw. [1-^{13}C, $^{18}O_2$]Propionat geklärt. Die Identifizierung des ^{18}O-Einbaus im Halbketalsystem der Hexacyclinsäure (**6**) gelang durch Vergleich der ^{18}O-Isotopen-Effekte mit Literaturdaten des Monensins (**59**).

Aus den Ergebnissen der Markierungsexperimente mit ^{18}O-Isotopenmarkierten Vorläufermolekülen ließ sich der von Sørensen und Mitarbeitern postulierte Biosyntheseweg zu Hexacyclinsäure (**6**) und biosynthetisch möglicherweise verwandten Molekülen widerlegen.

Ein hypothetischer Biosyntheseweg für die Hexacyclinsäure (**6**) wurde unter Berücksichtigung der Fütterungsexperimente aufgestellt. Insbesondere wurden Überlegungen angestellt und im Hinblick auf andere Naturstoffe erörtert. Die Annahme der Beteiligung einer Hetero-Diels-Alder-Reaktion bei der Cyclisierung konnte widerlegt werden.

Über HPLC-MS-Messungen konnte ein Metabolit identifiziert werden, der möglicherweise ein Vorläufer der Hexacyclinsäure und zum FR182877 isomer ist.

4. Screening von Streptomyceten-Stämmen

Es wurden 45 Streptomycetenstämme, die aus drei verschiedenen Erdproben stammen, einem chemischen Screening unterzogen. Elf der Stämme fielen durch ihr Metabolitenmuster im Dünnschichtchromatogramm auf. Die acht interessantesten wurden in größeren Ansätzen fermentiert und auf ihre Sekundärstoffproduktion hin untersucht.

Aus den Stämmen China I 8 und China II 1 wurde das literaturbekannte Streptazolin isoliert.

Der Stamm Alv 5 produzierte **71**, ein in der Literatur als SM-97-A bekanntes 6-Dihydro-3-desmethyl-Derivat des Acetomycins.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Allgemeines

1.1 Instrumentelle Analytik

Schmelzpunkte:

Die Schmelz- und Zersetzungspunkte wurden mit einem Heiztischmikroskop der Fa. *Reichert* bestimmt und sind nicht korrigiert.

Massenspektren:

EI-MS: *Finnigan* MAT 95, 70 eV, Hochauflösungen wurden mit Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz gemessen, die relativen Intensitäten beziehen sich auf den Basispeak (I = 100 %) und sind in Klammern angegeben. **DCI-MS:** *Finnigan* MAT 95, 200 eV, Reaktandgas NH_3. **ESI-MS:** *Finnigan* LC-Q. **HR-ESI-MS:** *Bruker* Apex-Q III, 7 Tesla.

Drehwerte:

Alle Drehwerte wurden mit einem Polarimeter der Fa. *Perkin-Elmer* Modell 343 bestimmt. Die Drehwerte sind in [10^{-1} deg cm^2/g] angegeben, die Konzentrationen (c) in [mg/mL].

Circulardichroismus-Spektren:

Jasco J 500 mit *Jasco* IF 500 A/D-Wandler und *BMC* IF 800 Personalcomputer zur Prozessierung der Daten. Die molaren Elliptizitäten (θ) sind in [10^{-1} grad cm^2 mol^{-1}] angegeben.

Infrarotspektren:

Die IR-Spektren aller Substanzen wurden in Form von KBr-Presslingen mit einem FT-IR-Spektrometer der Fa. *Perkin-Elmer* Modell 1600 gemessen. Abkürzungen: br = breit, sh = Schulter.

Elektronenspektren:

Varian Modell Cary 3E. Methanol/HCl bzw. Methanol/NaOH: Zu 2 mL methanolischer Lösung wurde jeweils ein Tropfen 2 N HCl bzw. 2 N NaOH gegeben. Der molare Extinktionskoeffizient (ε) ist in [1000 cm^2 mol^{-1}] angegeben und wird über nachfolgende Gleichung berechnet (Gleichung gilt für einen Ansatz von 10 mL Messlösung):

$$\varepsilon = \frac{E * Molmasse * 10}{Einwaage[mg]}$$

^{1}H-NMR-Spektren:

Varian Unity Inova-600 (600 MHz), *Varian* Unity Inova-500 (500 MHz), *Varian* Unity 300 (300 MHz). Chemische Verschiebungen in δ-Werten (ppm) relativ zum Lösungsmittel als internem Standard. Kopplungskonstanten (*J*) in Hertz (Hz).

Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, dd = Dublett vom Dublett, ddd = Dublett vom Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplett, q = Quartett, m = Multiplett, bs = breites Singulett.

Alle ^{1}H-NMR-Spektren wurden näherungsweise als Spektren erster Ordnung interpretiert.

^{13}C-NMR-Spektren:

Varian Unity Inova-600 (150.8 MHz), *Varian* Unity Inova-500 (125.7 MHz), *Varian* Unity 300 (75.5 MHz). Chemische Verschiebungen in δ-Werten (ppm) relativ zum Lösungsmittel als internem Standard. Abkürzungen: **APT** (**A**ttached **P**roton **T**est): CH (d) und CH_3 (q) geben positive Signale, C (s) und CH_2 (t) negative.

2D-NMR-Spektren:

H,H-COSY (H,H-**Co**rrelated **S**pectroscop**y**), **HSQC** (**H**eteronuclear **S**ingular **Q**uantum **C**oherence), **HMBC** (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**onnectivity), **NOESY** (**N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**y**), **TOCSY** (**To**tal **C**orrelation **S**pectroscop**y**).

1.2 Chromatographische Methoden

Lösungsmittel:

Lösungsmittel für die Chromatographie wurden zuvor destilliert. Für die HPLC wurden nur analysenreine Lösungsmittel (LiChrosolv, *Merck*) und bidestilliertes Wasser verwendet. Vor Benutzung entgaste man Lösungsmittel für die HPLC durch jeweils 10minütiges Behandeln im Ultraschallbad und anschließendes Einleiten von Helium.

Dünnschichtchromatographie (DC):

DC-Alufolien: Kieselgel 60 F_{254}, RP-18 F_{254s} (*Merck*). HPTLC-Nano-Fertigplatten: Kieselgel 60 F_{254} (*Merck*; 10 x 10 bzw. 20 x 20 cm).

Säulenchromatographie:

Kieselgel: KG 60, 0.032 – 0.064 mm (*ICN*); Flash-Kieselgel: MN KG 60, < 0.063 mm. Flash-Chromatographie nach W. C. Still[151]; *Pharmacia* Sephadex LH-20; LiChroprep Diol (40 - 63 µm; *Merck*).

Adsorberharz: *Serva* Amberlite® XAD-2.

Ermittlung von R_f-Werten:

Zur Bestimmung von R_f-Werten löste man 0.5 mg der zu untersuchenden Reinsubstanz in 1 mL Lösungsmittel (p.a.). Man tüpfelte auf Nano-DC-Platten, so dass ein Vorlauf von 5 cm eingehalten wurde. Die Gesamtlaufstrecke des Laufmittels sollte 15 cm betragen. Auswertung erfolgte unter UV-Licht (254, 366 nm) bzw. mittels der unten beschriebenen Anfärbemethoden.

Sprühreagenzien:

Nach *Merck*, Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie[35]. Die DC-Platten wurden nach dem Ansprühen auf ca. 100°C erwärmt.

***Anisaldehyd (Nr. 21)*:** 1.0 mL Anisaldehyd in einer Lösung aus 85 mL Methanol, 10 mL Eisessig und 5 mL konz. Schwefelsäure.

***Vanillin-Schwefelsäure (Nr. 322)*:** 1 g Vanillin in 100 mL konz. Schwefelsäure.

***Ehrlichs Reagenz (Nr. 91)*:** 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in einer Mischung aus 25 mL Salzsäure (36 %) und 75 mL Methanol.

***Orcin-Sprühreagenz (Nr. 120 – 122)*:** 1 g Eisen-(III)-chlorid, in 100 mL Schwefelsäure gelöst und zu gleichen Anteilen mit einer Orcinlösung (6 % in Ethanol) gemischt.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC):

System I:

Pumpe: *Kontron* Modell 322; Autosampler: *Kontron* 360; Detektor: *Kontron* Diode Array Detector 440; Mischkammer: *Kontron* HPLC 360, Datensystem: *Kontron* Kromasystem 2000 Version 1.60; analytische Aufgabenschleife; Säule: *Knauer* Nucleosil-100 C18, RP 18, 5 µm, 3 x 250 mm; Lösungsmittelsystem: Lösung A: 0.1 %ige Phosphorsäure, Lösung B: Acetonitril mit 1 % H_2O; Gradient: von 20 % B zu 100 % B in 25 Minuten, Flussrate 0.5 mL/min.

System II:

Chromatograph: HP 1090 M mit integriertem Diodenarray-Detektionssystem (*Hewlett-Packard)*; Integrator: HP 3392 A (*Hewlett-Packard*); Steuer- und Auswerteinheit: HP ChemStation Rev. 2.02 A; Säule: *Maisch* Nucleosil 100 C_{18}, 5 µm, 125 x 4.6 mm; Vorsäule: *Maisch* Nucleosil 100 C_{18}, 5 µm, 20 x 4.6 mm; Injektionsvolumen: 10 µL; Detektion: 210, 230, 260, 250, 310, 435 nm; Lösungsmittelsystem: Lösung A: 0.1 % Phosphorsäure, Lösung B: Acetonitril; Gradient: von 0.5 % B zu 100 % B in 15 Minuten, Flussrate 2 mL/min

1.3 Mikrobiologische Methoden

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden unter den üblichen sterilen Bedingungen durchgeführt.

Nährmedienbestandteile:

Die verwendeten Nährmedienbestandteile wurden von folgenden Firmen bezogen:

Malzextrakt, Glucose, Calciumcarbonat, Caseinpepton, NaCl, NaBr, Fleischextrakt und lösliche Stärke: *Merck*. Glycerin und DMO (p.A.): *Roth*. D(-)-Mannit: *Riedel-deHaen*. Entfettetes Sojamehl bzw. vollfett-Sojamehl: *Henselwerk GmbH*. Haferflocken: *Kölln* (Echte Kernige). Corn Steep Powder: *Hartge, Hamburg*. Hafermehl: *Hologold*. Haferkleie: *Quickvital*. Brain-Heart-Infusion: *Gibco BRL*. Hefeextrakt: *Oxoid*. Agar-Agar, Bacto Nutrient Broth: *Difco*.

Nährmedien:

Alle Nährmedien wurden 30 min bei 121 °C und einem bar Überdruck sterilisiert. Mengenangaben beziehen sich jeweils auf einen Liter demineralisiertes Wasser, der pH-Wert wurde vor Sterilisation mit 0.5 N NaOH bzw. 0.5 N HCl eingestellt. Medien zur Verwendung für Agarplatten wurde 20 g/L Agar hinzugefügt. Diese wurden nach Sterilisation etwa 2-3 mm dick in sterile Petrischalen gegossen.

***NL 1147*:** 20 g Haferflocken wurden 20 min in demineralisiertem Wasser gekocht, durch ein Sieb gedrückt und das Filtrat mit 2.5 mL Spur 11 Lösung versetzt. pH 7.0.

***NL SM*:** (D)-Mannit 20 g, Sojamehl (entfettet) 20 g, pH 7.2.

***NL 19*:** (D)-Mannit 20 g, Sojamehl (Vollfett) 20 g, 1 L Leitungswasser, pH 7.3.

***NL M2*:** Malzextrakt 10 g, Hefeextrakt 4 g, Glucose 4 g, pH 7.2.

***NL 1187*:** Stärke 10 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g, $CaCO_3$ 2 g, K_2HPO_4 1 g, NaCl 1 g, $MgSO_4$ 1 g, pH 7.0.

***NL Hafermehl*:** Hafermehl 20 g, Spur 11 2.5 mL, pH 7.2.

***NL BHI*:** Brain-Heart-Infusion (BHI) 38 g, pH nicht eingestellt.

***NL KM1*:** Bacto Nutrient Broth 8 g, NaCl 5 g, pH 7.2.

***NL KM4*:** Hefeextrakt 4 g, Malzextrakt 10 g, Glucose 4 g, pH 7.3.

***Stärke/Casein*:** Stärke 10 g, Casein 3 g, KNO_3 2 g, NaCl 2 g, K_2HPO_4 2 g, MgSO4 x 7 H_2O 50 mg, $CaCO_3$ 20 mg, $FeSO_4$ x 7 H_2O 10 mg, 16 g Agar, 1 L Leitungswasser.

***Wasseragar*:** K_2HPO_4 0.1 g, 15 g Agar auf 1 L Leitungswasser.

***Spurenelementlösung 11*:** $CaCl_2$ x 2 H_2O 3 g, Fe-(III)-citrat 1 g, $MnSO_4$ 0.2 g, $ZnCl_2$ 0.1 g, $CuSO_4$ x 5 H_2O 0.025 g, $Na_2B_4O_7$ x 10 H_2O 0.02 g, $CoCl_2$ 0.004 g, Na_2MoO_4 x 2 H_2O 0.01 g.

Isotopenmarkierte Verbindungen:

[1-^{13}C]Acetat wurde von der Firma *Campro*, [1-^{13}C]Pyruvat, [$^{2}H_3$]Acetat und [1-^{13}C]Glucose von der Firma *Cambridge Isotope Lab*. (*CIL*) bezogen. [1-^{13}C, $^{18}O_2$]Acetat sowie [1-^{13}C, $^{18}O_2$]Pyruvat wurden entsprechend unten beschriebener Synthesevorschrift aus ^{13}C-markiertem Acetat bzw. Pyruvat und $H_2{}^{18}O$ (*CIL*) hergestellt.

Alle Verbindungen waren zu 99 % mit markiertem Kohlenstoff angereichert, die ^{18}O-Anreicherung wurde jeweils anhand des Verhältnisses der Intensitäten von ^{13}C-Signalen zu Isotopenshifts abgeschätzt.

Austausch der Sauerstoffatome in Acetat und Pyruvat:

Zum Austausch von ^{16}O gegen ^{18}O löste man 900 mg [1-^{13}C]markiertes Acetat bzw. Pyruvat in 8 mL $H_2{}^{18}O$ und versetzte mit 1 mL konzentrierter Salzsäure. Der Reaktionsansatz wurde 10 h bei 110 °C gerührt, anschließend auf Eis abgekühlt und mit 0,43 g NaOH neutralisiert. Zur Rückgewinnung des $H_2{}^{18}O$ destillierte man. Das erhaltene $^{18}O_2$-markierte Produkt konnte direkt für Fütterungen eingesetzt werden. Das $^{18}O/^{16}O$-Verhältnis konnte aus den Signalintensitäten im ^{13}C-NMR-Spektrum des Vorläufers ermittelt werden. Es ergaben sich folgende Austauschraten:

[1-^{13}C, $^{18}O_2$]Acetat ($^{18}O_2$:$^{18}O/^{16}O$:$^{16}O_2$): 18 : 42 : 40 (%)

[1-^{13}C, $^{18}O_2$]Propionat ($^{18}O_2$:$^{18}O/^{16}O$:$^{16}O_2$): 24 : 40 : 36 (%)

Berechnung der ^{13}C-Anreicherung (nicht miteinander koppelnde Kerne):

$$\% \text{ Anreicherung} = 1.1\ \% \times \frac{(\text{Intensität Signal markierte Verbindung})}{(\text{Intensität Signal Referenzverbindung})} - 1.1\ \%$$

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

Schüttler und Fermenter mit Belüftungseinstellung:

Braun Certomat BS-1, *Braun* Inkubationsschüttelschrank BS4, *Braun* Certomat HK, *Braun* Biostat B (5 L, 1 vvm, 200 rpm), *Braun* Biostat E (10 L, 1 vvm, 200 rpm), *Ingold* O_2-Elektrode; *WTB* Binder Inkubationsschrank.

Zentrifugen:

Sigma 4K10, *Sigma* 5K.

UV-Lampe:

Hanau Fluotest.

Ultraschallbad:

Bandelin Sonorex RK 100.

Plattendiffusionstests:

Auf die mit verschiedenen Testkeimen angeimpften Agarplatten legte man Filterplättchen (Durchmesser: 5 mm, Dicke: 0.5 mm), die mit den Substanzlösungen (Rohprodukte in MeOH/H_2O = 1:1 aufgenommen, Reinsubstanzen in MeOH gelöst) getränkt und vor dem Auflegen unter sterilen Bedingungen getrocknet worden waren. Die Agarplatten wurden 24 h bei 28 °C (Bakterien) bzw. 37 °C (Pilze) inkubiert und dann abgelesen.

Als Testkeime wurden *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* verwendet.

Medium für S. aureus: Bacto Nutrient Broth 8 g/L, NaCl 5g/L, Agar 15 g/L.

Medium für B. subt., E. coli: Glucose 5 g/L, Na-citrat x 2 H_2O 0.5 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, K_2HPO_4 7 g/L, $MgSO_4$ x 7 H_2O 0.1 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1g/L, Agar 15 g/L.

Medium für Cand. alb.: Hefeextrakt 4 g/L, Malzextrakt 10 g/L, Glucose 4 g/L, Agar 15 g/L, pH = 5.5.

Langzeiterhaltung über N_2:

Die Langzeiterhaltung der Stämme erfolgte u.a. über flüssigem Stickstoff. Aus gut bewachsenen Agarplatten wurden dazu mit einseitig zugeschweißten und mit einem Bleistück beschwerten sterilen Polypropylen-Halmen Stückchen herausgestanzt. Diese steckte man in einen zweiten Halm, der mit einer ausgeglühten Tiegelzange zugeschmolzen wurde. Mehrere solcher Halme in einem Kryoröhrchen wurden in einem Dewar über flüssigem Stickstoff gelagert.

Langzeiterhaltung als Glycerineinlagerung:

Aus einer drei Tage alten Vorkultur entnahm man 4 mL Kulturbrühe und vermischte diese mit 6 mL sterilem Glycerin. Bei – 20 °C gelagert kann das Gemisch über mehrere Jahre als Animpfmaterial dienen.

Langzeiterhaltung als Sporensuspension:

Mittels Impföse wurde der Stamm Tü 6071 in einen Schrägagarkolben auf 200 mL KM1-Medium übertragen. Die Schrägkolben inkubierte man bei 27 °C bis zur vollständigen Sporulation und schwemmte die Sporen anschließend mit Glycerinhaltiger Saline ab. Zur Zerschlagung der Sporenketten überführte man die Suspension in ein Reagenzglas mit Glasperlen und schüttelte im Vortex-Schüttler. Anschließend wurde die Sporenlösung steril

über Glaswatte filtriert und eine $OD_{578\,nm}$ von 1 eingestellt. In Aliquots zu je 1 mL aufgeteilt wurden die Suspensionen bei -20 °C gelagert.

Langzeiterhaltung als Sporen-Lyophilisat:
Zur Einlagerung der Sporen als Lyophilisat gab man 2 mL sterile „skim-milk“ Lösung (6.3 g skim milk Pulver in 100 mL destilliertem Wasser) auf eine gut bewachsene Agarplatte und kratzte mit einer Impföse die Sporen ab. Jeweils 0.2 mL überführte man in eine sterile Glasampulle. Die Lösung wurde im Aceton/Trockeneis Bad eingefroren und an der Gefriertrocknung lyophilisiert. Unter Vakuum wurden die Ampullen abgeschmolzen und dann bei Raumtemperatur gelagert.

Stammhaltung:
Die Stammhaltung erfolgte auf Agarplatten mit unterschiedlichen Medien (Hafer, SM, M2). Es wurde dazu mit einer Platinimpföse überimpft und die Platten anschließend 7 d bei 28 °C inkubiert. Bewachsene Platten wurden bei 4 °C bzw. bei Raumtemperatur gelagert.

2. Phenalinolactone A - D aus dem Stamm *Streptomyces* sp. Tü 6071

2.1 Stammhaltung

Langzeiterhaltung:
Die Langzeiterhaltung erfolgte in Form einer Sporensuspension: (s. B.1.3).

Stammhaltung:
Zur Lagerung wurde der Stamm *Streptomyces* sp. Tü 6071 auf Schrägröhrchen mit KM4-Medium ausgestrichen, 7 d bei 28 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt.

2.2 Kultivierung und Standardaufarbeitung

Vorkulturen:
Man verwendete 500 mL Erlenmeyerkolben mit einer Schikane, die mit jeweils 100 mL NL 19 gefüllt wurden. Nach Sterilisation und Beimpfen mit etwa einem cm^2 einer gut bewachsenen Agarplatte verschloss man mit einer Schaumstoffkappe und inkubierte bei 27 °C und 120 Upm für 48 h.

Kultivierung in Schüttelkulturen:

Jeweils 100 mL NL 19 mit wurden in 500 mL Erlenmeyerkolben mit einer Schikane gegeben und mit 4 mL einer 72 h alten Vorkultur beimpft. Mit Schaumstoffkappen verschlossen inkubierte man bei 27 °C und 120 Upm für 9 - 10 d.

Standardaufarbeitung:

Nach Einstellen eines pH-Wertes von 5.0 trennte man Kulturfiltrat und Myzel durch Zentrifugation. Das Kulturfiltrat wurde drei Mal mit der Hälfte des Volumens an Ethylacetat extrahiert. Durch Einengen des organischen Lösungsmittels erhielt man das Rohprodukt des Kulturfiltrats. Das Myzel extrahierte man dreimal mit einem Aceton/Methanol Gemisch (1:1) und erhielt nach Einengen des Lösungsmittels das Myzelextrakt.

2.3 Fütterungsexperimente mit ^{13}C-markierten Vorläufern

Zur Fütterung von markierten Vorläufern wurden 650 mg der markierten Substanz in sterilem Wasser gelöst und ab der 96. Stunde der Hauptkultur im Pulse-Feeding Verfahren zugegeben (96., 98., 100., 102. und 104. Stunde der Hauptkultur). Geerntet wurde nach 118 Stunden.

Tabelle 4 zeigt die spezifischen Einbauraten in Phenalinolacton A (**5**) nach Fütterung von [1-^{13}C]-markierter Glucose und [1-^{13}C]-markiertem Acetat.

2.4 Kristallisierungsversuche:

Verdampfungsmethode:

Zur Kristallisation wurden Lösungen von 16 mg Phenalinolacton A (**5**) einem jeweils einem mL Lösungsmittel hergestellt. Als Lösungsmittel verwendete man Tetrahydrofuran, Aceton und Methanol. Die Lösungen ließ man in einem Schraubdeckelgläschen (Volumen 6 mL) mit leicht geöffnetem Deckel erschütterungsfrei stehen und kontrollierte regelmäßig auf Kristallwachstum.

Überschichtung:

Man löste 16 mg Phenalinolacton A (**5**) in einem mL Tetrahydrofuran, gab 0.16 mL davon in ein Glasröhrchen (Innendurchmesser 2 mm) und überschichtete mit dem gleichen Volumen an n-Pentan. Die Ansätze lagerte man erschütterungsfrei und kontrollierte regelmäßig auf Kristallwachstum.

Diffusionsmethode:

0.5 mL einer Lösung von 16 mg **5** in einem mL Tetrahydrofuran gab man in ein Aromaröhrchen und stellte den Ansatz in ein äußeres Gefäß mit 2 mL n-Pentan. Dieses wurde verschlossen und zur Kristallisation gelagert.

2.5 Chemische Derivatisierung von Phenalinolacton A

Zur Veresterung von Phenalinolacton A (**5**) zum o-Brombenzoat löste man 2 mg **5** in 1 mL Dichlormethan und versetzte mit wenig DCC sowie 4 mg *o*-Brombenzoesäure. Den Ansatz ließ man rühren und überprüfte den Fortschritt der Reaktion regelmäßig per DC.

2.6 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten aus *Streptomyces* sp. Tü 6071

Isolierung Phenalinolactone A - D (5, 24, 25, 26):

Die Phenalinolactone A - D konnten aus dem Kulturfiltrat des Stammes *Streptomyces* sp. Tü 6071 als weiße Feststoffe gewonnen werden. Die Aufarbeitung der Kulturen wurde wie unter Punkt B.2.2 beschrieben durchgeführt. Die Isolierung erfolgte durch Adsorptions-Chromatographie an LiChroprep Diol (40-63 µm; Merck; linearer Gradient CH_2Cl_2 – MeOH), Ausschluss-Chromatographie Sephadex LH-20 (Methanol, 85 x 3 cm) sowie präparativer RP-HPLC (Nucleosil-100, 10 µm, linearer Gradient 0.5 % HCOOH – MeOH). Die jeweiligen Ausbeuten schwankten zwischen 1 und 10 mg/L.

Phenalinolacton A (5):

$C_{38}H_{53}NO_{12}$ (715.3)

R_f-Wert: 0.23 (Chloroform/Methanol 9:1)

$[\alpha]_D^{20}$ = - 27.1° (c = 1.0 in Methanol)

ESI-MS (positive Ionen): m/z = 738.8 ($[M+Na]^+$, 22 %), 760.7 ($[M-H+2Na]^+$, 100 %).

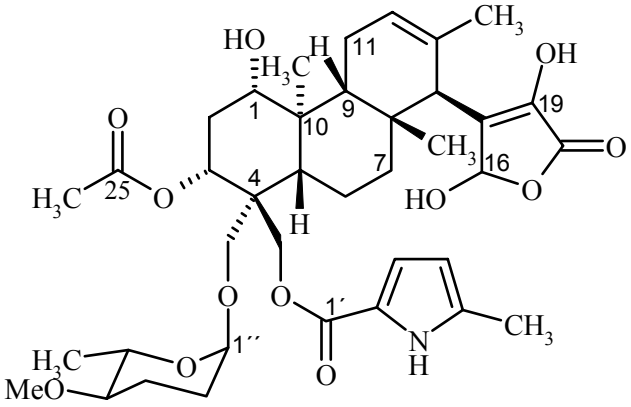
ESI-MS (negative Ionen): m/z = 714.3 ($[M-H]^-$, 100 %), 715.3 ([M], 38 %).

HRESI-MS (70 eV): 738.3465230 ($[M+Na]^+$), gefunden wie berechnet für $C_{38}H_{53}NO_{12}$.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3431 (br), 2955, 1756, 1719 (sh), 1689, 1622, 1489, 1461, 1433, 1383, 1322, 1261, 1222, 1150, 1122, 1089, 1063, 1017, 995 (sh), 956 (sh), 856, 800, 761, 572, 467 cm^{-1}.

UV (MeOH): λ_{max} (ε) = 275 (27528), 216 (5813) nm.
(MeOH/HCl): λ_{max} (ε) = 276 (24339), 243 (11569) nm.
(MeOH/NaOH): λ_{max} (ε) = 322 (779), 278 (36271), 224 (8308) nm.

CD (MeOH): λmax ([Θ]) = 281 (14382), 256 (-22441) nm.



^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H = 1.01 (s, 3H, 24-H_3), 1.09 (m, 1H, 7-H_a), 1.22 (dm, *J* = 11.5 Hz, 1H, 5-H), 1.27 (s, 3H, 22-H_3), 1.27 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, 6´´-H_3), 1.30 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 1.55 (m, 1H, 3´´-H_a), 1.62 (bs, 3H, 23-H_3), 1.65 (m, 1H, 7-H_b), 1.71 (m, 2H, 2-H_a, 2´´-H_a), 1.83 (dm, *J* = 13.5 Hz, 1H, 6-H_a), 1.90 (m, 3H, 2-H_b, 6-H_b, 2´-H_b), 2.06 (s, 3H, 26-H_3), 2.15 (m, 1H, 3´´-H_a), 2.32 (s, 3H, 6´-H_3), 2.35 (m, 1H, 11-H_a), 3.03 (ddd, *J* = 10.0, 9.0, 4.0 Hz, 1H, 4´´-H), 3.34 (dm, *J* = 19.0 Hz, 1H, 11-H), 3.40 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, 21-H_a),

3.39 (bs, 1H, 14-H), 3.52 (s, 3H, 7´´-H_3), 3.58 (m, 1H, 1-H), 3.89 (dq, *J* = 9.0, 6.0, 6.0, 6.0 Hz, 1H, 5´´-H), 3.95 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, 20-H_a), 4.38 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, 20-H_b), 4.63 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 1´´-H), 4.74 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, 19-H_b), 5.04 (dd, *J* = 12.0, 4.0 Hz, 1H, 3-H), 5.57 (bs, 1H, 12-H), 5.87 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, 16-H), 5.98 (dd, *J* = 3.0, 3.0 Hz, 1H, 4´-H), 6.27 (bs, 1H, OH), 6.84 (dd, *J* = 3.0, 3.0 Hz, 3´-H), 7.17 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, 16-OH), 9.24 (bs, 1H, NH) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, $CDCl_3$): δ_C = 10.3 (q, C-22), 13.2 (q, C-6´), 17.7 (q, C-6´´), 20.2 (t, C-6), 21.2 (q, C-26), 22.0 (q, C-23), 23.8 (t, C-3´´), 24.3 (t, C-11), 27.7 (q, C-24), 29.2 (t, C-2´´), 34.0 (t, C-2), 39.7 (s, C-8), 40.5 (t, C-7), 40.6 (d, C-14), 43.9 (s, C-10), 44.9 (s, C-4), 47.0 (d, C-5), 55.5 (d, C-9), 56.7 (q, C-7´´), 62.4, (t, C-20), 68.2 (t, C-21), 68.8 (d, C-5´´), 70.2 (d, C-3), 78.4 (d, C-1), 81.6 (d, C-4´´), 98.2 (d, C-1´), 98.4 (d, C-16), 109.1 (d, C-4´), 116.7 (d, C-3´), 120.7 (d, C-2´), 122.9 (C-12), 130.0 (s, C-15), 131.4 (s, C-13), 134.4 (s, C-5´), 139.2 (s, C-19), 160.5 (s, C-1´), 169.2 (s, C-18), 170.3 (s, C-25) ppm.

^{1}H-NMR (500 MHz, C_6D_6): δ_H = 1.03 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 1.07 (m, 1H, 7-H_a) 1.08 (s, 3H, 24-H_3), 1.17 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H, 5-H), 1.22 (m, 2H, 2´´-H_a, 3´´-H_a), 1.25 (s, 3H, 22-H_3), 1.26 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, 6´´-H_3), 1.34 (m, 1H, 2-H_a), 1.50 (m, 2H, 2´´-H_b, 3´´-H_b), 1.57 (dm, *J* = 4.0 Hz, 1H, 7-H_b), 1.59 (dd, *J* = 9.0, 4.5 Hz, 1H, 2-H_b), 1.74 (s, 6H, 26-H_3, 6´-H_3), 1.78 (m, 1H, 6-H_a), 1.84 (d, *J* = 2.0 Hz, 3H, 23-H_3), 1.91 (dm, *J* = 14.0 Hz, 1H, 6-H_b), 2.28 (dm, *J* = 19.0 Hz, 1H, 11-H_a), 2.53 (ddd, *J* = 9.5, 9.5, 4.0 Hz, 1H, 4´´-H), 2.92 (s, 3H, 7´´-H_3), 2.93 (m, 1H, 1-H), 3.29 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, 21-H_a), 3.46 (dm, *J* = 19.0 Hz, 1H, 11-H_b), 3.56 (bs, 1H, 14-H), 3.88 (dq, *J* = 9.0, 6.0, 6.0, 6.0 Hz, 1H, 5´´-H), 4.18 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, 20-H_b), 4.29 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, 21-H_b), 4.33 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 1´´-H), 5.00 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, 20-H_b), 5.17 (dd, *J* = 12.5, 4.5 Hz, 1H, 3-H), 5.57 (dm, *J* = 2.0 Hz, 1H, 12-H), 5.86 (m, 3H, 16-H, 4´-H, OH), 7.22 (dd, *J* = 3.5, 2.5 Hz, 3´-H), 8.90 (bs, 1H, NH) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, C_6D_6): δ_C = 10.7 (q, C-22), 12.7 (q, C-6´), 18.0 (q, C-6´´), 20.7 (q, C-26), 20.8 (t, C-6), 22.5 (q, C-23), 23.8 (t, C-3´´), 24.7 (t, C-11), 28.0 (q, C-24), 29.5 (t, C-2´´), 34.2 (t, C-2), 39.9 (s, C-8), 40.9 (d, C-14), 41.0 (t, C-7), 44.2 (s, C-10), 45.4 (s, C-4), 47.6 (d, C-5), 55.9 (d, C-9), 56.0 (q, C-7´´), 62.6, (t, C-20), 68.6 (t, C-21), 68.8 (d, C-5´´), 70.7 (d, C-3), 78.1 (d, C-1), 81.6 (d, C-4´´), 98.2 (d, C-1´), 98.7 (d, C-16), 109.1 (d, C-4´), 116.9 (d, C-3´), 121.4 (d, C-2´), 123.0 (d, C-12), 129.7 (s, C-15), 132.1 (s, C-13), 134.2 (s, C-5´), 139.7 (s, C-19), 160.8 (s, C-1´), 169.2 (s, C-18), 169.8 (s, C-25) ppm.

Phenalinolacton B (24):

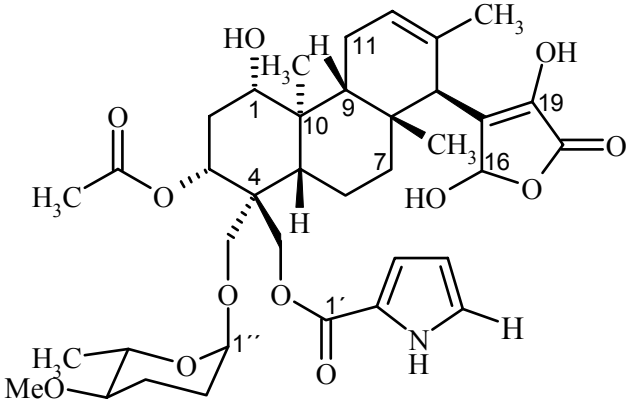
$C_{37}H_{51}NO_{12}$ (701.4)

R_f-Wert: 0.23 (Chloroform/Methanol 9:1)

ESI-MS (positive Ionen): m/z = 724.6 ($[M+Na]^+$, 100 %), 1447.2 ($[2M-H+2Na]^+$, 25 %).

ESI-MS (negative Ionen): m/z = 700.7 ($[M-H]^-$, 100 %), 701.4 ([M], 30 %).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3431 (br), 2955, 1756, 1719 (sh), 1689, 1622, 1489, 1461, 1433, 1383, 1322, 1261, 1222, 1150, 1122, 1089, 1063, 1017, 995 (sh), 956 (sh), 856, 800, 761, 572, 467 cm^{-1}.



^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H = 0.97 (s, 3H, 24-H_3), 1.04 (m, 1H, 7-H_a), 1.18 (dm, *J* = 9.0 Hz, 1H, 5-H), 1.21 (s, 3H, 22-H_3), 1.22 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, 6´´-H_3), 1.26 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 1.52 (m, 1H, 3´´-H_a), 1.58 (bs, 3H, 23-H_3), 1.62 (dm, *J* = 14.0 Hz 1H, 7-H_b), 1.69 (m, 2H, 2-H_a, 2´´-H_a), 1.79 (m, 2H, 6-H_a, 6-H_b), 1.86 (m, 2H, 2-H_b, 2´´-H_b), 2.01 (s, 3H, 26-H_3), 2.11 (m, 1H, 3´´-H_b), 2.30 (m, 1H, 11-H_a), 2.98 (ddd, *J* = 10.5, 10.5, 4.5 Hz, 1H, 4´´-H), 3.29 (dm, *J* = 20.0 Hz, 1H, 11-H_b), 3.35 (bs, 1H, 14-H), 3.36 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, 21-H_a), 3.47 (s, 3H, 7´´-H_3), 3.53 (m, 1H, 1-H), 3.84 (dq, *J* = 9.0, 6.0, 6.0, 6.0 Hz, 1H, 5´´-H), 3.93 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, 20-H_a), 4.34 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, 21-H_b), 4.59 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 1´´-H), 4.71 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, 20-H_b), 4.99 (dd, *J* = 12.5, 4.5 Hz, 1H, 3-H), 5.51 (bs, 1H, 12-H), 5.83 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, 16-H), 6.24 (ddd, *J* = 3.0, 2.5, 2.5 Hz, 1H, 3´-H), 6.35 (bs, 1H, OH), 6.90 (ddd, *J* = 3.5, 2.5, 1.5 Hz, 2´-H), 6.96 (ddd, *J* = 2.5, 2.5, 1.5 Hz, 1H, 5´-H), 7.13 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, 16-OH), 9.51 (bs, 1H, NH) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, $CDCl_3$): δ_C = 10.3 (q, C-22), 17.7 (q, C-6´´), 20.2 (t, C-6), 21.2 (q, C-26), 22.0 (q, C-23), 23.8 (t, C-3´´), 24.3 (t, C-11), 27.7 (q, C-24), 29.2 (t, C-2´´), 34.0 (t, C-2), 39.6 (s, C-8), 40.4 (t, C-7), 40.5 (d, C-14), 43.9 (s, C-10), 44.9 (s, C-4), 47.0 (d, C-5), 55.5 (d, C-9), 56.7 (q, C-7´´), 62.7, (t, C-20), 68.1 (t, C-21), 68.8 (d, C-5´´), 70.2 (d, C-3), 78.4 (d, C-1), 81.5 (d, C-4´´), 98.1 (d, C-1´), 98.4 (d, C-16), 110.5 (d, C-4´), 115.8 (d, C-3´), 122.2 (d, C-2´), 122.8 (d, C-12), 123.5 (s, C-4´), 130.0 (s, C-15), 131.4 (s, C-13), 139.3 (s, C-19), 160.6 (s, C-1´), 169.3 (s, C-18), 170.4 (s, C-25) ppm.

Phenalinolacton C (25):

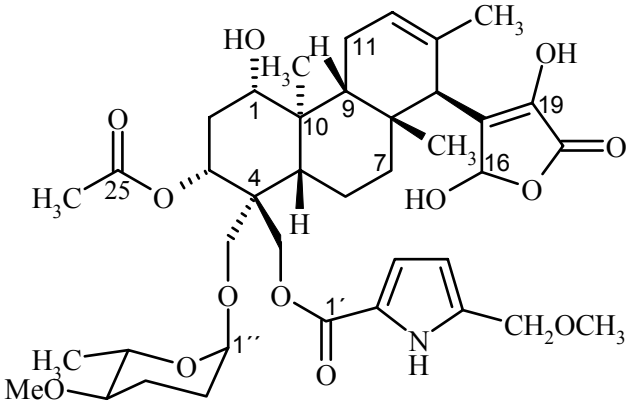
$C_{39}H_{57}NO_{13}$ (745.2)

R_f-Wert: 0.23 (Chloroform/Methanol 9:1)

ESI-MS (positive Ionen): m/z = 738.8 ($[M+Na]^+$, 22 %), 760.7 ($[M-H+2Na]^+$, 100 %).

ESI-MS (negative Ionen): m/z = 714.3 ($[M-H]^-$, 100 %), 715.3 ([M], 38 %).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3431 (br), 2955, 1756, 1719 (sh), 1689, 1622, 1489, 1461, 1433, 1383, 1322, 1261, 1222, 1150, 1122, 1089, 1063, 1017, 995 (sh), 956 (sh), 856, 800, 761, 572, 467 cm^{-1}.



^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H = 1.01 (s, 3H, 24-H_3), 1.09 (m, 1H, 7-H_a), 1.22 (dm, *J* = 11.5 Hz, 1H, 5-H), 1.27 (s, 3H, 22-H_3), 1.27 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, 6´´-H_3), 1.30 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 1.55 (m, 1H, 3´´-H_a), 1.62 (bs, 3H, 23-H_3), 1.65 (m, 1H, 7-H_b), 1.71 (m, 2H, 2-H_a, 2´´-H_a), 1.83 (dm, *J* = 13.5 Hz, 1H, 6-H_a), 1.90 (m, 3H, 2-H_b, 6-H_b, 2´-H_b), 2.06 (s, 3H, 26-H_3), 2.15 (m, 1H, 3´´-H_a), 2.35 (m, 1H, 11-H_a), 3.03 (ddd, *J* = 10.0, 9.0, 4.0 Hz, 1H, 4´´-H), 3.34 (dm, *J* = 19.0 Hz, 1H, 11-H), 3.35 (s, 2H, 6´-H), 3.39 (bs, 1H, 14-H), 3.40 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, 21-H_a), 3.52 (s, 3H, 7´´-H_3), 3.58 (m, 1H, 1-H), 3.89 (dq, *J* = 9.0, 6.0, 6.0, 6.0 Hz, 1H, 5´´-H), 3.95 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, 20-H_a), 4.38 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, 20-H_b), 4.45 (s, 2H, 6´-H), 4.63 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 1´´-H), 4.74 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, 19-H_b), 5.04 (dd, *J* = 12.0, 4.0 Hz, 1H, 3-H), 5.57 (bs, 1H, 12-H), 5.87 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, 16-H), 5.98 (dd, *J* = 3.0, 3.0 Hz, 1H, 4´-H), 6.27 (bs, 1H, OH), 6.84 (dd, *J* = 3.0, 3.0 Hz, 3´-H), 7.17 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, 16-OH), 9.24 (bs, 1H, NH) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, CDCl3): δ_C = 10.3 (q, C-22), 17.7 (q, C-6´´), 20.2 (t, C-6), 21.2 (q, C-26), 22.0 (q, C-23), 23.8 (t, C-3´´), 24.3 (t, C-11), 27.7 (q, C-24), 29.2 (t, C-2´´), 34.0 (t, C-2), 39.7 (s, C-8), 40.5 (t, C-7), 40.6 (d, C-14), 43.9 (s, C-10), 44.9 (s, C-4), 47.0 (d, C-5), 55.5 (d, C-9), 56.7 (q, C-7´´), 58.1 (t, C-7´), 62.4, (t, C-20), 67.0 (t, C-6´), 68.2 (t, C-21), 68.8 (d, C-5´´), 70.2 (d, C-3), 78.4 (d, C-1), 81.6 (d, C-4´´), 98.2 (d, C-1´), 98.4 (d, C-16), 109.7 (d, C-4´), 116.7 (d, C-3´), 120.7 (d, C-2´), 122.9 (d, C-12), 130.0 (s, C-15), 131.4 (s, C-13), 134.4 (s, C-5´), 139.2 (s, C-19), 160.5 (s, C-1´), 169.2 (s, C-18), 170.3 (s, C-25) ppm.

Phenalinolacton D (26):

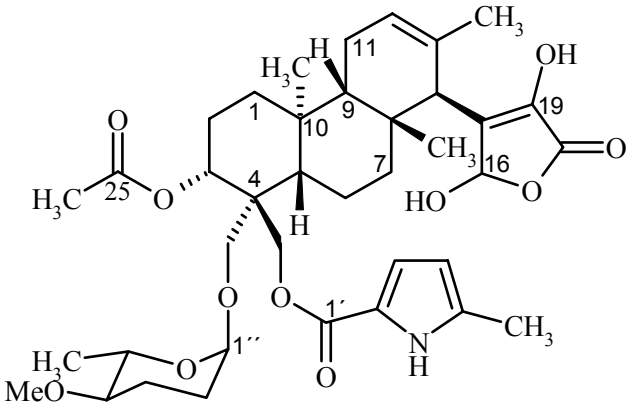
$C_{38}H_{53}NO_{11}$ (699.1)

R_f-Wert: 0.23 (Chloroform/Methanol 9:1)

ESI-MS (positive Ionen): m/z = 738.8 ($[M+Na]^+$, 22 %), 760.7 ($[M-H+2Na]^+$, 100 %).

ESI-MS (negative Ionen): m/z = 714.3 ($[M-H]^-$, 100 %), 715.3 ([M], 38 %).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3431 (br), 2955, 1756, 1719 (sh), 1689, 1622, 1489, 1461, 1433, 1383, 1322, 1261, 1222, 1150, 1122, 1089, 1063, 1017, 995 (sh), 956 (sh), 856, 800, 761, 572, 467 cm^{-1}.



^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H = 1.01 (s, 3H, 24-H_3), 1.09 (m, 2H, 1-H_a, 7-H_a), 1.14 (s, 3H, 22-H_3), 1.22 (dm, *J* = 11.5 Hz, 1H, 5-H), 1.27 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H, 6´´-H_3), 1.30 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 9-H), 1.55 (m, 1H, 3´´-H_a), 1.62 (bs, 3H, 23-H_3), 1.65 (m, 2H, 2-H_a, 7-H_b), 1.71 (m, 2H, 2-H_b, 2´´-H_a), 1.83 (m, 2H, 1-H_b, 6-H_a), 1.90 (m, 2H, 6-H_b, 2´-H_b), 2.06 (s, 3H, 26-H_3), 2.15 (m, 1H, 3´´-H_a), 2.32 (s, 3H, 6´-H_3), 2.35 (m, 1H, 11-H_a), 3.03 (ddd, *J* = 10.0, 9.0, 4.0 Hz, 1H, 4´´-H), 3.34 (dm, *J* = 19.0 Hz, 1H, 11-H), 3.40 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, 21-H_a), 3.39 (bs, 1H, 14-H), 3.52 (s, 3H, 7´´-H_3), 3.89 (dq, *J* = 9.0, 6.0, 6.0, 6.0 Hz, 1H, 5´´-H), 3.95 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, 20-H_a), 4.38 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, 20-H_b), 4.63 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, 1´´-H), 4.74 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, 19-H_b), 5.04 (dd, *J* = 12.0, 4.0 Hz, 1H, 3-H), 5.57 (bs, 1H, 12-H), 5.87 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, 16-H), 5.98 (dd, *J* = 3.0, 3.0 Hz, 1H, 4´-H), 6.27 (bs, 1H, OH), 6.84 (dd, *J* = 3.0, 3.0 Hz, 3´-H), 7.17 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, 16-OH), 9.24 (bs, 1H, NH) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, CDCl3): δ_C = 13.2 (q, C-6´), 14.3 (q, C-22), 17.7 (q, C-6´´), 20.2 (t, C-6), 21.2 (q, C-26), 22.0 (q, C-23), 23.4 (t, C-2), 23.8 (t, C-3´´), 24.3 (t, C-11), 27.7 (q, C-24), 29.2 (t, C-2´´), 38.2 (d, C-1), 38,4 (s, C-10), 39.7 (s, C-8), 40.5 (t, C-7), 40.6 (d, C-14), 44.9 (s, C-4), 49.1 (d, C-5), 55.5 (d, C-9), 56.7 (q, C-7´´), 62.4, (t, C-20), 68.2 (t, C-21), 68.8 (d, C-5´´), 73.9 (d, C-3), 81.6 (d, C-4´´), 98.2 (d, C-1´), 98.4 (d, C-16), 109.1 (d, C-4´), 116.7 (d, C-3´), 120.7 (d, C-2´), 122.9 (d, C-12), 130.0 (s, C-15), 131.4 (s, C-13), 134.4 (s, C-5´), 139.2 (s, C-19), 160.5 (s, C-1´), 169.2 (s, C-18), 170.3 (s, C-25) ppm.

3. *Streptomyces cellulosae* subsp. *griseorubiginosus* S 1013

3.1 Stammhaltung

Langzeiterhaltung:

Die Langzeiterhaltung erfolgte wie unter Punkt 1.3 beschrieben als Glycerineinlagerung, als Sporen-Lyophilisat sowie über N_2.

Stammhaltung:

Zur Lagerung wurde der Stamm S 1013 auf Agar-Platten mit dem Nährmedium SM ausgestrichen. Es war darauf zu achten, dass die Platten nur etwa zweimal überimpft werden durften, da mit zu alten Kulturen keine Produktion mehr zu verzeichnen war. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

3.2 Kultivierung und Standardaufarbeitung

Vorkulturen:

Man verwendete 300 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikane, die mit jeweils 100 mL NL SM gefüllt wurden. Nach Sterilisation und Beimpfen mit 1 cm^2 einer gut bewachsenen Agarplatte verschloss man mit einer Schaumstoffkappe und inkubierte 72 h bei 30 °C und 180 Upm.

Kultivierung in Schüttelkulturen:

Jeweils 100 mL NL 1147 mit 1 g/L NaBr als Zusatz wurden in 300 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikane gegeben, sterilisiert und mit 1.5 mL einer 72 h alten Vorkultur beimpft. Mit Schaumstoffkappen verschlossen inkubierte man sechs Tage bei 30 °C und 180 Upm.

Kultivierung im Biostat E Fermenter:

Die Fermentation erfolgte im 15 L Gefäß mit 10 L NL 1147 Medium unter Zusatz von 1 g/L NaBr (kein Entschäumer). Beimpft wurde mit 800 mL einer 72 h alten Vorkultur. Fermentationsbedingungen: 6 d bei 30 °C, 200 Upm, 1 vvm Belüftung und pH-Regulation 6.2 ± 1.5.

Kultivierung in Penicillin-Kolben:

In 3 L Penicillin-Kolben gab man jeweils 1 L NL 1147 (Zusatz 1 g/L NaBr), beimpfte diese mit je 15 mL einer 72 h alten Vorkultur und inkubierte 30 d bei 28 °C.

Standardaufarbeitung

Zur Standardaufarbeitung stellte man den pH-Wert der Kulturbrühe auf einen Wert von 4.0 ein. Durch Zentrifugation trennte man in Kulturfiltrat und Myzel. Das Kulturfiltrat wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und anschließend lyophilisiert. Das Myzel schloss man in Aceton 15 min lang im Ultraschallbad auf, filtrierte ab und engte die flüssige Phase im Vakuum ein.

3.3 Wachstumskurve und Ausbeutebestimmung mittels HPLC

Zur Eichung der HPLC erstellte man von Hexacyclinsäure (**4**) eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 2, 1, 0.5, 0.25 und 0.125 mg/mL. Diese wurden mittels HPLC vermessen und die gewonnenen Daten in einer Eichkurve aufgetragen (Integralfläche [mV x min] vs. Menge [mg/mL]).

Wachstumskurve und Ausbeutebestimmungen:

Zur Aufnahme des zeitabhängigen Produktionsverlaufs der Hexacyclinsäure für Kultivierungen unter [$^{18}O_2$]Atmosphäre wurde der Stamm S 1013 in 300 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen kultiviert (100 mL Nährlösung 1147, Zusatz 1 g/L NaBr). Ab der 21. Stunde wurde zunächst alle 24 h, ab der 48. Stunde alle 12 h ein Kolben entnommen und ohne vorherige Trennung in Myzel und Kulturfiltrat lyophilisiert. Alle Proben wurden 15 Minuten lang mit 3 mL Methanol (p.a.) im Ultraschallbad aufgeschlossen. Der Lösung entnahm man 0.6 mL, füllte diese in Eppendorf-Caps und zentrifugierte. Die Proben wurden anschließend mittels analytischer HPLC auf die Menge an enthaltener Hexacyclinsäure untersucht. Die den Peakdaten entsprechenden Konzentrationsmengen entnahm man der Eichkurve und bestimmte per Hochrechnung die jeweilige Ausbeute.

Zur Ermittlung von Ausbeuten nahm man das zu untersuchende lyophilisierte Kulturfiltrat in einem entsprechend größeren Lösungsmittelvolumen auf und bestimmte die darin enthaltene Menge an Hexacyclinsäure (**6**) wie zuvor beschrieben.

3.4 Durchführung von Fütterungsexperimenten

Für die Fütterungen wurde der Stamm S 1013 unter den in Punkt B.2.2 genannten Bedingungen in zehn Erlenmeyerkolben mit je 100 mL Nährlösung fermentiert. Die markierten Vorläufer (800 mg) wurden in sterilem Wasser gelöst, mit 0.5 M HCl neutralisiert und ab der 80. Stunde im Pulse-Feeding Verfahren (jeweils 1 mL Portionen zur 80., 88., 96., 104. und 112. Stunde nach Fermentationsbeginn) zugegeben. Ernte erfolgte nach der 125. Stunde in der unter Punkt B.3.2 beschriebenen Weise.

Die spezifischen ^{13}C-Einbauraten sind in Tabelle 3 (Anhang) wiedergegeben.

Kultivierung unter [$^{18}O_2$]-Atmosphäre

Die Kultivierung in einer [$^{18}O_2$]-Atmosphäre erfolgte in geschlossener Apparatur. Acht Erlenmeyerkolben mit Kugelschliff und drei Schikanen wurden dazu mit je 100 mL NL1147 (Zusatz 1 g/L NaBr) befüllt, sterilisiert und mit 1.5 mL einer drei Tage alten Vorkultur angeimpft. Man ließ bei 28 °C, 250 Upm und 2.0 vvm fermentieren. Nach 80 h wurde die Apparatur dreimal mit Stickstoff gespült und das [$^{18}O_2$]-Gas eingeleitet. Man ließ bis zur 125. Stunde fermentieren. Aufarbeitung der Kulturbrühe und Isolierung der Hexacyclinsäure erfolgten wie unter Punkt B.3.2 beschrieben.

3.5 Chemische Modifikation der Hexacyclinsäure

Darstellung von methanolischer Salzsäure:

Wasserfreie, methanolische HCl bereitete man bei 0 °C durch langsames Lösen von 28.4 mL (0.4 mol) Acetylchlorid in 100 mL Methanol (p.a.). Die freigesetzte Salzsäure war ca. 4 molar, der Säuregehalt konnte per Titration mit 0.1 M Natronlauge und Phenolphthalein als Indikator bestimmt werden.

Acetylierung von Hexacyclinsäure:

Man löste 10 mg Hexacyclinsäure (**6**) in 1 mL Pyridin und versetzte mit 2 mL frisch destilliertem Acetanhydrid. Die Reaktionslösung wurde 8 – 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, bis im Dünnschichtchromatogramm eine definierte Umsetzung zu beobachten war. Man hydrolysierte mit 5 mL Eiswasser und extrahierte dreimal mit Chloroform. Die

vereinigten Phasen engte man im Vakuum ein und entfernte Reste von Pyridin azeotrop mit Toluol.

Reaktion von Hexacyclinsäure mit 2 M methanolischer NaOH:

Man löste 10 mg Hexacyclinsäure (**6**) in 2 mL wasserfreier methanolischer Natronlauge und ließ die Reaktionslösung bis zur vollständigen Umsetzung bei Raumtemperatur rühren. Nach Neutralisation mit 0.5 M Salzsäure engte man das Lösungsmittel im Vakuum ein.

Reaktion von Hexacyclinsäure mit p-Toluolsulfonsäure:

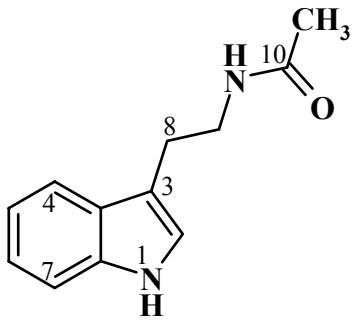
Zur Reaktion mit p-Toluolsulfonsäure löste man 10 mg Hexacyclinsäure (**6**) in 2 mL trockenem Dichlormethan und versetzte mit 10 mg trockener p-Toluolsulfonsäure. Die Reaktionslösung lies man vier Tage rühren, bis im DC eine etwa 30 %ige Umsetzung von **6** zu beobachten war. Das Lösungsmittel entfernte man im Vakuum.

3.6 Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten aus S 1013

N-Acetyl-tryptamin (42):

N-Acetyltryptamin (**42**) konnte als weißer Feststoff aus Ruhekulturen des Stammes S 1013 erhalten werden. Die Aufarbeitung der Kulturbrühe wurde wie unter Punkt B.3.2 beschrieben durchgeführt, die Isolierung erfolgte über Chromatographie an Kieselgel (Flash-Chromatographie, Chloroform 9:1, 20 x 2.5 cm), Sephadex LH-20 (Methanol, 85 x 3 cm) und Kieselgel (Flash-Chromatographie, Chloroform/Methanol 9:1, 20 x 2.5 cm). Die Ausbeute betrug 3.1 mg/L.

$C_{12}H_{14}N_2O$ (202.3)



Schmelzpunkt: 150 °C (Zersetzung)

R_f-Wert: 0.32 (Chloroform/Methanol 9:1)

$[\alpha]_D^{20}$ = + 0.93° (c = 1.1 in Methanol)

ESI-MS (positive Ionen): m/z = 225.4 ($[M+Na]^+$, 100 %).

ESI-MS (negative Ionen): m/z = 201.6 ($[M-H]^-$, 100 %).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3405, 3400 (br), 2926, 1650, 1636, 1558, 1543, 1456, 1434, 1367 (br), 1295(br), 1229, 1200, 745, 602 cm^{-1}.

UV (MeOH): λ_{max} (ε) = 290 (5274), 281 (6097), 222 (35724) nm.
(MeOH/HCl): λ_{max} (ε) = 290 (5311), 281 (6172), 221 (35537) nm.
(MeOH/NaOH): λ_{max} (ε) = 290 (5349), 281 (6154), 221 (36472) nm.

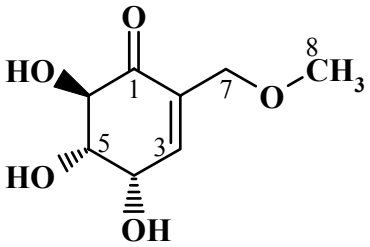
^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H = 1.95 (s, 3H, 11-H_3), 3.00 (t, *J* = 6.0, 2H, 8-H_2), 3.63 (ddd, *J* = 6.0, 6.0, 6.0, 2H, 9-H_2), 5.58 (bs, 1H, NH), 7.06 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 2-H), 7.16 (dd, *J* = 8.0, 7.5 Hz, 1H, 6-H), 7.24 (dd, *J* = 8.0, 7.5 Hz, 1H, 5-H), 7.41 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 4-H), 7.65 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, 7-H), 8.22 (bs, 1H, 1-NH) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, $CDCl_3$): δ_C = 23.4 (q, C-11), 25.3 (t, C-8), 39.8 (t, C-9), 111.3 (d, C-4), 113.0 (s, C-3), 118.7 (d, C-7), 119.5 (d, C-6), 122.0 (d, C-2), 122.2 (d, C-5), 127.3 (s, C-7a), 136.4 (s, C-3a), 170.1 (s, C-10) ppm.

7-*O*-Methyl-gabosin E (43):

(**43**) wurde als leicht gelblicher Feststoff aus einer Fermentation des Stammes S 1013 unter [$^{18}O_2$]-Atmosphäre erhalten. Die Aufarbeitung der Kulturbrühe wurde wie unter Punkt B.3.2 beschrieben durchgeführt, die Isolierung erfolgte über Chromatographie an Kieselgel (Flash-Chromatographie, Chloroform 9:1, 20 x 2.5 cm), Sephadex LH-20 (Methanol, 85 x 3 cm) und Kieselgel (Flash-Chromatographie, Chloroform/Methanol 9:1, 20 x 2.5 cm). Die Ausbeute betrug 2.0 mg/L.

$C_8H_{12}O_5$ (188.3)



Schmelzpunkt: 172 °C (Zersetzung)

R_f-Wert: 0.12 (Chloroform/Methanol 9:1)

$[\alpha]_D^{20}$ = + 92.6° (1.1 in Methanol)

ESI-MS (positive Ionen): m/z = 211.5 ($[M+Na]^+$, 100 %).

ESI-MS (negative Ionen): m/z = 187.6 ($[M-H]^-$, 100 %).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3354 (br), 2925, 2359, 1686, 1406, 1197, 1139, 1092, 1056, 892, 838 cm^{-1}.

UV (MeOH): λ_{max} (ε) = 218 (4992) nm.

(MeOH/HCl): λ_{max} (ε) = 349 (34), 220 (5094) nm.

(MeOH/NaOH): λ_{max} (ε) = 313 (817), 204 (8247) nm.

CD (MeOH): λmax ([Θ]) = 241 (16340) nm.

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H = 3.36 (s, 3H, 8-H_3), 3.79 (dd, *J* = 9.5, 4.0 Hz, 1H, 5-H), 4.07 (d, *J* = 1.0 Hz, 2H, 7-H_2), 4.35 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, 6-H), 4.49 (dd, *J* = 5.5, 4.0 Hz, 1H, 4-H), 6.91 (ddd, *J* = 5.5, 1.0, 1.0 Hz, 1H, 3-H) ppm.

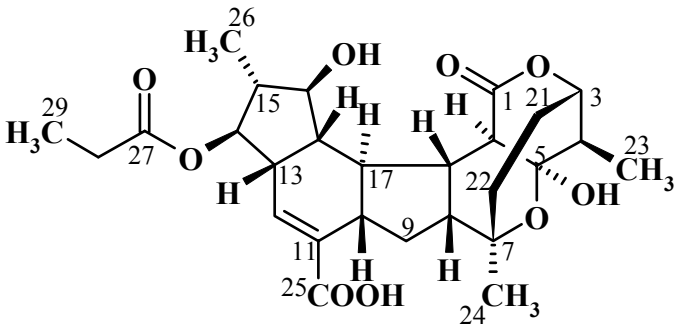
^{13}C-NMR (125.7 MHz, $CDCl_3$): δ_C = 58.9 (t, C-7), 67.0 (d, C-4), 69.5 (q, C-8), 73.7 (d, C-5), 75.0 (d, C-6), 136.9 (d, C-3), 143.4 (s, C-2), 199.3 (s, C-1) ppm.

14-Desacetyl-14-propionyl-hexacyclinsäure (44):

Bei einer Fütterung von [1-^{13}C, $^{18}O_2$]-markiertem Propionat wurde die 14-Desacetyl-14-propionyl-hexacyclinsäure (**44**) in einem Gemisch mit Hexacyclinsäure (**6**) aus dem Kulturfiltrat des Stammes S 1013 erhalten. Die Aufarbeitung der Kulturen wurde wie unter Punkt B.3.2 beschrieben durchgeführt, die Isolierung erfolgte über Chromatographie an Kieselgel (Flash-Chromatographie, Chloroform 9:1, 20 x 2.5 cm), Sephadex LH-20 (Methanol, 85 x 3 cm) und Kieselgel (Flash-Chromatographie, Chloroform/Methanol 9:1, 20 x 2.5 cm). Die Ausbeute des Gemisches betrug ca. 0.8 mg/L.

$C_{27}H_{36}O_9$ (502.2)

R_f-Wert: 0.23 (Chloroform/Methanol 9:1)

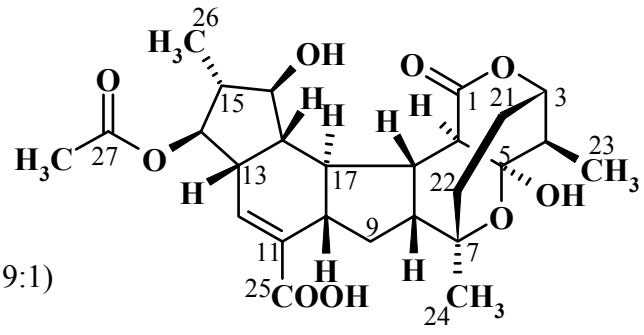


^{1}H-NMR (500 MHz, Pyridin-d_5): δ_H = 1.08 (s, 3H, 24-H_3), 1.15 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 23-H_3), 1.19 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 29-H_3), 1.20 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 26-H_3), 1.56 (dm, J = 16.0 Hz, 1H, 22-H_a), 1.66 (m, 1H, 22-H_b), 1.74 (m, 1H, 21-H_a), 1.80 (ddd, J = 12.0, 12.0, 12.0 Hz, 1H, 9-H_a), 1.94 (m, 1H, 21-H_b), 2.12 (ddd, J = 12.0, 12.0, 6.5 Hz, 1H, 8-H), 2.22 (m, 1H, 10-H), 2.28 (dq, J = 6.5, 6.5, 6.5, 3.5 Hz, 1H, 4-H), 2.38 (ddq, J = 10.0, 10.0, 6.5, 6.5, 6.5 Hz, 1H, 15-H), 2.57 (m, 2H, 17-H, 18-H), 2.81 (ddd, J = 12.0, 6.5, 5.5 Hz, 1H, 9-H_b), 3.12 (m, 1H, 13-H), 3.24 (t, J = 12.0 Hz, 1H, 19-H), 3.98 (s, 1H, 20-H), 4.19 (dd, J = 10.0, 6.0 Hz, 1H, 16-H), 4.43 (ddd, J = 3.5, 3.5, 3.5 Hz, 1H, 3-H), 5.02 (dd, J = 10.0, 10.0 Hz, 1H, 14-H), 7.29 (t, J = 3.0 Hz, 1H, 12-H) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, Pyridin-d_5): δ_C = 8.8 (q, C-23), 14.7 (q, C-26), 20.9 (q, C-28), 23.6 (t, C-21), 27.2 (q, C-24), 31.9 (t, C-9), 35.5 (t, C-22), 42.3 (d, C-10), 42.8 (d, C-19), 45.0 (d, C-4), 45.7 (d, C-13), 46.1 (d, C-8), 47.8 (d, C-15), 48.3 (d, C-20), 50.2 (d, C-17), 53.2 (d, C-18), 72.9 (s, C-7), 78.9 (d, C-3), 80.0 (d, C-14), 80.4 (d, C-16), 95.4 (s, C-5), 136.4 (s, C-11), 139.0 (d, C-12), 169.0 (s, C-25), 170.8 (s, C-27), 177.0 (s, C-1) ppm.

Hexacyclinsäure (6):

Hexacyclinsäure (**6**) konnte als weißer, kristalliner Feststoff aus dem Kulturfiltrat des Stammes S 1013 erhalten werden. Die Aufarbeitung der Kulturen wurde wie unter Punkt B.3.2 beschrieben durchgeführt, die Isolierung erfolgte über Chromatographie an Kieselgel (Flash-Chromatographie, Chloroform 9:1, 20 x 2.5 cm), Sephadex LH-20 (Methanol, 85 x 3 cm) und Kieselgel (Flash-Chromatographie, Chloroform/Methanol 9:1, 20 x 2.5 cm). Die Ausbeuten schwankten dabei zwischen 1 und 20 mg/L.



$C_{26}H_{34}O_9$ (490.5)

Schmelzpunkt: 173 °C

R_f-Wert: 0.23 (Chloroform/Methanol 9:1)

$[\alpha]_D^{20}$ = + 80.9° (c = 0.84 in Methanol)

EI-MS (70 eV): m/e = 490 ($[M]^+$, 8 %), 430 ($[M - CH_3COOH]^+$, 100 %), 412 ($[M - CH_3COOH - H_2O]^+$, 76 %).

HREI-MS (70 eV): 490.2202 gefunden wie berechnet für $C_{26}H_{34}O_9$.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3441 (br), 2935, 1702 (br), 1626 (sh), 1383, 1255, 1210 (sh), 1120 (sh), 1089, 1031 cm^{-1}.

UV (MeOH): λ_{max} (ε) = 213 (7125) nm.
(MeOH/HCl): λ_{max} (ε) = 218 (8550) nm.
(MeOH/NaOH): λ_{max} (ε) = 206 (6555) nm.

CD (MeOH): λmax ([Θ]) = 230 (+ 11210) nm.

^{1}H-NMR (500 MHz, Pyridin-d_5): δ_H = 1.08 (s, 3H, 24-H_3), 1.15 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 23-H_3), 1.20 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 26-H_3), 1.56 (dm, *J* = 16.0 Hz, 1H, 22-H_a), 1.66 (m, 1H, 22-H_b), 1.74 (m, 1H, 21-H_a), 1.80 (ddd, *J* = 12.0, 12.0, 12.0 Hz, 1H, 9-H_a), 1.94 (m, 1H, 21-H_b), 2.04 (s, 3H, 28-H_3), 2.12 (ddd, *J* = 12.0, 12.0, 6.5 Hz, 1H, 8-H), 2.22 (m, 1H, 10-H), 2.28 (dq, *J* = 6.5, 6.5, 6.5, 3.5 Hz, 1H, 4-H), 2.38 (ddq, *J* = 10.0, 10.0, 6.5, 6.5, 6.5 Hz, 1H, 15-H), 2.57 (m, 2H, 17-H, 18-H), 2.81 (ddd, 12.0, 6.5, 5.5 Hz, 1H, 9-H_b), 3.12 (m, 1H, 13-H), 3.24 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H, 19-H), 3.98 (s, 1H, 20-H), 4.19 (dd, *J* = 10.0, 6.0 Hz, 1H, 16-H), 4.43 (ddd, *J* = 3.5, 3.5, 3.5 Hz, 1H, 3-H), 5.02 (dd, *J* = 10.0, 10.0 Hz, 1H, 14-H), 7.29 (t, *J* = 3.0 Hz, 1H, 12-H) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, Pyridin-d_5): δ_C = 8.8 (q, C-23), 14.7 (q, C-26), 20.9 (q, C-28), 23.6 (t, C-21), 27.2 (q, C-24), 31.9 (t, C-9), 35.5 (t, C-22), 42.3 (d, C-10), 42.8 (d, C-19), 45.0 (d, C-4), 45.7 (d, C-13), 46.1 (d, C-8), 47.8 (d, C-15), 48.3 (d, C-20), 50.2 (d, C-17), 53.2 (d, C-18), 72.9 (s, C-7), 78.9 (d, C-3), 80.0 (d, C-14), 80.4 (d, C-16), 95.4 (s, C-5), 136.4 (s, C-11), 139.0 (d, C-12), 169.0 (s, C-25), 170.8 (s, C-27), 177.0 (s, C-1) ppm.

^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): δ_H = 1.02 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 26-H_3), 1.08 (d, *J* = 6.9, 3H, 23-H_3), 1.15 (s, 3H, 24-H_3), 1.46 (m, 1H, 22-H_b), 1.49 (ddd, *J* = 12.0, 12.0, 12.0 Hz, 1H, 9-H_b), 1.74 (dm, 1H, 22-H_a), 1.83 (m, 1H, 21-H_a), 1.95-2.07 (m, 4H, 21-H_b, 10-H, 15-H, 18-H), 2.11 (s, 3H, 28-H_3), 2.13-2.26 (m, 3H, 4-H, 8-H, 17-H), 2.41 (ddd, *J* = 11.5, 6.5, 6.5 Hz, 1H, 9-H_b), 2.83 (dd, *J* = 11.5, 10.5 Hz, 1H, 19-H), 2.93 (dddd, *J* = 10.0, 10.0, 2.5, 2.5 Hz, 1H, 13-H), 3.20 (sbr, 1H, 20-H), 3.68 (dd, *J* = 10.0, 6.1 Hz, 1H, 16-H), 4.50 (ddd, *J* = 3.5, 3.5, 3.5 Hz, 1H, 3-H), 4.65 (dd, *J* = 10.0, 10.0 Hz, 1H, 14-H), 6.65 (dd, *J* = 2.5, 2.5 Hz, 1H, 12-H) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, CD_3OD): δ_C = 8.6 (q, C-23), 14.6 (q, C-26), 20.9 (q, C-28), 24.2 (t, C-21), 27.5 (q, C-24), 32.3 (t, C-9), 36.2 (t, C-22), 43.0 (d, C-10), 43.5 (d, C-19), 45.7 (d, C-4), 46.2 (d, C-13), 46.9 (d, C-8), 48.2 (d, C-15), 49.3 (d, C-20), 50.5 (d, C-17), 53.6 (d, C-18), 74.1 (s, C-7), 80.6 (d, C-14), 80.7 (d, C-3), 81.0 (d, C-16), 95.9 (s, C-5), 137.5 (s, C-11), 138.7 (d, C-12), 171.1 (s, C-25), 172.8 (s, C-27), 177.0 (s, C-1) ppm.

3.7 Isolierung und Charakterisierung der Hexycyclinsäure-Derivate

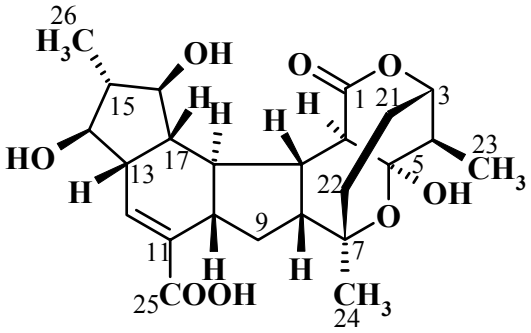
14-Desacetyl-hexacyclinsäure (69):

Die Reaktion von Hexacyclinsäure (**6**) in 2 M methanolischer Natronlauge (s. B.3.5) führte mit einer Ausbeute von 35 % zu **69**. Durch Chromatographie an Kieselgel (Flash-Chromatographie, Chloroform 9:1, 20 x 2.0 cm) und Sephadex LH-20 (Methanol, 35 x 3.5 cm) ließ sich **69** von nicht umgesetztem **6** abtrennen.

Durch die Umsetzung von Hexacyclinsäure (**6**) mit p-Toluolsulfonsäure in Dichlormethan (s B.3.5) konnte nach vier Tagen Reaktionszeit ebenfalls 14-Desacetyl-hexacyclinsäure (**69)** in Ausbeuten von 10 % erhalten werden. Die Aufreinigung zur Reinsubstanz erfolgte wie oben für **69** beschrieben.

$C_{24}H_{32}O_8$ (448.5)

Schmelzpunkt: 218 °C



R_f-Wert: 0.07 (Chloroform/Methanol 9:1)

$[\alpha]_D^{20}$ = + 74.77° (c = 1.1 in Methanol)

ESI-MS (positive Ionen): m/z = 493.3 ($[M-H+2Na]^+$, 22 %), 919.2 ($[2M+Na]^+$, 100 %).

ESI-MS (negative Ionen): m/z = 447.6 ($[M-H]^-$, 100 %), 895.4 ($[2M-H]^-$, 54 %).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3412 (br), 2920, 1709, 1621, 1384, 1622, 1384, 1260, 1206, 1088, 1032, 1009, 556 cm^{-1}.

UV (MeOH): λ_{max} (ε) = 303 (4847), 253 (6068) nm.

(MeOH/HCl): λ_{max} (ε) = 328 (6190), 321 (6679), 295(7087), 283 (6842) nm.

(MeOH/NaOH): λ_{max} (ε) = 253 (4969), 228 (8268) nm.

CD (MeOH): λmax ([Θ]) = 233 (15789), 224 (15189) nm.

^{1}H-NMR (500 MHz, Pyridin-*d*5): δ_H = 1.08 (s, 3H, 24-H_3), 1.15 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 23-H_3), 1.20 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 26-H_3), 1.56 (dm, *J* = 16.0 Hz, 1H, 22-H_a), 1.66 (m, 1H, 22-H_b), 1.74 (m, 1H, 21-H_a), 1.80 (ddd, *J* = 12.0, 12.0, 12.0 Hz, 1H, 9-H_a), 1.94 (m, 1H, 21-H_b), 2.04 (s, 3H, 28-H_3), 2.12 (m 2H, 8-H, 18-H), 2.22 (m, 1H, 10-H), 2.28 (dq, *J* = 6.5, 6.5, 6.5, 3.5 Hz, 1H, 4-H), 2.38 (ddq, *J* = 10.0, 10.0, 6.5, 6.5, 6.5 Hz, 1H, 15-H), 2.50 (ddd, *J* = 11.5, 11.5, 6.5 Hz, 1H, 17-H), 2.81 (ddd, 12.0, 6.5, 5.5 Hz, 1H, 9-H_b), 3.12 (m, 1H, 13-H), 3.24 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H, 19-H), 3.64 (m, 1H, 16-H), 3.84 (s, 1H, 20-H), 3.93 (m, 1H, 14-H) 4.43 (ddd, *J* = 3.5, 3.5, 3.5 Hz, 1H, 3-H), 7.47 (t, *J* = 3.0 Hz, 1H, 12-H) ppm.

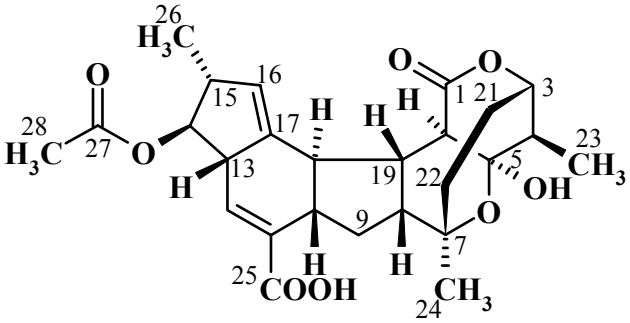
^{13}C-NMR (125.7 MHz, Pyridin-d_5): δ_C = 8.8 (q, C-23), 14.7 (q, C-26), 20.9 (q, C-28), 23.6 (t, C-21), 27.2 (q, C-24), 31.9 (t, C-9), 35.5 (t, C-22), 42.3 (d, C-10), 42.8 (d, C-19), 45.0 (d, C-4), 46.1 (d, C-8), 48.3 (d, C-20), 49.2 (d, C-13), 49.8 (d, C-17), 50.3 (d, C-15), 53.2 (d, C-18), 72.9 (s, C-7), 78.9 (d, C-3), 79.0 (d, C-14), 81.3 (d, C-16), 95.4 (s, C-5), 136.4 (s, C-11), 139.0 (d, C-12), 169.0 (s, C-25), 170.8 (s, C-27), 177.0 (s, C-1) ppm.

16,17-Anhydrohexacyclinsäure (70):

Das dehydratisierte Hexacyclinsäure-Derivat **70** ließ sich aus Hexacyclinsäure (**6**) in einer Acetylierungsreaktion mit verlängerter Reaktionsdauer erhalten (s. B.3.5). Die Reaktionsdauer betrug drei Tage. Durch Chromatographie an Kieselgel (Flash-Chromatographie, Chloroform 9:1, 20 x 2.0 cm) und Sephadex LH-20 (Methanol, 35 x 3.5 cm) konnte **70** in Ausbeuten von 35 % aufgereinigt werden.

$C_{26}H_{32}O_8$ (472.3)

Schmelzpunkt: 172 °C



R_f-Wert: 0.36 (Chloroform/Methanol 9:1)

$[\alpha]_D^{20}$ = + 82.22° (c = 3.6 in Methanol)

ESI-MS (positive Ionen): m/z = 495.4 ($[M+Na]^+$, 10 %), 967.1 ($[2M+Na]^+$, 100 %).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ =3445 (br), 2936, 2360, 2342, 1717 (br), 1625, 1382, 1260, 1203, 1085, 1049, 1009, 668 cm^{-1}.

UV (MeOH): λ_{max} (ε) = 271 (12093) nm.
(MeOH/HCl): λ_{max} (ε) = 275 (14394) nm.
(MeOH/NaOH): λ_{max} (ε) = 268 (9401) nm.

CD (MeOH): λmax ([Θ]) = 274 (26682), 232 (1356) nm.

^{1}H-NMR (500 MHz, CD_3OD): δ_H = 1.08 (s, 3H, 24-H_3), 1.15 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 23-H_3), 1.12 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 26-H_3), 1.56 (dm, *J* = 16.0 Hz, 1H, 22-H_a), 1.66 (m, 1H, 22-H_b), 1.74 (m, 1H, 21-H_a), 1.80 (ddd, *J* = 12.0, 12.0, 12.0 Hz, 1H, 9-H_a), 1.94 (m, 1H, 21-H_b), 2.04 (s, 3H, 28-H_3), 2.12 (m 1H, 8-H), 2.22 (m, 1H, 10-H), 2.28 (m, 2H, 4-H, 17-H), 2.38 (ddq, *J* = 10.0, 10.0, 6.5, 6.5, 6.5 Hz, 1H, 15-H), 2.81 (ddd, 12.0, 6.5, 5.5 Hz, 1H, 9-H_b), 2.9 (m, 2H, 13-H, 16-H), 3.24 (t, *J* = 12.0 Hz, 1H, 19-H), 3.84 (s, 1H, 20-H), 4.43 (ddd, *J* = 3.5, 3.5, 3.5 Hz, 1H, 3-H), 5.27 (m, 1H, 14-H), 7.09 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, 12-H) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, CD_3OD): δ_C = 8.6 (q, C-23), 18.2 (q, C-26), 20.9 (q, C-28), 24.2 (t, C-21), 27.5 (q, C-24), 32.3 (t, C-9), 36.2 (t, C-22), 43.0 (d, C-10), 43.5 (d, C-19), 45.7 (d, C-4), 46.9 (d, C-8), 48.4 (d, C-13), 49.3 (d, C-20), 53.6 (d, C-18), 54.4 (d, C-15), 74.1 (s, C-7), 80.7 (d, C-3), 85.0 (d, C-14), 95.9 (s, C-5), 133.7 (d, C-12), 135.5 (d, C-16), 136.1 (s, C-11), 141.5 (s, C-17), 171.1 (s, C-25), 172.8 (s, C-27), 177.0 (s, C-1) ppm.

4. Chemisches Screening:

4.1 Durchführung des chemischen Screenings

Langzeiterhaltung:
Im chemischen Screening als interessant beurteilte Stämme wurden über N_2 gelagert.

Stammhaltung:
Die Stammhaltung erfolgte je nach Wachstum des Stammes auf verschiedenen Agar-Medien. Lagerung der bewachsenen Platten erfolgte bei 4 °C. Spätestens nach 2 Monaten wurden die Kulturen auf frische Agarplatten überimpft.

Aufarbeitung:
Zur Aufarbeitung wurden zunächst Myzel und Kulturfiltrat durch Zentrifugation getrennt. Das Myzel schloss man in 250 mL Aceton 15 min lang im Ultraschallbad auf, filtrierte feste Bestandteile ab und destillierte das Lösungsmittel im Vakuum ab. Das Kulturfiltrat wurde über eine mit 50 cm^3 XAD gefüllte Säule gegeben, dieses mit Wasser gewaschen und die adsorbierten Substanzen mit Methanol eluiert. Die Methanol-Fraktion wurde eingeengt, die wässrige verworfen.

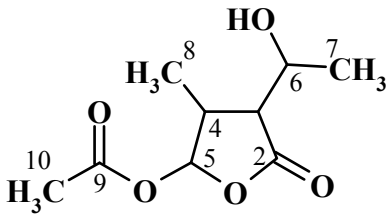
Chromatographische Untersuchung:
Untersuchung der Rohextrakte auf Sekundärmetaboliten-Produktion erfolgte durch Dünnschichtchromatographie mit Nano-DC-Platten. Dazu wurden die Extrakte von Myzel und Kulturfiltrat in jeweils 2 mL Methanol/Wasser (1:1) gelöst und davon 5 µl aufgetragen. Als Laufmittelsysteme verwendete man Chloroform/Methanol 9:1 und Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:5 (obere Phase).

Auswertung:
Ausgewertet wurden die entwickelten DC-Platten mittels UV-Lampe (Wellenlängen 254 und 366 nm) sowie durch Anfärben mit vier verschiedenen Sprühreagenzien (s. S. 97). Tabelle 5 (Anhang) zeigt die bearbeiteten Stämme mit ihrer Bewertung nach dem chemischen Screening

4.2 6-Dihydro-3-desmethyl-acetomycin (SM-97-A, 71) aus Stamm Alv 5

Aus einer Kultivierung des Stammes Alv 5 im Ha-Medium konnte **71** als weißer Feststoff erhalten werden. Chromatographie an Kieselgel (Flash-Chromatographie, Chloroform 9:1, 25 x 4.0 cm), Sephadex LH-20 (Methanol, 85 x 3.5 cm) und Kieselgel (Flash-Chromatographie, Chloroform/Methanol 9:1, 20 x 2.5 cm) führte zu **71** in Ausbeuten von 3.0 mg/L.

$C_9H_{14}O_5$ (202.2)



R_f-Wert: 0.55 (Chloroform/Methanol 9:1)

ESI-MS (positive Ionen): m/z = 225.7 ($[M+Na]^+$, 100 %).

^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H = 1.15 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 8-H_3), 1.28 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, 10-H_3), 2.08 (s, 3H, 10-H_3), 2.45 (dd, *J* = 10.6, 3.0 Hz, 1H, 3-H), 2.80 (ddq, *J* = 10.6, 6.5, 6.5, 6.5, 5.5 Hz, 1H, 4-H), 2.90 (bs, 1H, OH), 4.32 (dq, *J* = 6.5, 3.5, 3.5, 3.5 Hz, 1H, 6-H), 6.48 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, 5-H) ppm.

^{13}C-NMR (125.7 MHz, $CDCl_3$): δ_C = 13.3 (q, C-8), 20.7 (q, C-7), 20.8 (q, C-10), 34.1 (d, C-4), 50.7 (d, C-3), 65.3 (d, C-6), 94.7 (d, C-5), 169.2 (s, C-9), 176.9 (s, C-2) ppm.

C. LITERATURVERZEICHNIS

[1] A. M. Thayer, *Chem. Eng. News* **2001**, *79*, 25-36.
[2] J. Coe, *Contract Pharma*, June **2002**, 36.
[3] A. L. Demain, *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 331.
[4] E. K. Wilson, *Chem. Eng. News* **2002**, *80*, 35-39.
[5] K. J. Watkins, *Chem. Eng. News* **2002**, *80*, 27-33.
[6] T. Chapman, *Nature* **2003**, *421*, 661-666.
[7] S. Class, *Chem. Eng. News* **2002**, *80*, 39-49.
[8] C. M. Henry, *Chem. Eng. News* **2001**, *79*, 69-74.
[9] R. Breinbauer, M. Manger, M. Scheck, H. Waldmann, *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 2129-2145.
[10] M. Feher, J. M. Schmidt, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 218-227.
[11] www.celegans.de
[12] R. Breinbauer, I. R. Vetter, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3002-3015.
[13] A. M. Rouhi, *Chem. Eng. News* **2003**, *81*, 77-91.
[14] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022-1037.
[15] T. B. Lowinger, B. Riedl, J. Dumas, R. A. Smith, *Curr. Pharm. Design* **2002**, *8*, 2269-2278.
[16] H.-P. Fiedler, *Nat. Prod. Lett.* **1993**, *2*, 119-128.
[17] J.-L. Wolfender, K. Ndjoko, K. Hostettmann, *J. Cchromatogr. A* **2003**, *1000*, 437-455.
[18] S. Borman, *Chem. Eng. News* **2002**, *11*, 43-57.
[19] P. Stahl, L. Kissau, R. Mazitschek, A. Huwe, P. Furet, A. Giannis, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11586-11593.
[20] P. Stahl, L. Kissau, R. Mazitschek, A. Giannis, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1222-1226.
[21] K. C. Nicolaou, D. Vourloumis, T. Li, J. Pastor, N. Wissinger, Y. He, S. Ninkovic, F. Sarabia, H. Vallberg, F. Roschangar, N. P. King, M. R. V. Finlay, P. Giannakakou, P. Verdier-Pinard, E. Hamel, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2181-2187.
[22] D. Brohm, S. Metzger, A. Bhargava, O. Müller, F. Lieb, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 319-323.
[23] R. Xu, G. Greiveldinger, L. E. Marenus, A. Cooper, J. A. Ellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4898-4899.
[24] B. K. Hubbard, C. T. Walsh, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 752-789.
[25] P. Stahl, L. Kissau, R. Matzitschek, A. Huwe, P. Furet, A. Giannis, H. Waldmann, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11586-11593.
[26] P. Stahl, L. Kissau, R. Mazitschek, A. Giannis, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1222-1226.
[27] www.astex-technology.com
[28] S. Borman, *Chem. Eng. News* **2000**, *78*, 31-37.
[29] C.M. Henry, *Chem. Eng. News* **2001**, *79*, 37-42.
[30] H. Bruckner, *LaborPraxis* **2001**, *12*.
[31] A.L. Demain, *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 331.
[32] K. Gebhardt, Dissertation, *Universität Tübingen*, **2001**.
[33] H.-P. Fiedler, *Natural Product Letters* **1993**, *2*, 119-128.
[34] K. Gebhardt, R. Pukall, H.-P. Fiedler, *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 428-433.
[35] A. Höltzel, R. D. Süßmuth, R. W. Jack, G. J. Nicholson, K. Gebhardt, H.-P. Fiedler, G. Jung, *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 434-440.
[36] H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*, Wiley-VCH Weinheim, 3. Auflage **1999**.
[37] R. Höfs, *Dissertation*, Universität Göttingen **1999**.
[38] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme Verlag Stuttgart, New York, 3. Auflage **1987**.
[39] H. Wolf, H. Zähner, *Arch. Mikrobiol.* **1972**, *83*, 147-154.
[40] M. Brüning, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen **1996**.
[41] W. Klyne, *J. Biochem.* **1950**, *47*, xli.
[42] M. Meyer, W. Keller-Schierlein, H. Drautz, W. Blank, H. Zähner, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 83.
[43] R. J. Cushley, R. J. Sykes, C.-K. Shaw, H. H. Wasserman, *Can. J. Chem.* **1975**, *53*, 148-160.
[44] D. S. De Miranda, G. Brendolan, P. M. Imamura, M. G. Sierra, A. J. Marsaioli, E. A. Rúveda, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 4851-4858.
[45] C. J. Pouchert, J.Behnke, *The Aldrich Library of ^{13}C and ^{1}H FTNMR Spectra*, Edition I, Aldrich Chemical Company Inc. **1993**.
[46] A. Carotenuto, E. Fattorusso, V. Lanzotti, S. Magno, L. Mayol, *Liebigs Ann.* **1996**, 77-81.
[47] P. Crews, C. Jimenez, M. O´Neil-Johnson, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 3585-3600.
[48] H. Shigemori, H. Komaki, K. Yazawa, Y. Mikami, A. Nemoto, Y. Tanaka, J. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4353 – 4354.
[49] H. Komaki, Y. Tanaka, K. Yazawa, H. Takagi, A. Ando, Y. Nagata, Y. Mikami, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 75-77.

[50] H. Komaki, A. Nemoto, Y. Tanaka, H. Takagi, K. Yazawa, Y. Mikami, H. Shigemori, Y. Nagata, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 13-19.
[51] F. Pojer, S.-M. Li, L. Heide, *Microbiology* **2002**, *148*, 3901-3911.
[52] D. A. Johnson, H.-W. Liu, in: *Comprehensive Natural Products Chemistry*, *Vol. 3*, Elsevier Verlag, New York, Amsterdam **1999**.
[53] A. Kirschning, A. F.-W. Bechthold, J. Rohr, in: *Bioorganic Chemistry – Deoxysugars, Polyketides and related classes: Synthesis, Biosynthesis, Enzymes*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York **1997**.
[54] T. Eguchi, Y. Dekishima, Y. Hamano, T. Dairi, H. Seto, K. Kakinuma, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5433-5438.
[55] T. Kuzuyama, H. Seto, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 171-183.
[56] H. Seto, H. Watanabe, K. Furihata, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7979-7982.
[57] T. Kuzuyama, S. Takahashi, T. Dairi, H. Seto, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 919-923.
[58] S. R. Putra, L. M. Lois, N. Campos, A. Boronat, M. Rohmer, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 23-26.
[59] M. Rohmer, M. Seemann, S. Horbach, S. Bringer-Meyer, H. Sahm, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2564-2566.
[60] E. M. Davis, R. Croteau in: *Biosynthesis – Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg **2000**.
[61] Q. Xiong, X. Zhu, W. K. Wilson, A. Ganesan, S. P. T. Matsuda, Supporting Information zum Artikel *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9002-9003; erhältlich via http://pubs.acs.org.
[62] Q. Xiong, X. Zhu, W. K. Wilson, A. Ganesan, S. P. T. Matsuda, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9002-9003.
[63] M. R. Wildung, R. Croteau, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9201.
[64] A. Buchynskyy, U. Kempin, S. Vogel, L. Hennig, M. Findeisen, D. Müller, S. Giesa, H. Knoll, P. Welzel, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1149-1162.
[65] M. R. Grever, S. A. Schepartz, B. A. Chabner, *Semin. Oncol.* **1992**, *19*, 622-638.
[66] I. Plitzko, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen; Arbeit noch nicht abgeschlossen.
[67] G. Bach, *Diplomarbeit*, Universität Göttigen, **1989**.
[68] S. Bartels, *Staatsexamensarbeit*, Universität Göttigen, **1994**.
[69] R. Höfs, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen, **1995**.
[70] J. Bitzer, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen, **2001**.
[71] R. Höfs, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1999**.
[72] G. Bach, S. Breiding-Mack, S. Grabley, P. Hammann, K. Hütter, R. Thiericke, H. Uhr, J. Wink, A. Zeeck, *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, 241-250.
[73] T. Suami, S. Ogawa, T. Toyokuni, *Chem. Lett.* **1983**, 611.
[74] G. E. McCasland, S. Furuta, L. J. Durham, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 1516-1521.
[75] Y. Kameda, N. Asano, M. Yoshida, N. Sasaki, T. Suami, *J. Carbohydr. Chem.* **1987**, *6*, 471-478.
[76] S. Omura, H. Tanaka, H. Kuga, N. Imamura, *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 309-313.
[77] N. Kinoshita, H. Naganawa, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 435-437.
[78] B. Junge, F. R. Heiker, J. Kurz, L. Müller, D. D. Schmidt, C. Wünsche, *Carbohydr. Res.* **1984**, *128*, 235.
[79] T. Takeuchi, H. Chimura, M. Hamada, H. Umezawa, O. Yoshioka, N. Oguchi, Y. Takahashi, A. Matsuda, *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 737-742.
[80] Y. Sugimoto, H. Suzuki, H. Yamaki, T. Nishimura, N. Tanaka, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1222-1230.
[81] I. Ohtani, T. Kusumi, Y. Kashman, H. Kakisawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4092-4096.
[82] S. Meyer, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen **2000**.
[83] G. Chen, G.-Y.-S. Wang, X. Li, B. Waters, J. Davies, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 1145-1153.
[84] F. G. Bader in: *The Bacteria* (Eds.: I. C. Gunsalus, J. R. Sokatch, L. N.Ornston), Band 9, *Antibiotic-producing Streptomycetes*, Academic Press, London **1986**, 281-321.
[85] H. Laatsch, *Naturstoffdatenbank AntiBase*, Version 2002, Chemical Concepts, Weinheim, **2002**.
[86] G. Höfle *et al.* in: *Sekundärmetabolismus bei Mikroorganismen*, Eds.: W. Kuhn, H. P. Fiedler, Attempto-Verlag Tübingen.
[87] B. Bohlendorf et al., *Liebigs Ann. Chem.* **1996**, 49-53.
[88] R. Höfs, M. Walker, A. Zeeck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3258-3261.
[89] B. Sato, H. Muramatsu, M. Miyauchi, Y. Hori, S. Takase, M. Hino, S. Hashimoto, H. Terano, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 123-130.
[90] B. Sato, H. Nakajima, Y. Hori, M. Hino, S. Hashimoto, H. Terano, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 204-206.
[91] S. Yoshimura, B. Sato, T. Kinoshita, S. Takase, H. Terano, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 615-622.
[92] S. Yoshimura, B. Sato, T. Kinoshita, S. Takase, H. Terano, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, c-1.
[93] C. R. William, *Anticancer Drugs* **1992**, *3*, 311-321.
[94] R. H. Himes, R. N. Kersey, I. Heler-Bettinger, F. E. Samson, *Cancer Res.* **1976**, *36*, 3798-3802.
[95] G. C. Adam, C. D. Vanderwal, E. J. Sørensen, B. F. Cravatt, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5638-5642.
[96] C. D. Vanderwal, D. A. Vosburg, S. Weiler, E. J. Sørensen, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 645-648.
[97] C. D. Vanderwal, D. A. Vosburg, E. J. Sørensen, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 4307-4310.
[98] D. A. Evans, J. T. Starr, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1865-1868.
[99] M. Kalesse, persönliche Mitteilung.
[100] J. Sauer, *Angew. Chem.* **1967**, *79*, 76-94.

[101] O. Diels, K. Alder, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1928**, *460*, 98-122.
[102] K. C. Nicolaou, S. A. Snyder, T. Montagnon, G. E. Vassilikogiannakis, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1742-1773.
[103] S. Laschat, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 313-315.
[104] G. Pohnert, *ChemBioChem.* **2001**, *2*, 873-875.
[105] E. M. Stocking, R. M. Williams, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3186-3223.
[106] D. Hilvert, K. W. Hill, K. D. Nared, M.-T. M. Auditor, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9261-9263.
[107] B. Seelig, S. Keiper, F. Stuhlmann, A. Jäschke, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4764-4768.
[108] J. Kennedy, K. Auclair, S. G. Kendrew, C. Park, J. C. Vederas, C. R. Hutchinson, *Science* **1999**, *284*, 1368-1372.
[109] K. Auclair, A. Sutherland, J. Kennedy, D. J. Witter, J. P. Van den Heever, C. R. Hutchinson, J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11519-11520.
[110] H. Oikawa, Y. Suzuki, K. Katayama, A. Naya, C. Sakano, A. Ichihara, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 1225-1232.
[111] S.Ito, Y. Hirata, *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 1181-1188.
[112] J. A. Marco, J. F. Sanz, E. Falcó, J. Jakupovic, J. Lex, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 7941-7950.
[113] W. Caroll, P. A. Grieco, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1164-1165.
[114] C. Waldron, K. Madduri, K. Crawford, D. J. Merlo, P. Treadway, M. C. Broughton, R. H. Baltz, *Antonie van Leeuwenhoek* **2000**, *78*, 385-390.
[115] C. Waldron, P. Matsushima, P. R. Rosteck Jr., M. C. Broughton, J. Turner, K. Madduri, K. P. Crawford, D. J. Merlo, R. H. Baltz, *Chemistry & Biology* **2001**, *8*, 487-499.
[116] A. Endo, K. Hasumi, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, *10*, 541-550.
[117] T. Ose, K. Watanabe, T. Mie, M. Honma, H. Watanabe, M. Yao, H. Oikawa, I. Tanaka, *Nature* 2003, 422, 185-189.
[118] R. Höfs, persönliche Mitteilung.
[119] R. M. Risley, R. L. Van Etten, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 252-253.
[120] J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc* **1980**, *102*, 374-376.
[121] J. M. Risley, R. L. Van Etten, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4609-4614.
[122] J. M. Risley, R. L. Van Etten, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6699-6702.
[123] J. M. Risley, R. L. Van Etten, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4389-4392.
[124] D. E. Cane, T.-C. Liang, H. Hasler, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5962-5965.
[125] D. E. Cane, T.-C. Liang, H. Hasler, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7272-7281.
[126] A. A. Ajaz, J. A. Robinson, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 679-680.
[127] A. A. Ajaz, J.A. Robinson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1987**, 27-36.
[128] H. B. Bode, A. Zeeck, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2000**, 2665-2670.
[129] R. Thiericke, A. Zeeck, A. Nakagawa, S. Omura, R. E. Herrold, S. T. S. Wu, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3979-3987.
[130] R. A. Bell, C. L. Chan, B. G. Sayer, *J. C. S. Chem. Comm.* **1972**, 67-68.
[131] B. Horacio, N. Colli, V. Gold, J. E. Pearson, *J. C. S. Chem. Comm.* **1973**, 408-409.
[132] Z. A. Hughes-Thomas, C. B. W. Stark, I. U. Böhm, J. Staunton, P. F. Leadley, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4613-4616.
[133] P. M. Shoolingin-Jordan, I. D. G. Campuzano, in: *Comprehensive Natural Products*, ed. U. Sankawa, Elsevier, Oxford **1999**, 345-365.
[134] K. Shindo, M. Sakakibara, H. Kawai, *J. Antibiot.* **1995**, *49*, 249-252.
[135] H. B. Bode, *Dissertation*, Universität Göttingen **2000**.
[136] H. Oikawa, A. Ichihara, S. Sakamura, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1988**, 600-602.
[137] E.-B. Goh, G. Yim, W. Tsui, J. McClure, M. G. Surette, J. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 17025-17030.
[138] H. B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeeck, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 619-627.
[139] W. Plaga, I. Stamm, H. U.Schairer, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **1998**, *98*, 11263-11267.
[140] H. J. Schiewe, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1997**.
[141] www.sanger.ac.uk/projects/S_coelicolor/
S. D. Bentley, D. A. Hopwood, et al., *Nature* **2002**, *417*, 141-147.
[142] L. Krasu, A. Kocj, S. Hoffstetter-Kuhn, *Dünnschichtchromatographie*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York **1995**.
[143] Autorenkollektiv, *Chapman & Hall/CRC Dictionary of Natural Products on CD-ROM*, Version 12:1, Chapman & Hall, CRC, **2003**.
[144] Autorenkollektiv, *SciFinder Scholar 2001*, American Chemical Society.
[145] H. Drautz, H. Zähner, E. Kupfer, W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 1752-1765.
[146] S. Grabley, J. Wink, K. Kuehlein, G. Seibert, K. Huetter, H. Uhr, A. Zeeck, *Eur. Pat. Appl.* **1989**, 11pp, EP 337152 A1, 19891018.

[147] S. Grabley, J. Wink, K. Kühlein, G. Seibert, K. Hütter, H. Uhr, A. Zeeck, *United States Patent* **1993**, US005252472.
[148] S. Grond, H.-J. Langer, P. Henne, I. Sattler, R. Thiericke, S. Grabley, H. Zähner, A. Zeeck, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 929-937.
[149] I. Plitzko, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen; Arbeit noch nicht abgeschlossen.
[150] F. Fdhila, V. Vázquez, J. L. Sánchez, R. Riguera, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1299-1301.
[151] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2934.

D. ANHANG

Bezeichnung	**Laufmittel A**	**Laufmittel B**	**Färbung mit Anisaldehyd**
N-Acetyl-Tryptamin (**42**)	0.32	0.55	Rot
7-*O*-Methyl-gabosin E (**43**)	0.012	0.29	Braun
Propionyl-hexacyclinsäure (**44**)	n.b.	n.b.	Blau-grau
Hexacyclinsäure (**6**)	0.23	0.18	Blau-grau
Desacetyl-Hexacyclinsäure (**69**)	0.07	0.55	Blau-grau
Anhydro-hexacyclinsäure (**70**)	0.36	0.70	Blau-grau
Phenalinolacton A (**5**)	0.23	0.69	Grün-braun
Phenalinolacton B (**24**)	0.23	n.b.	Grün-braun
Phenalinolacton C (**25**)	0.23	n.b.	Grün-braun
Phenalinolacton D (**26**)	0.23	n.b.	Grün-braun
Acetomycin-Derivat (**71**)	0.5	n.b.	Rötlich

Tabelle 3: R_f-Werte der bearbeiteten Substanzen, Laufmittelsystem A: Chloroform / Methanol 9: 1, Laufmittelsystem B: Butanol / Eisessig / Wasser 4:1:5 (obere Phase)

C-Atom	δ_C (ppm)	[1-^{13}C]Acetat Spez. Einbau	[1-13C]Glucose Spez. Einbau
1	78.4	0.14	0.06
2	34.0	1.01	0.40
3	70.2	0.44	0.08
4	44.9	0.86	0.03
5	47.0	0.36	0.22
6	20.2	0.58	0.39
7	40.4	0.80	0.45
8	39.7	0.34	0.04
9	55.5	0.52	0.01
10	43.9	0.72	0.49
11	24.3	0.68	0.42
12	122.9	0.60	0.29
13	131.4	0.43	0.48
14	40.6	0.23	0.05
15	130.0	0.02	1.28
16	98.4	0.43	0.58
18	169.2	0.96	0.95
19	139.2	0.07	0.75
20	62.4	1.07	0.20
21	68.2	0.75	0.42
22	10.3	0.62	0.05
23	22.0	0.18	0.03
24	27.7	0.16	0.02
25	170.3	18.93	0.25
26	21.2	1.03	0.85
1´	160.5	0.99	0.45
2´	29.2	1.14	0.10
3´	116.7	0.59	0.21
4´	109.1	0.64	0.05
5´	134.4	0.93	0.63
6´	13.2	0.40	0.02
1´´	98.2	0.28	1.25
2´´	120.7	0.96	0.76
3´´	23.8	1.07	0.26
4´´	81.6	0.60	0.09
5´´	68.8	0.27	0.05
6´´	17.7	0.74	0.09
7´´	56.7	0.00	0.00

Tabelle 4: spezifischer Einbau in Phenalinolacton A (**5**) nach Fütterung von [1-^{13}C]Acetat und [1-^{13}C]Glucose

C-Atom	[1-^{13}C, $^{18}O_2$]Acetat		[1-^{13}C, $^{18}O_2$]Propionat	
	Spez. Einbau	$^{18}O/^{16}O$	Spez. Einbau	$^{18}O/^{16}O$
1	1.53	38.35	1.23	
3	3.03	43.45	1.17	
4	0.41		0.87	
5	0.91		32.49	70.14
7	0.41		0.86	
8	2.06	/	1.05	
9	0.70		1.41	
10	0.27		25.98	/
11	0.65		3.98	
12	2.59	/	3.15	
13	0.46		0.99	
14	0.69		33.33	71.34
15	0.37		0.00	
16	1.93	53.24	1.12	
17	0.34		0.92	
18	1.14	/	0.83	
19	0.39		1.24	
20	0.61		1.18	
21	0.55		0.93	
22	1.33		23.36	/
23	0.25		0.35	
24	0.65		0.89	
25	0.23		8.13	
26	0.29		0.57	
27	5.05	39.66	1.42	
28	0.34		0.59	

Tabelle 5: spezifische Einbauraten sowie $^{18}O/^{16}O$-Verhältnis in Hexacyclinsäure bei Fütterungsexperimenten mit dem Stamm S 1013

Organismus	**Medium:**	**Tü 6071 A**	**Tü 6071 B**
Prokaryonten			
Gram-positiv			
Arthrobacter aurescens	KM1	0	0
Arthrobacter globiformis	KM1	0	*Spur*
Arthrobacter oxydans	KM1	0	**10**
Arthrobacter pascens	KM1	0	0
Bacilus brevis	KM1	*Spur*	**12**
Bacillus brevis	MM2	n.b.	n.b.
Bacillus subtilis	MM1	0	0
Bacillus subtilis	KM1	0	0
Micrococcus luteus	KM1	0	0
Mycobacterium phlei	KM1	0	0
Rhodococcus erythropolis	KM1	**10**	**25**
Staphylococcus aureus	KM1	0	0
Streptomyces viridochromogenes	KM4	**10**	**38**
Gram-negativ			
Agrobacterium tumefaciens	KM1	n.b.	n.b.
Escherichia coli	KM1	0	0
Escherichia coli	MM1	0	0
Pseudomonas fluorescens	KM1	n.b.	n.b.
Eukaryonten			
Aspergillus viridi nutans	KM5	*0*	*0*
Botrytis cinerea	KM2	*0*	*0*
Candida albicans	KM5	*0*	*0*
Mucor hiemalis	KM5	*0*	*0*
Paecilomyces variotii	KM5	*0*	*0*
Pencillium notatum	KM5	*0*	*0*
Saccharomyces cerevisiae	KM5	*0*	*0*

Tabelle 6: Testierung der Phenalinolactone A und B auf ihre biologische Wirkung hin

Tabelle 5 (nächste Seite): Im chemischen Screening bearbeitete Stämme. Bewertung: ++ sehr interessant, + interessant, - uninteressant.

Stamm	Wachstum	Produktion	Reproduzierbarkeit	Bearbeitet
Alv 1	+	-		-
Alv2	++	-		-
Alv 3	++	-		-
Alv 4	++	+	-	+
Alv 5	++	++	+	+
Alv 6	++	++		-
Alv 7	+	-		-
Alv 8	+	-		-
Alv 9	-	-		-
Pap A1	++	-		-
Pap A2	++	+		-
Pap B1	++	-		-
Pap B2	+	+		-
Pap B3	+	++	-	+
Pap B4	+	-		-
Pap B5	+	+		-
Pap B6	+	++		-
China I 1	++	-		-
China I 2	++	-		-
China I 3	++			-
China I 5	-	-		-
China I 6	++	++	-	+
China I 8	+	++	-	+
China I 9	+	++		-
China I 12	+	++		-
China I 13	-	-		-
China I 14	-	-		-
China I 15	-	-		-
China II 1	++	++	-	+
China II 2	++	+		-
China II 3	-	-		-
China II 4	-	-		-
China II 5	-	-		-
China II 6	++	-		-
China II 7	++	-		-
China II 9	-	-		-
China II 10	+	+	-	+
China II 11	+	++	-	+
China II 12	+	+		-
China II 14	+	++		-
China II 15	-	-		-
China II 17	-	-		-
China II 19	-	-		-
China II 20	-	-		-

Danke!!

Was wäre diese Arbeit ohne die vielen kleinen Helferlein?

Mein besonderer Dank gilt Jutta Gerber-Nolte, die durch ihre engagierte experimentelle Mitarbeit in großem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Danke für Messungen in letzter Sekunde, danke für Kaffee und Schwätzchen, danke für so vieles!!

Der NMR-Abteilung (R. Machinek, C. Zolke, C. Siebert, M. Weitemeyer, U. Leonhardt) möchte ich für die freundliche Aufnahme und viele nette Gespräche danken. Herrn R. Machinek und Frau C. Zolke sei besonders gedankt für jede Menge Tipps, die Einarbeitung am 600er und viel Messzeit, die ich ertauschen durfte.

Für die Messung von Massenspektren gilt mein Dank Frau G. Udvarnoki, Herrn Dr. H. Frauendorff und Herrn Dr. Jens Fuchser. Karsten und Lui sei gedankt für so manche LC-MS-Messung.

Frau Dr. Gabriela Bach und Frau Dr. Stephanie Grond danke ich für unendlich viele Diskussionen und viele nützliche Tipps und Anregungen.

Herrn Prof. Dr. H.-P. Fiedler sei gedankt für die Überlassung der „Tübinger Substanzen“, für die viele Zeit die er in mich investiert hat und für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe. Dem gesamten AK Fiedler (besonders Prof. Dr. Fiedler und J. Schinko) danke ich für die nette Zeit in Tübingen! Ein Dank auch an K. Gebhardt für die Überlassung seiner „Babies“!

Bei Frau M. Klingebiel, Herrn H.-P. Kroll und Herrn H.-G. Langer möchte ich mich für die freundliche und kompetente Unterstützung bei vielen technischen Problemen bedanken.

Meinen Korrekturlesern ein riesengroßes Dankeschön: B. Girmann, J. Bitzer, G. Bach, D. Wolff, T. Schuhmann und O. Schlörke!!

Den Reinemachfrauen danke ich dafür, dass sie mein Chaos mit Humor genommen haben.

Bei der gesamten Abteilung Zeeck/Grond möchte ich mich bedanken für die tolle Atmosphäre, die unglaublich schönen Feiern/Abholungen, den wahnsinns-Doktorhut, die „Feg-aktion“ zum 30. und sooo viel mehr!! Meinen ´Schreibraumdamen´ Meike und Diana ein großes Danke für die tolle Atmosphäre.

Ab big „thank you“ to my canadian family for giving me a home during my stay in Canada. I still remember that time very often. Thank you Marcus and Ken for the friendship!!

Für viele Bierchen, nette Stunden und die Freundschaft möchte ich mich besonders bei Marco, Achim, Gerald, Christopher, Olli D., Olli S., Marcus und Sandra bedanken - heut´ ist nicht aller Tage, ich komm´ wieder keine Frage…

Antje möchte ich sehr für „viel Kraft“ und ihre Unterstützung in einer nicht besonders leichten Zeit danken!

Christine danke ich für Ihre Unterstützung und das Verständnis für meine Arbeitszeiten!!

Vielen, vielen Dank zu guter letzt an meine Eltern, Brüder und Oma, die mich immer unterstützen und stets für mich da sind. Danke!!

Lebenslauf

Am 30. Januar 1974 wurde ich als erstes Kind von Siegrid Meyer, geb. Loeper, und Wolfgang Meyer in Bremen geboren.

Von August 1980 bis Juli 1984 besuchte ich die Grundschule Brinkum, bis Juni 1986 die Orientierungsstufen Heiligenrode und Lahausen. Ab August 1986 war ich Schüler der Kooperativen Gesamtschule Weyhe, die ich im Mai 1993 mit der Allgemeinen Hochschulreife verließ.

Von August 1993 bis Oktober 1994 arbeitete ich als Zivildienstleistender beim Deutschen Roten Kreuz in Leeste.

Zum Wintersemester 1994/1995 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Georg-August Universität in Göttingen, wo ich im April 1997 die Diplomvorprüfung bestand. Von November 1998 bis Februar 1999 verbrachte ich drei Monate in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R.F. Childs, McMaster University, Hamilton (Canada). In der Zeit von Mai 1999 bis April 2000 fertigte ich im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Zeeck meine Diplomarbeit mit dem Titel „Screening mit endosymbiontischen Mikroorganismen sowie Beiträge zur Gewinnung und Modifikation von Hexacyclinsäure“ an und absolvierte im Mai 2000 die Diplom-Chemiker Hauptprüfung.

Seit Juli 2000 arbeite ich unter der Anleitung von Prof. Dr. A. Zeeck an der vorliegenden Dissertation.