

**Beiträge zur Biosynthese von
Strobilurin A und Oudemansin A
sowie
Gewinnung neuer halogenierter Strobilurine
durch vorläufer-dirigierte Biosynthese**

Dissertation

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

vorgelegt von
Gerald Thormann
aus Lüneburg

Göttingen 2004

D7

Referent: Prof. Dr. A. Zeeck

Korreferent: Prof. Dr. U. Diederichsen

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2005

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische Chemie der Universität Göttingen von Februar 2001 bis Dezember 2004 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.

*„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“*

Isaac Newton (1643-1727), engl. Physiker, Mathematiker u. Astronom

INHALTSVERZEICHNIS

A. THEORETISCHER TEIL

I. Einleitung	1
1. Entwicklung des chemischen Pflanzenschutzes	1
2. Trends in der Leitstruktursuche	5
3. Halogenierte Naturstoffe im Pflanzenschutz	8
4. Alternative Ansätze im Pflanzenschutz	9
5. Aufgabenstellung	12
II. Isolierung und Charakterisierung von Strobilurin A	13
1. Geschichte der Strobilurine	13
2. Entwicklung von Strategien	16
2.1. Chemisches Screening	16
2.2. Kultivierung in Schüttelkolben	17
2.3. Kultivierung im Fermenter	20
2.4. Diskussion	20
III. Biosynthese von Strobilurin A (5)	21
1. Allgemeines	21
2. Bisherige Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen	24
2.1. Untersuchungen in Prag	24
2.2. Untersuchungen in Bristol	25

3. Beiträge zur Biosynthese von Strobilurin A (5)	29
3.1. Bestimmung des Produktionsverlaufs	29
3.2. Experimente zum Aufbau der Seitenkette	30
3.3. Experimente zur Klärung der Startereinheit	34
3.4. Postulierter Biosyntheseweg von Strobilurin A (5)	37
3.5. Acetat-Pool-Hypothese	40
3.5.1. Diskussion	40
3.6. Ausblick	42
IV. Strobilurin-Analoga durch vorläufer-dirigierte Biosynthese	43
1. Allgemeines	43
2. Variation der Startereinheit	44
2.1. Fütterung von fluormarkierten Vorläufern	44
2.2. Fütterung von Nicotinsäure	49
2.3. Diskussion der Ergebnisse	50
3. Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit des Produkte	51
3.1. Bedeutung von SNAC-Thioester	51
3.2. Darstellung von 2-Fluorbenzoesäure-thioester	52
3.3. Fütterung von 2-Fluorbenzoesäure-thioester	53
3.4. Fütterung von 2-Fluorbenzoesäure	54
3.5. Diskussion der Ergebnisse	54
4. Tandemfütterungen	55
4.1. Theoretische Strategieentwicklung für Tandemfütterungen	55
4.2. Neue Metabolite aus <i>Strobilurus tenacellus</i>	58
4.3. Hypothetischer Verlauf der Halogenierung	63
4.4. Diskussion der Ergebnisse	64
5. Abschließende Betrachtung der Experimente	64
6. Ausblick	65

V. Biosynthese von Oudemansin A (7)	66
1. Allgemeines	66
2. Kultivierung und Strukturaufklärung	67
3. Beiträge zur Biosynthese von Oudemansin A (7)	69
3.1 Experimente zum Aufbau der Seitenkette	69
3.2 Experimente zur Klärung der Startereinheit	70
3.3 Vergleich der Biosynthese von Oudemansin A (7) und Strobilurin A (5)	72
4. Vorläufer-dirigierte Biosynthese	73
4.1. Fütterungsexperimente	73
4.2. Diskussion	73
5. Ausblick	74
VI. Zusammenfassung der Ergebnisse	75
1. Vergleichende Biosynthese von Strobilurin A (5) und Oudemansin A (7)	75
2. Vorläufer-dirigierte Biosynthese an Basidiomyceten Stämmen	76
B. EXPERIMENTELLER TEIL	78
I. Allgemeines	78
1. Instrumentelle Analytik	78
2. Chromatographische Methoden	79
3. Mikrobiologische Methoden	81
4. Allgemeine Arbeitsvorschriften	82

II. Arbeiten am Stamm <i>Strobilurus tenacellus</i>	83
1. Biosynthese- und vorläufer-dirigierte Biosyntheseuntersuchungen	83
1.1. Stammhaltung	83
1.2. Kultivierung und Standardaufarbeitung	83
1.3. Durchführung des chemischen Screenings	84
1.4. Biosyntheseuntersuchungen	85
1.5. Vorläufer-dirigierte Biosynthese	87
1.6. Charakterisierung der isolierten Metabolite	90
III. Arbeiten am Stamm <i>Oudemansiella mucidia</i>	96
1. Allgemeine Arbeiten	96
1.1. Stammhaltung	96
1.2. Kultivierung und Standardaufarbeitung	96
2. Biosyntheseuntersuchungen	97
3. Vorläufer-dirigierte Biosyntheseuntersuchungen	98
3.1 Fütterungsexperimente	98
4. Charakterisierung von Oudemansin A (8)	98
C. LITERATURVERZEICHNIS	100
D. ANHANG	105

A. Theoretischer Teil

I. Einleitung

1. Entwicklung des chemischen Pflanzenschutzes

Im Verlauf der Geschichte Deutschlands hat sich die Landwirtschaft mehrfach strukturell gewandelt. Herrschte zunächst die Subsistenzwirtschaft vor, so ist heute daraus ein eigenständiger Industriezweig geworden. Diese strukturellen Veränderungen ergaben sich aus dem gesellschaftlichen Wandel, der Bauernbefreiung sowie der zunehmenden Industrialisierung und der damit verbundenen Entstehung des Dienstleistungssektors. Immer mehr Menschen zog es zum Arbeiten in die Städte. Während Mitte des 19. Jahrhunderts noch etwa 80% der Bevölkerung in der Landwirtschaft tätig waren, verringerte sich diese Zahl bis 1997 auf 2,7%.¹ Dazu kam der ständige Anstieg der Bevölkerungszahl bei gleichzeitig zunehmendem Alter. Stets musste die Landwirtschaft der steigenden Nachfrage nach Nahrungsmitteln gerecht werden. Aus diesem Grund lösten schon im Verlauf des Hoch- und Spätmittelalters intensivere Bodennutzungssysteme die traditionellen Wechsellagerungssysteme in der Landwirtschaft ab, um die Ernten zu erhöhen. Heute wie früher wird eine weitere Ertragssteigerung einerseits durch die Züchtung ertragreicherer Nutzpflanzen erreicht, andererseits durch die Entwicklung von Kunstdüngern, wie es zuerst von Liebig angeregt wurde. Trotz beträchtlicher Fortschritte bei der Bestellung der Böden und der Zucht ertragreicherer Kulturpflanzen kam es immer wieder zu massiven Missernten. So beispielsweise auch in den Jahren 1845 – 1850 in Irland. Eine Pilzinfektion der Kartoffel mit *Phytophthora infestans* führte zu einer Hungersnot, infolge derer 1/8 der irischen Bevölkerung auswanderte und 1/8 aller Iren starb. Es sollte noch viele Jahre dauern, bis ein Mittel gegen diese Pilzinfektionen gefunden wurde.²

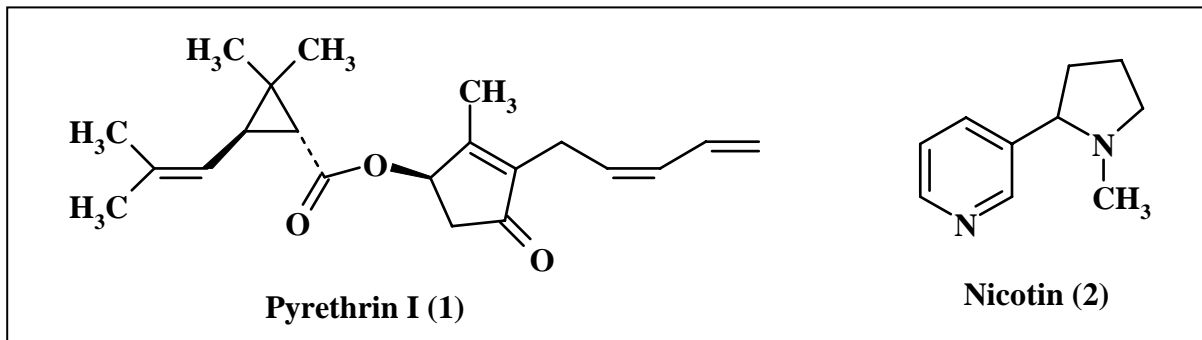
Die Entdeckung des „ersten“ chemischen Pflanzenschutzmittels ist einem Zufall im Jahr 1885 zu verdanken. P. Millardet fiel auf, dass die Rebstöcke eines Weingartens mit einer Pilzkrankheit befallen waren, der benachbarte Weingarten jedoch verschont geblieben war. Er bemerkte, dass die Trauben der gesunden Rebstöcke mit einer hellblauen Schicht bedeckt waren. Die gesunden Rebstöcke waren vom Winzer mit einer Mischung aus Kalk und Kupfersulfat behandelt worden.³ Das Gemisch erhielt den Namen Bordeaux-Brühe und wurde später auch mit Erfolg gegen den verwandten Erreger der Kartoffelfäule, dem Verursacher der Hungersnot in Irland, eingesetzt.

Die ersten Versuche in Deutschland, auf chemischem Wege Pflanzenkrankheiten zu verhindern, wurden von J. R. Glauber unternommen. Mit Alkohol und Natriumsulfat führte er

Getreidebeiz-Versuche durch.² Das Beizen von Saatgut dient dem Vorbeugen von Pflanzenkrankheiten und findet heute noch eine breite Anwendung.

Eine organisierte und intensive Forschung fand zu dieser Zeit jedoch noch nicht statt. Geheimrat Duisburg, Generaldirektor der Farbenfabrik Bayer, erklärte 1917, dass Fortschritte im land- und forstwirtschaftlichen Pflanzenschutz und Vorratsschutz nicht von der Chemie allein erwartet werden können. Vielmehr bedürfe es einer Zusammenarbeit mit der Botanik, Zoologie, Bakteriologie und Physik, um diese Aufgaben zu lösen. Er schenkte der Universität Bonn 250.000 Mark zum Aufbau des Instituts für Pflanzenschutz. Es sollte damit die Erforschung und praktische Bekämpfung tierischer und pflanzlicher Schädlinge unterstützt werden.² Das Institut beschäftigt sich heute noch mit dem Pflanzenschutz und -anbau.

Zu jener Zeit waren schon einige Insektizide bekannt, die auf Naturstoffen basieren. So wurde z.B. die insektizide Wirkung von getrockneten Chrysanthemenblüten bereits 1840 entdeckt. Dessen Wirkstoff, Pyrethrin I (1), erschien daraufhin als Insektizid im Handel, ebenso wie der Naturstoff Nicotin (2), der als Insektizid im Weinbau Anwendung fand.⁴



Die Pflanzenschutzmittel der ersten Generation (Abbildung 1) waren in der Mehrzahl anorganische Verbindungen, die unselektiv wirkten, in hoher Dosis appliziert werden mussten und eine stark toxische Wirkung zeigten.⁵

Insektizide	Herbizide	Fungizide
As ₂ O ₃	FeSO ₄	[Cu(OH) ₂] _x *CaSO ₄ Bordeaux-Brühe (1885)
Cu(OAc) ₂ *3Cu(AsO ₂) ₂	H ₂ SO ₄	S _x
Pb ₃ (AsO ₄) ₂	NaClO ₃	HgCl ₂
Antinonin		Ceresan
	CuSO ₄	

Abb. 1: Pflanzenschutzmittel der ersten Generation ab 1800⁶

Dennoch wurden arsenhaltige Verbindungen für die Insektenbekämpfung bis ins 20. Jahrhundert hinein genutzt.

Eine gezielte industrielle Forschung im Bereich des Pflanzenschutzes setzte erst um 1930 ein. Erste Erfolge dieser Bemühungen waren die in Abbildung 2 dargestellten Pflanzenschutzmittel DDT⁷ (Dichlordiphenyltrichlorethan), E605⁸ (Parathion), TMTD⁹ (Thiram) oder 2,4 D¹⁰ (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure). Mit der Markteinführung der Insektizide DDT im Jahr 1942 und E605 im Jahr 1948 kam es zu einer Marktverdrängung der aus Pflanzen gewonnen Insektizide. Die Ursachen für die Verdrängung waren die geringeren Produktionskosten sowie die höhere Stabilität der synthetischen Produkte gegenüber den Naturstoffen.⁴

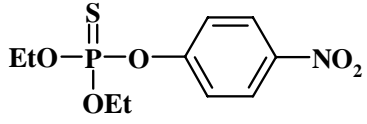
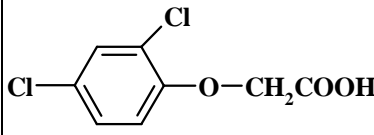
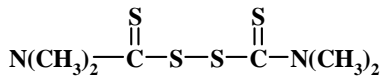
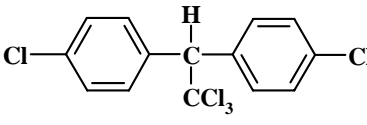
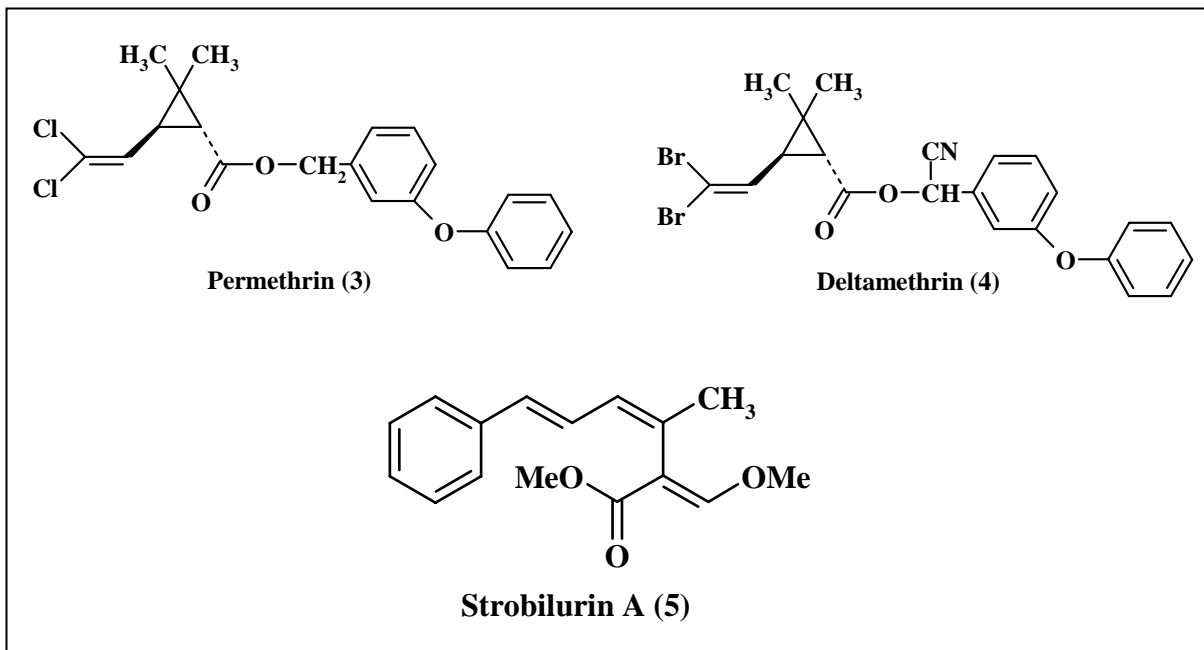
Insektizide	Herbizide	Fungizide
 <p>E605</p>	 <p>2,4-D</p>	 <p>TMDT</p>
 <p>DDT</p>		

Abb.2: Pflanzenschutzmittel der zweiten Generation ab 1930⁶

Durch die Einführung der Herbizide konnte eine wesentliche Ertragssteigerung der Nutzpflanzen erzielt werden. Der Durchbruch in diesem Bereich gelang mit den Phenoxyessigsäuren, wie dem 2,4 D im Jahr 1941. Bis zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Herbizid Bekämpfung überwiegend auf mechanischem Wege, wie Eggen und Hacken. Lediglich Phosphate und verdünnte Säuren, die nur gegen einige Wildkräuter wirkten, standen zuvor als Herbizide zur Verfügung. Bei den Fungiziden hingegen gelang der Durchbruch mit der Einführung der Thiurame und Thiocarbamate.⁴ Heute weist der Umsatz an Pflanzenschutzmitteln ein Marktvolumen von 26,7 Milliarden Dollar auf.¹¹

Die Naturstoffe haben jedoch in ihrer Bedeutung gegenüber den rein synthetischen Pflanzenschutzmitteln nie verloren, obwohl die Suche nach neuen biologisch aktiven Naturstoffen von der Industrie vielfach als zu zeit- und kostenintensiv eingeschätzt wird.

Zudem, so heißt es, sei die Wahrscheinlichkeit, ein marktfähiges Produkt zu entwickeln, relativ gering. Dabei sind es gerade die Naturstoffe, die oftmals eine Reihe von positiven Eigenschaften aufweisen, welche die rein synthetischen Produkte nicht besitzen. Hierzu zählen u.a. die geringe Toxizität gegenüber Mensch, Tier und Umwelt.¹² Es gilt also, die positiven Eigenschaften zu konservieren und die negativen zu minimieren. Die natürlichen Wirkstoffe als Leitstruktur zu betrachten und von diesen Analoga zu synthetisieren, ist eine große Herausforderung an die Chemie. Viele Arbeitsgruppen und Firmen befassen sich aus diesem Grund mit der Synthese von Naturstoffen. Ziel ist es, das gewünschte Produkt in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen, das Wirkprofil möglichst zu verbessern, sowie wirtschaftliche Synthesestrategien bzw. neue Methoden zu entwickeln. Eine Möglichkeit, biologische Eigenschaften positiv zu verändern, kann die Einführung von Halogenen wie Fluor,¹³ Chlor und Brom sein. So wurden 1974 und 1975 die von **1** abgeleiteten Analoga Permethrin (**3**) und Deltamethrin (**4**) auf dem Markt etabliert, zwei heute noch wirtschaftlich bedeutende Insektizide.⁴ Ein Paradebeispiel aus den letzten Jahren sind die Methoxyacrylate, die aus einem viel versprechenden Naturstoff, dem Strobilurin A (**5**) als Leitstruktur hervorgegangen sind.¹⁴ Im Pflanzenschutz kommt es aber auch heute noch in Einzelfällen zum Einsatz des strukturell unveränderten Naturstoffes. Zwei Beispiele hierfür sind das Avermectin[®], ein Präparat gegen Spinnenmilben sowie Spinosad[®], das eine Aktivität gegen Lepidopterenarten aufweist.⁵



Mittlerweile gibt es über 800 verschiedene Pflanzenschutzmittel auf dem europäischen Markt. Aufgrund von Neuregelungen der ECCO (European Community Co-ordination) innerhalb der

EU wurden Ende 2003 etwa 300 Pflanzenschutzmittel vom Markt genommen.¹⁵ Zurückzuführen ist dies auch auf ein Umdenken in der Bevölkerung, dem heftige Diskussionen in der Öffentlichkeit vorangingen. Einer der Auslöser war die Substanz DDT, das zum Synonym für die Gefährlichkeit von Pflanzenschutzmitteln wurde. DDT wird in der Natur nur langsam abgebaut. Es kann demzufolge mit der Nahrung aufgenommen werden und reichert sich im menschlichen und tierischen Fettgewebe an. Angriffspunkt von DDT sind die Natriumkanäle von Nervenmembranen. Hier kommt es zur Anlagerung am Kanalprotein, wodurch es zu einer längeren Öffnung des Kanals kommt. Dies hat ein ausgeprägtes Nachpotential zur Folge. Bei einer akuten Vergiftung treten zentralnervöse Störungen auf, die sich bis zu tonisch-klonischen Krämpfen steigern können. Schließlich kann die Vergiftung bis zum Koma oder Tod führen.¹⁶ Die zunehmenden Akzeptanzprobleme in der Bevölkerung gegenüber Pflanzenschutzmitteln und ein stärkeres Umweltdenken führten schließlich zu einer Reihe von gesetzlichen Regelungen. Während das erste Pflanzenschutzmittelgesetz aus dem Jahre 1937 lediglich den Schutz der Kulturpflanze beinhaltete, wurden 1968 erste Auflagen zum Schutz der Anwender und Verbraucher erlassen. Erst 1987 wurden Gesetze verabschiedet, die auch die Gefährdung der Umwelt einbezogen.⁴ Am 14. Mai 1998 erfolgte schließlich eine Festschreibung des integrierten Pflanzenschutzes. Dieser wird definiert als „eine Kombination von Verfahren, bei denen unter vorrangiger Berücksichtigung biologischer, biotechnischer, pflanzenzüchterischer sowie anbau- und kulturtechnischer Maßnahmen die Anwendung chemischer Pflanzenschutzmittel auf das notwendige Maß beschränkt wird“.¹⁷

Diese gesetzlichen Vorgaben stellen die chemische Industrie vor große Aufgaben. So ist es auch nicht verwunderlich, dass die Entwicklung eines Pflanzenschutzmittels von der ersten Synthese bis zur Markteinführung durchschnittlich 10 Jahre dauert und mit enormen Kosten verbunden ist.

2. Trends in der Leitstruktursuche

Die Zeiten, in denen von Wirkstoffen nur die chemische Struktur und die beobachtete Wirkung bekannt waren, sind längst Vergangenheit. Es ist für eine sichere Anwendung erforderlich, Eigenschaften, wie die Aufnahme und den Transport, sowie die Wirkung und den Wirkmechanismus beim Zielorganismus zu kennen. Ferner ist von Bedeutung, wie sich der Abbau in Pflanze, Tier, Wasser, Boden und Luft vollzieht, und welche Rückstände und Metabolite auftreten. Auch die Frage nach den Nebenwirkungen auf Nichtzielorganismen ist vor einer Markteinführung zu klären.¹⁸ Die Notwendigkeit, alle diese Parameter bis zur

Markteinführung eines Pflanzenschutzmittels zu kennen, sorgte für eine explosionsartige Kostenentwicklung. Zwischen 125 und 150 Mio. Euro betragen heute die Entwicklungskosten für ein marktfähiges Produkt.⁵

Bei den meisten neuen Pflanzenschutzmitteln auf dem Markt handelt es sich um Verbesserungen bekannter Produkte. Mit Verbesserungen sind günstigere toxikologische, ökologische, resistenzbrechende Eigenschaften sowie eine geringere Auftragsmenge gemeint. Wirkstoffe mit neuem Target, die neue Märkte erschließen, sind sehr selten.⁵

Seit Beginn der 90'er Jahre des vorigen Jahrhunderts konnten viele Firmenzusammenschlüsse und Umstrukturierungen beobachtet werden.¹⁹ Der letzte große Firmenzusammenschluss erfolgte Anfang 2004 mit der Übernahme der Firma Aventis durch die Firma Sanofi. Ziel solcher Zusammenschlüsse ist es unter anderem, die Kosten für die Produktion zu senken und die Forschung effektiver zu gestalten.²⁰ Parallel dazu vollzogen sich in der Forschung einige Paradigmenwechsel, so der Wechsel zur kombinatorischen Chemie oder zur Gentechnik.

Die Industrie ist mittlerweile in der Lage, mehrere tausend Substanzen im HTS- und neuerdings im UHTS-Verfahren innerhalb sehr kurzer Zeit auf eine bestimmte biologische Aktivität hin zu testen. Somit sind die technischen Voraussetzungen gegeben, eine große Anzahl von Substanzen parallel zu untersuchen. Die entscheidende Frage ist jedoch, woher die vielen Moleküle mit neuen Strukturen für diese Testsysteme kommen sollen.

In einem Syntheselabor mit drei bis fünf Personen können bis zu 300 Verbindungen in einem Jahr hergestellt werden.⁵ Für die modernen Testsysteme ist dies jedoch viel zu wenig. Es mussten neue innovative Konzepte her. Mit der kombinatorischen Chemie glaubte man, einen Durchbruch zu erreichen. Die Idee dieses Verfahrens ist, durch die Kombination von Sets an Synthesebausteinen verschiedene Moleküle in großer Zahl herzustellen. Diese Technologie erlaubt es, bis zu 1000000 Verbindungen pro Jahr im Split-and-Mix-Verfahren zu synthetisieren.²¹ Andere moderne Ansätze beschäftigen sich mit der Entwicklung von Parallel- und Festphasen-Synthesen für Einzelverbindungen.²² Sicher bietet die kombinatorische Chemie einen interessanten Ansatz, eine neue Leitstruktur ist daraus jedoch bisher nicht hervorgegangen.

Einen ganz anderen Weg geht die Naturstoffchemie. Mit Hilfe verschiedener Screening-Methoden begibt man sich auf die Suche nach neuen Naturstoffen, die als Leitstruktur dienen können. Untersucht werden unter anderem Bakterien, Pilze und Pflanzen hinsichtlich ihrer Sekundärmetaboliten-Produktion. Beschränkte man sich zu Beginn der Untersuchungen auf terrestrische Habitate, so werden heute auch marine und außergewöhnliche Habitate wie Höhlen, heiße Quellen, Schwefelquellen usw. mit in die Suche einbezogen.

Bei den klassischen Methoden ist zum einen das chemische Screening zu nennen, bei dem man sich die Dünnschichtchromatographie und das Anfärbeverhalten der Metaboliten zu Nutze macht. Nach der Isolierung und der Strukturaufklärung können die Verbindungen in verschiedene Testsysteme eingeschleust werden, um sie auf verschiedene biologische Aktivitäten hin zu testen. Die Detektion kann auch auf physikochemischen Weg erfolgen. In diesem Screening-Ansatz wird unter Verwendung von UV-Spektroskopie²³ oder CD-Spektroskopie²⁴ nach neuen Naturstoffen gesucht. Als besonders hilfreich haben sich hier gekoppelte Verfahren erwiesen, dazu gehören vor allem HPLC-UV/VIS-, HPLC-MS-²⁵, HPLC-CD-²⁴ und HPLC-NMR²⁶-Methoden. Um Re-Isolierungen von Metaboliten zu vermeiden, wurde dazu übergegangen, diese Systeme mit computergestützten Datenbanken zu kombinieren. So ist es mit einem Abgleich der UV- oder MS-Daten von bekannten Substanzen möglich, schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt die Identität eines Metaboliten zu einer bestimmten Substanzklasse bzw. seine Zugehörigkeit zu ermitteln.²⁷

Die meisten Veränderungen sind im Bereich des biologischen Screenings zu verzeichnen. Ursprünglich wurde der biologische Effekt von Extrakten oder Reinsubstanzen in Plattendiffusionstests gegen verschiedene Testkeime untersucht. Heute, in der Zeit von Genomics²⁸ und Proteomics²⁹, steht die Target-orientierte Wirkstoffsuche im Vordergrund. Mit dem Ziel einer definierten Anwendung werden bei diesem Ansatz spezifische Wechselwirkungen mit molekularen Targets, wie Rezeptoren, Enzyme oder bestimmte Bereiche der DNA und RNA erforscht. Die Übertragung der Ergebnisse auf in vivo-Systeme erweist sich jedoch häufig als Problem, so dass umfangreiche Optimierungen bezüglich der Struktur vorgenommen werden müssen. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber dem klassischen biologischen Screening-Ansatz ist jedoch die große Anzahl der zur Verfügung stehenden Testsysteme.³⁰

Auch für die kombinatorische Biosynthese, einem weiteren innovativen Konzept zur Generierung neuer Leitstrukturen, ist die Gentechnik Grundlage. Ausgangspunkt ist die Entdeckung von PKS und NRPS Biosynthesegenen in den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts.³¹ Aus der großen Familie der Polyketide, die von Pflanzen, Pilzen und Bakterien gebildet werden, sind viele Substanzen von Bedeutung für die Medizin. Hierzu zählen die Tetracycline, Lovastatin und Erythromycin. Im Bereich des Pflanzenschutzes gehören hierzu die Methoxyacrylate. Mit der Kenntnis des Genclusters gibt es viele Möglichkeiten, diese genetisch zu modifizieren. Durch den Einbau eines anderen Lademoduls in eine PKS kann beispielsweise eine andere Startereinheit zum Aufbau des Metaboliten herangezogen werden. Eine Veränderung der Seitenkette kann erreicht werden, indem eine

Acyltransferase ausgetauscht wird. Hierdurch wird ein anderer Acyl-Baustein eingebaut. Ferner kann durch das Entfernen ganzer Module die Kettenlänge verkürzt werden. Auch die Kombination von PKS- und NRPS- Modulen ist machbar.³² So konnten in Versuchen mit dem Erythromycin-Produzenten durch die Kombination verschiedener Module 50 unnatürliche Naturstoffe, die in bis zu 3 verschiedenen Positionen gegenüber dem natürlichen Metaboliten verändert waren, erhalten werden.³² Die Kombinatorische Biosynthese bietet somit ein riesiges Potential für neue Strukturen, das sich durch die Entdeckung weiterer Biosynthesegene erweitern lässt.^{33,34}

3. Halogenierte Naturstoffe im Pflanzenschutz

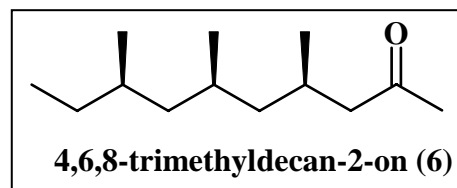
Seit einiger Zeit spielen halogenierte Naturstoffe oder auf deren Struktur basierende Derivate eine wesentliche Rolle im Pflanzenschutz und in der Medizin. Waren bis vor dreißig Jahren lediglich 200 Naturstoffe bekannt, die ein Halogen enthalten, sind es heute über 3800.³⁵ Am häufigsten werden die Elemente Chlor und Brom in diesen Naturstoffen aufgefunden. Lediglich 95 enthalten Jod und 100 Fluor. Die meisten dieser Naturstoffe sind marinen Ursprungs. Doch auch terrestrische Bakterien, Pilze und Pflanzen sind Produzenten von halogenierten Metaboliten. So produziert die Japanische Lilie *Lilium maximowiczii* sieben verschiedene Chlorphenole zur Verteidigung, nachdem sie vom Pilz *Fusarium oxysporum* befallen wurde.³⁶ Die allgemeine Meinung über viele Jahre war, dass die halogenierten Naturstoffe durch Aufarbeitungsartefakte entstehen bzw. es sich um Abnormalitäten der Natur handelt.³⁵ Den ersten Nachweis eines Enzyms, das für den Einbau eines Halogens verantwortlich ist, erbrachten L.P. Hager et. al. im Jahre 1959, als sie die Biosynthese von Caldariomycin studierten.³⁷ Heute unterscheidet man die Haloperoxidasen in Chlorperoxidasen, die Chlor, Brom und Jod verarbeiten können und Bromperoxidasen, die Brom und Jod verarbeiten können, sowie die nur Jod verarbeitende Jodperoxidase.³⁸ Lange Zeit galten diese Haloperoxidasen als einzige Möglichkeit, mit der Organismen Halogene in Naturstoffe einbauen. Bei der Biosynthese von Pyrroitrin konnten S. Kirner et. al. für den Einbau von Chlor jedoch ein Gen identifizieren, das nicht die Gruppe der Haloperoxidasen kodiert. Das Enzym benötigt FADH₂ sowie O₂ zur Aktivierung und zeichnet sich durch seine Regiospezifität über eine Monooxygenase aus.^{39,40} Solche FADH₂ abhängigen Halogenase-Gene sind mittlerweile auch in den Genclustern für die Biosynthese von Balhimycin, Pyoluterin und Chloroeremomycin nachgewiesen.⁴¹ Von großem Interesse für die Industrie wäre jedoch eine Fluorinase, wie sie zum Beispiel in den Produzenten von Nucleocidin (*S. calvus*) oder 4-Fluorothreonine (*S. cattleya*) vorkommen sollte.³⁸ Bisher ist es nur unter

sehr aggressiven Methoden möglich, Fluorverbindungen zu synthetisieren. Unter Verwendung eines Enzyms würde dies unter wesentlich milderen Bedingungen geschehen können. Somit wäre die Möglichkeit gegeben, unter eher natürlichen Bedingungen auch instabile Verbindungen zu fluorieren. Fluorverbindungen sind gegenüber den anderen Halogenverbindungen von besonderem Interesse.³⁸ Aufgrund der geringen Größe von 1.47 Å von Fluor, kann eine Hydroxygruppe, die eine Größe von 1.4 Å aufweist, oder ein Proton simuliert werden. So werden die sterischen Eigenschaften nicht verändert, und die biologische Aktivität wird nicht beeinflusst. Durch die Einführung eines Fluor-Atoms werden zudem die lipophilen Eigenschaften einer Verbindung erhöht. Tauscht man also eine Hydroxygruppe gegen ein Fluor aus, so kann damit die Aufnahme und der Transport der Verbindung in den Zielorganismus positiv beeinflusst werden. Als letztes wäre noch die oxidative, thermische und metabolische Stabilität zu erwähnen, die aufgrund der hohen Kohlenstoff-Fluor Bindungsenergien von 116 kcal mol⁻¹ (gegenüber: C-H = 98 kcal mol⁻¹; C-N = 73 kcal mol⁻¹; C-Cl = 81 kcal mol⁻¹; C-Br = 68 kcal mol⁻¹ und C-I = 57 kcal mol⁻¹) positive Auswirkungen auf die Verbindung zeigt.⁴² Viele Anforderungen, die an Pflanzenschutzmittel gestellt werden, können durch die Einführung von Fluor aus den zuvor genannten Gründen in einer Substanz erhalten werden. Zu diesen Anforderungen gehören Penetrationsrate, Polarität, Löslichkeit, Toxizität und Flüchtigkeit, um nur einige zu nennen. So ist es nicht verwunderlich, dass 28 % aller halogenierten Pflanzenschutzmittel Fluor oder Fluor-tragende Gruppen enthalten.¹³

4. Alternative Ansätze im Pflanzenschutz

Die Anzahl der Verbindungen, die die Natur bereitstellt, und deren chemische Diversität ist beeindruckend.¹² Dies betrifft auch Naturstoffe, die der Kommunikation zwischen Pflanzen und Tieren dienen. In den letzten Jahrzehnten ist das Interesse der Wissenschaft und der Industrie in diesem Bereich geweckt worden. Intensive Forschung im Bereich der Pheromone, Antifeedants und Repellents führten zu ersten Erfolgen im Pflanzenschutz. Ein Beispiel aus der Anwendung ist die Verwirrtechnik, die durch das Ausbringen von entsprechenden Pheromonen die Vermehrung von Insekten verhindern soll. In dieser Pheromonwolke finden weibliche und männliche Insekten einer Art nicht zueinander, so dass es nicht zur Paarung kommt. „Attract and kill“ scheint momentan der viel versprechende Ansatz zu sein, geeignete Pflanzenschutzmittel zu entwickeln.⁵ Das Insekt wird mittels Pheromonen direkt zum Insektizid gelockt. Beide Substanzen sind hierbei in einer viskosen Formulierung eingearbeitet. Sirene[®] von Novartis und Appeal[®] von Bayer sind zwei Produkte, die auf dieser

Methode basieren. Ein Vorteil ist, dass Pheromon und Insektizid in sehr geringen Mengen benötigt werden. Zudem ist die Methode äußerst selektiv, da nur der Hauptschädling auf das Pheromon anspricht. Dies kann allerdings auch als Nachteil der Methode angesehen werden, da jede Formulierung nur bestimmte Arten erfasst. Im Rahmen des integrierten Pflanzenschutzes bieten sich einige bemerkenswerte Möglichkeiten, Pflanzenschutzmittel zu entwickeln, die auf dieser Methode basieren, wie aus dem Aggregationspheromon 4,6,8-Trimethyldecanyl-2-on (**6**).⁴³



Pflanzen verfügen über komplizierte Regulationsmechanismen, mit denen sie in der Lage sind, die Biosynthese von Defensivsubstanzen zu aktivieren.⁴⁴ Hierfür ist ein effektives Signaltransduktionssystem notwendig, das sehr schnell auf mikrobielle Infektionen oder Schädlingsbefall reagiert. Ausgelöst wird das Signalsystem durch Elicitoren, die verschiedenen Substanzklassen angehören. Es kann sich im Falle von phytopathogenen Pilzen um Oligosaccharide aus deren Zellwand handeln, um Proteine wie das Elicitin oder um β -Glucosidasen, die im Speichelsekret von Insekten vorkommen. Die Erkennung der Elicitoren induziert in den meisten Fällen die Biosynthese von Jasmonsäure, wodurch es zu einer Aktivierung von Genen kommt.⁴⁵ Dies wiederum führt zur Biosynthese von Sekundärmetaboliten oder Proteinen, die der Verteidigung dienen.⁴⁶ Neben der Jasmonsäure spielen Ethylen und Salicylsäure eine Rolle für die Abwehrinduktion. Mittlerweile sind synthetische Substanzen bekannt, die eine solche Resistenzinduktion bewirken. So hat die Firma Novartis 1996 das Präparat Bion[®], ein Benzothiadiazol⁴⁷, in den Markt eingeführt, das eine SAR (systemic acquired resistance) auslöst.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es schwer, auf alle Ansätze im Pflanzenschutz einzugehen. Zu erwähnen sind jedoch noch biologische Ansätze, wie die *Bacillus-thuringiensis*-Präparate gegen Lepidopteren, Coleopteren und Dipteren. Ebenso erwähnenswert ist der Bereich der transgenen Pflanzen.⁵ In diesem Fall wird das Genom der Kulturpflanze so verändert, dass diese resistent gegenüber Schädlingsorganismen sind. Letztere haben sich auf dem amerikanischen Markt bereits etabliert und werden dort auch von der Öffentlichkeit angenommen. Innerhalb der EU hingegen ist dieses Verfahren umstritten. Schon seit Jahren

wird dieses Thema in der Bundesrepublik Deutschland durch alle Interessenverbände hindurch und in der breiten Öffentlichkeit kontrovers diskutiert. Dieses liegt unter anderem auch am steigenden Umweltbewusstsein der Bevölkerung. Zudem gibt es in der BRD noch keine ausreichende gesetzliche Grundlage für die Anwendung von transgenen Pflanzen in der Landwirtschaft. Auch eine Risiko-Nutzen-Betrachtung steht noch aus. Dennoch sind in einigen Bundesländern zurzeit einige Modelversuche genehmigt worden.

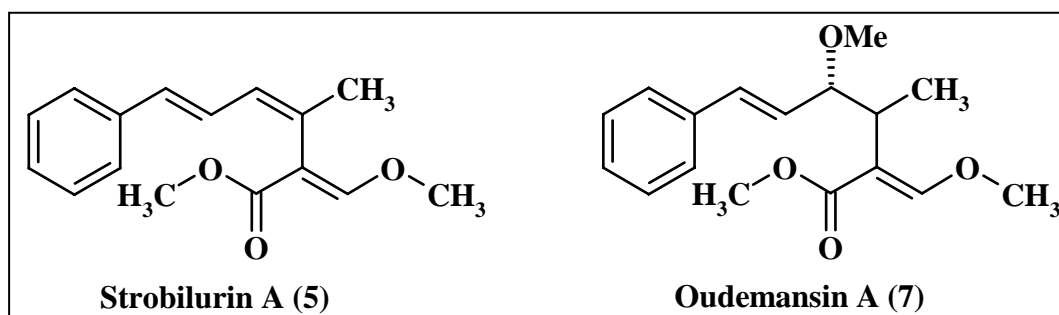
Die Gentechnik hat nicht nur im Bereich des Pflanzenschutzes, sondern auch im medizinischen Bereich einige innovative Veränderungen herbeigeführt. Dennoch wird die Chemie auch weiterhin eine gewichtige Rolle in diesen Bereichen spielen. Die verschiedenen Konzepte, wie die weiter entwickelten klassischen Screening-Methoden, die kombinatorische Chemie, kombinatorische Biosynthese, natürliche Abwehr- und Kommunikationsmechanismen, biologische Präparate und transgene-Pflanzen sind und sollten nicht als Einzeldisziplin betrachtet werden. Die Natur hat im Laufe der Evolution ausgeklügelte Abwehrmechanismen entwickelt, die als Vorbild zur Entwicklung von Pflanzenschutzmitteln und Medikamenten dienen können.¹² Die Erforschung dieser komplexen Zusammenhänge in der Natur ist nur durch interdisziplinäre Forschung zu bewerkstelligen. Ein enges Zusammenarbeiten von Naturstoffchemikern, Synthesechemikern, Biologen, Genetikern, Ökologen und Physikern wird in Zukunft von großer Bedeutung sein und sicherlich noch einige Überraschungen zu Tage fördern.

5. Aufgabenstellung

In Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Aufklärung der Biosynthese von Strobilurin A (**5**), das vom Basidiomycetenstamm *Strobilurus tenacellus* produziert wird. Zu diesem Thema lagen eine Veröffentlichung und eine Doktorarbeit aus England vor, die sich in ihren Ergebnissen stark unterscheiden. Daraus ergaben sich mehrere Fragen, die durch Fütterung isotope markierter Verbindungen geklärt werden sollten. Zum einen sollten genaue Aussagen zum zeitabhängigen Einbauverhalten des Stammes gemacht werden. Die Einbaumuster würden auf den Mechanismus der Umlagerung in der Seitenkette zur pharmakophoren Methoxyacrylat-Einheit schließen lassen. Außerdem bedarf es der Klärung der Startereinheit.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der vorläufer-dirigierten Biosynthese. Durch Fütterung geeigneter Vorläufer sollte überprüft werden, inwieweit unnatürliche Startereinheiten akzeptiert werden und der Stamm *Strobilurus tenacellus* somit zur Produktion neuer Strobilurine angeregt werden kann. Außerdem wurden synthetische Fluor-markierte Benzoesäurethioester bzw. Zimtsäurethioester Vorläufer von der Arbeitsgruppe T.J. Simpson (University of Bristol, School of Chemistry) zur Verfügung gestellt. Des weiteren stellte sich die Frage, ob der Stamm das Potential hat, durch Zugabe von verschiedenen Halogensalzen andere Halogene als Chlor am Aromaten einzubauen.

Der Biosynthese von Oudemansin A (**7**) wird im dritten Teil der Arbeit nachgegangen. Bei Oudemansin A handelt es sich um eine zu Strobilurin A (**5**) verwandte Substanz, die sich lediglich in der Seitenkette unterscheidet. Aufgrund der Strukturverwandschaft sollte hier die Frage beantwortet werden, ob die Biosynthesen dieser beiden Substanzen ähnlich verlaufen. Auch der Frage der Biosyntheseleistung soll unter Verwendung der Methode der vorläufer-dirigierten Biosynthese nachgegangen werden.

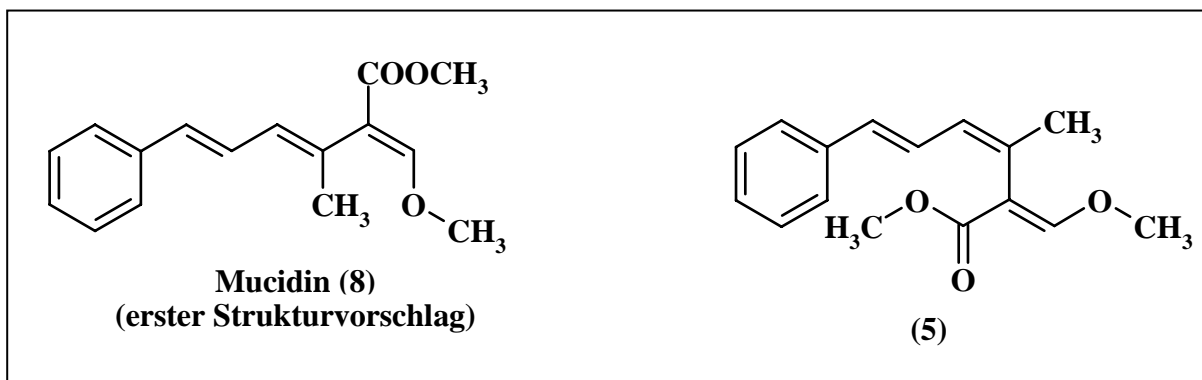


II. Isolierung und Charakterisierung von Strobilurin A

1. Geschichte der Strobilurine

Mit der Isolierung des Sekundärmetaboliten Mucidin (**8**) aus dem Basidiomyceten *Oudemansiella mucidia* begann im Jahr 1965 die Forschung an den Strobilurinen. Musilek et. al. beschrieben dessen antifungische Wirkung und patentierte die Struktur in Zusammenarbeit mit der Firma Spofa. Aus diesem Patent ging das zur Behandlung von Hautkrankheiten eingesetzte Medikament Mucidermin[®] hervor. Das Potential der Substanz für eine Anwendung im Pflanzenschutz wurde jedoch zunächst nicht erkannt.⁴⁸

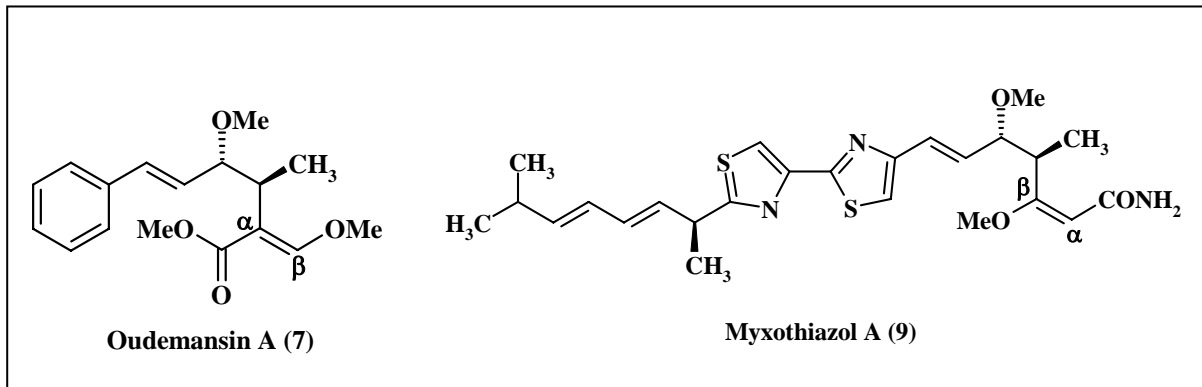
Zwölf Jahre später, im Jahre 1977, beschrieben T. Anke et. al. und W. Steglich et. al. die Isolierung und Strukturaufklärung von **5** aus dem Basidiomyceten *Strobilurus tenacellus*.^{49, 50} Erste biologische Tests zeigten eine hohe Aktivität gegenüber phytopathogenen Pilzen.⁵¹



Ein Vergleich der Strukturen von **8** und **5** verdeutlicht, dass sie sich lediglich in der Konformation einer Doppelbindung unterscheiden. Während Mucidin mit einer *E,E,E* Konfiguration veröffentlicht wurde, weist Strobilurin A eine *E,Z,E* Konfiguration auf. Vergleichende Untersuchungen von 1981 bis 1986 zeigten, dass es sich um dieselbe Substanz handelt, und die von Anke et. al. und Steglich et. al. postulierte *E,Z,E* Konfiguration konnte bestätigt werden.^{52,53,54}

Bis heute konnten 15 verschiedene Strobilurine⁵⁵ aus insgesamt 34 verschiedenen Arten und Unterarten, die zu 12 verschiedenen Gattungen gehören, isoliert werden. Mit Ausnahme von *Bolinea lutea*, welcher der Familie der Ascomyceten angehört, sind alle Strobilurin-Produzenten der Familie der Basidiomyceten zuzuordnen. Neben den Strobilurinen konnten aus diesen Stämmen verschiedene Oudemansine isoliert werden.⁵⁶ Das 1979 aus *Oudemansiella mucidia* isolierte Oudemansin A (**7**), ist mit den Strobilurinen strukturverwandt und zeigt eine vergleichbare antifungische Wirkung.⁵⁷

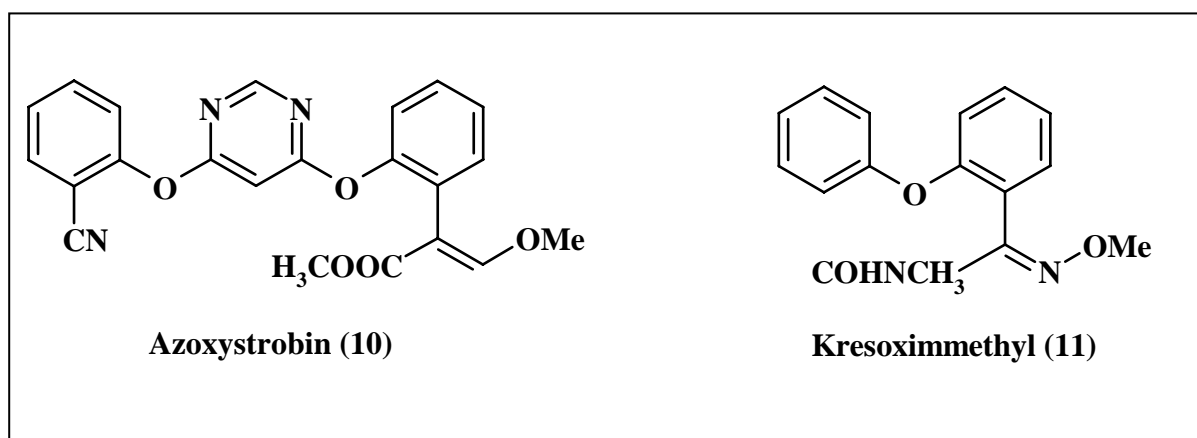
Die Strobilurine bilden eine neue Klasse von antifungisch wirksamen Naturstoffen, die als Methoxyacrylate bezeichnet werden. Zu dieser Klasse gehören auch die Oudemansine und Myxothiazole wie das Myxothiazol A (**9**).⁵⁸ Die Methoxyacrylat-Einheit kann wie bei Strobilurin A und Oudemansin A in α -Position mit dem Rest des Moleküls verbunden sein oder in β -Position, wie beim Myxothiazol A, das einen Acrylamidrest aufweist.



Pharmakologische Untersuchungen zeigen die Bedeutung der Methoxyacrylat-Gruppe für die biologische Aktivität.⁵⁹ So bindet die Gruppe reversibel an das Ubihydrochinon-Oxidations-Zentrum des bc_1 -Komplexes. Bei diesem Komplex handelt es sich um ein Enzym, das in der Mitochondrienmembran von Pilzen und anderen Eukaryonten lokalisiert ist und den Elektronentransport von Ubihydrochinon auf Cytochrom C katalysiert. Im Zuge dieses Prozesses kommt es zum Aufbau eines Protonengradienten, der die Bildung von ATP antreibt.⁶⁰ Weiterführende Untersuchungen haben ergeben, dass diese Verbindungsklasse eine spezifische Bindung mit dem Cytochrom b des bc_1 -Komplexes eingeht, und so eine Änderung der Konformation bewirkt.⁶¹ Dies hat zur Folge, dass Ubihydrochinon noch binden kann, aber eine Oxidation unterbleibt und der Elektronentransport unterbunden wird.⁵⁹ Als weitere Folge kommt es nicht mehr zum Aufbau des Protonengradienten, und es unterbleibt die Bildung von ATP, was zur Hemmung der Protein-, RNA- und DNA-Synthese führt.⁴⁹ Vergleichende Untersuchungen mit synthetischen Analoga zeigten, dass die E-Konformation und nicht die Z-Konformation an der dritten Doppelbindung für die Entfaltung der Wirkung wichtig ist.⁵⁹ Bis heute sind eine Vielzahl von Total-Synthesen zu den Strobilurinen bekannt.^{62,63}

Die erste Patentanmeldung für **5** erfolgte 1980 von der Firma Höchst. Dieses Patent war auf eine Anwendung als Antimykotikum in der Humanmedizin ausgerichtet und beschrieb u.a. eine Synthese von **5**. Das Patent wurde jedoch aufgrund wirksamerer Antimykotika auf dem Markt wieder abgegeben.² Somit schien zunächst das Interesse der Industrie an den Strobilurinen erloschen zu sein.

Einige Jahre später zeigten die Firmen Zeneca und BASF Interesse an den Methoxyacrylaten. Erste Tests in Gewächshäusern zeigten eine hohe Aktivität gegen phytopathogene Pilze. Die Wirkung war jedoch nur kurz, und es mussten große Mengen der Substanz appliziert werden. Schnell wurde klar, dass **5**, welches der BASF zur Verfügung stand, eine hohe Lichtempfindlichkeit aufgrund des konjugierten Doppelbindungs-Systems aufweist. Für beide Firmen war eine weitere Bearbeitung der Methoxyacrylate aus mehreren Gründen von Interesse. Zum einen lagen positiven Testergebnisse vor, die eine weitere Bearbeitung attraktiv machten, und zum anderen handelte es sich um ein bis dahin nicht bekanntes Strukturprinzip mit biologischer Aktivität, und der Wirkort dieser Verbindungsklasse wurde durch kein auf dem Markt befindliches Pflanzenschutzmittel erreicht. In den darauf folgenden Jahren versuchte man, die Struktur so abzuwandeln, dass eine höhere Lichtstabilität erreicht wird. Im Jahre 1996 gelang es, die ersten Pflanzenschutzmittel, die auf der Basis dieser Leitstruktur beruhen, auf dem Markt zu platzieren. Bei Zeneca war es das Azoxystrobin (**10**) und bei der BASF das Kresoxim-methyl (**11**).



Firmen wie Novartis, Bayer und Shionogi entwickelten ebenfalls Pflanzenschutzmittel, die sich von der Struktur der Strobilurine ableiteten. Die Weiterentwicklung der Methoxyacrylate als Pflanzenschutzmittel ist schon aufgrund der zunehmenden Resistenz von großem Interesse für die Industrie.⁶⁴ Auftretende Resistenzen können z.B. durch die Einführung anderer funktioneller Gruppen zum Teil überwunden werden. So wird damit gerechnet, dass der Marktanteil von Strobilurin-Pflanzenschutzmittel von ca. 6 % auf etwa 17 % in den nächsten Jahren steigt.

2. Entwicklung von Strategien

2.1. Chemisches Screening

Der Stamm *Strobilurus tenacellus* kam von Prof. T. Anke für die Untersuchung der Biosynthese der Strobilurine.*¹ Am Anfang war es notwendig, für die Produktion von Strobilurin A (**5**) ein geeignetes Medium zu finden und einen Überblick auf die Biosyntheseleistung des Stammes zu erhalten. Dazu kam der OSMAC-Ansatz⁶⁵ in Verbindung mit dem chemischen Screening⁶⁶ zum Einsatz.

Hierzu wurde der Stamm in fünf typischen Pilz-Medien – E2, M2, G20, 1405 und 1158- in Schüttelkolben über einen Zeitraum von sieben Tagen bei 22 °C kultiviert. Angeimpft wurde mit 10 ml einer sieben Tage alten Vorkultur. Nach Trennung von Mycel und Kulturfiltrat wurden diese separat aufgearbeitet. Die erhaltenen Rohprodukte wurden in Methanol/Wasser (1:1) aufgenommen und dünnschichtchromatographisch untersucht. Entwickelt wurde in zwei verschiedenen Laufmittelsystemen, die eine unterschiedliche Polarität aufweisen. Zuerst erfolgte die Entwicklung in Chloroform/Methanol (9:1) und anschließend in n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5, obere Phase). Man untersuchte die Eigenfarbe und die Absorption bei 254 nm und 366 nm der einzelnen Zonen. Um die Detektion verschiedener Substanzklassen zu gewährleisten, wurden die Dünnschichtchromatogramme mit Anisaldehyd/Schwefelsäure (charakteristische Anfärbung für Zucker, Steroide, Terpene), Vanillin/Schwefelsäure (für Alkohole, Phenole, Terpene), Orcin (Zucker) und Ehrlich-Reagenz (für Amine, Furane) angesprüht und so die verschiedenen Zonen sichtbar gemacht.⁶⁷

Die oben genannten Medien wurden für einen weiteren Screening-Ansatz verwendet, der bei 28 °C durchgeführt wurde. Parallel wurde über sechs Wochen eine Ruhefermentation in P-Kolben bei Raumtemperatur in den oben genannten Medien durchgeführt. Alle entwickelten Dünnschichtchromatogramme wiesen ein identisches Metabolitenspektrum auf. Anhand des bekannten Rf-Wertes und des Anfärbeverhaltens konnte Strobilurin A (**5**) identifiziert werden. Demnach war **5** nur im Mycel vorhanden, die entsprechenden Zonen weisen jedoch unterschiedliche Intensitäten auf. Unter standardisierten Bedingungen sind Rückschlüsse auf die produzierte Menge einer Verbindung möglich. Da die höchste Intensität im Medium M2 auftrat, wurde dieses Medium für alle weiteren Kultivierungen ausgewählt. Ansonsten gab es keine Hinweise auf weitere interessante Metabolite

*1 Herr Prof. Dr. T. Anke, Universität Kaiserslautern, Abteilung Biotechnologie am Fachbereich Biologie, danke ich für die Überlassung des Stammes.

2.2. Kultivierung in Schüttelkolben

Erste Kultivierungen des Stammes *Strobilurus tenacellus* wurden im 1L-Maßstab in Schüttelkolben mit drei Schikanen durchgeführt. In Hinblick auf die geplanten Fütterungsversuche galt es, Strategien für eine verlässliche Produktion, sowie ein geeignetes Aufarbeitungs- und Isolierungsschema zu entwickeln. Zudem sollten genaue spektroskopische Daten aus Massen- und NMR-Spektren von Strobilurin A (**5**) für die Auswertung der Fütterungsexperimente ermittelt werden.

Eine konstante Ausbeute von **5** konnte in mehreren Ansätzen nicht erreicht werden. Als vorteilhaft stellte sich heraus, eine Animpfung mit 10 mL einer sieben Tage alten Vorkultur vorzunehmen. Entscheidend dabei ist, eine möglichst große Menge an Mycel und wenig Kulturlösung zum Animpfen zu verwenden. Ferner sollte das Mycel in großen Pellets vorliegen und das Nährmedium darf nicht trübe sein. Hierdurch wird ein Absterben des Stammes während der Hauptkulturen verhindert und man erhält eine ausreichende Menge an Strobilurin A für die spektroskopischen Untersuchungen.

Für die Aufarbeitung wurde das Mycel abfiltriert, in Methanol/Aceton (2:1) übergeführt und 15 Minuten im Ultraschallbad aufgeschlossen. Zur Isolierung wurde der Verdampfungsrückstand des Mycels auf Kieselgel aufgezogen und **5**, wie in Abbildung 3 dargestellt, isoliert.

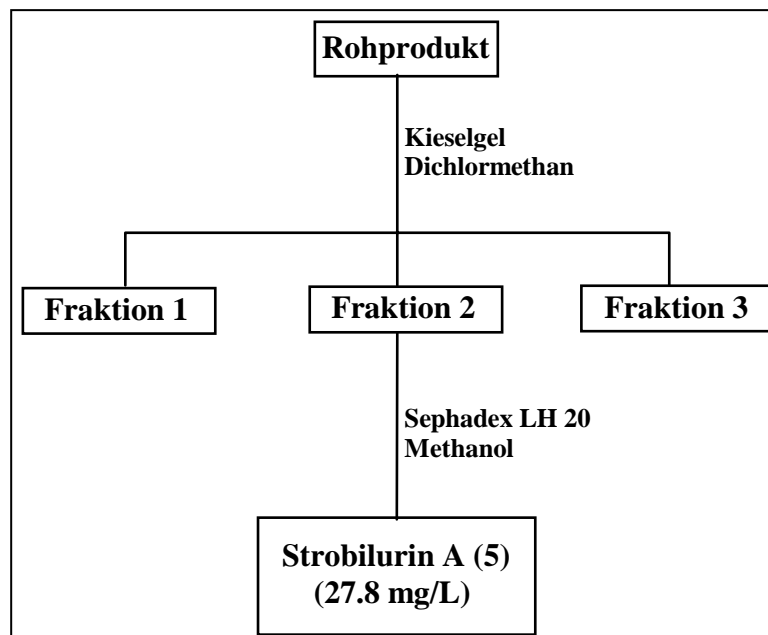


Abb. 3: Isolierungsschema von **5**

Auf diesem Weg konnten bis zu 27.8 mg/L von **5** isoliert werden. In einem parallel laufenden Experiment wurde das Mycel, nachdem es in das genannte Lösungsmittelgemisch überführt

wurden war, erst mit dem UltraTurrax 15 Minuten zerkleinert. Anschließend erfolgten die Ultraschallbehandlung und die Isolierung. Die Ausbeute konnte so auf maximal 40 mg/L gesteigert werden.

Strobilurin A (**5**) fiel als gelbliches Öl an, löscht auf DC-Platten UV-Licht (254 nm) und färbt mit Anisaldehyd/H₂SO₄ und Ehrlichs Reagenz blau an. Die Substanz löst sich gut in Methanol, Aceton oder Chloroform. Das EI-Massenspektrum zeigt bei $m/z = 258$ das Molekül-Ion. Die beobachtete Fragmentierung von **5** ist in Abbildung 4 dargestellt (in Anlehnung an W. Steglich et. al).⁵⁰

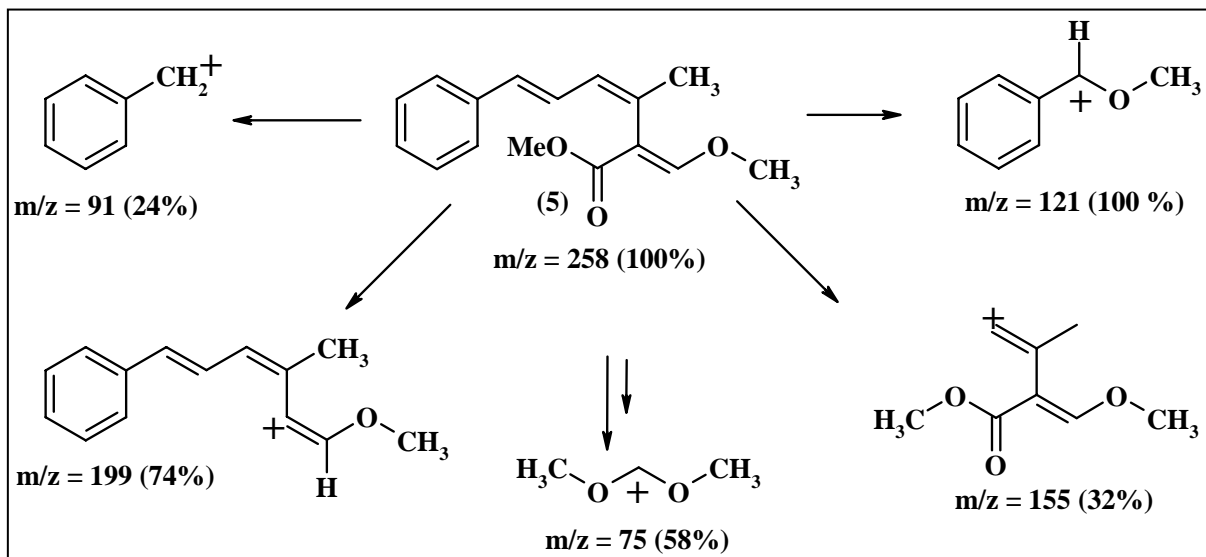


Abb. 4: Beobachtete Fragmentierungen von **5** im EI-Massenspektrum

Aus den Intensitäten im ¹H-NMR Spektrum lässt sich die Existenz von 18 Protonen ableiten. Eindeutig zu erkennen sind eine Methylgruppe bei $\delta_{\text{H}} = 1.90$, sowie zwei Methoxygruppen bei $\delta_{\text{H}} = 3.70$ und 3.84 . Charakteristisch ist das α -Proton der β -Methoxyacrylateinheit, das im Protonenspektrum als Singulett bei $\delta_{\text{H}} = 7.42$ auftritt. Das Dien-System, ebenfalls charakteristisch für die Strobilurine, liegt im Bereich von $\delta_{\text{H}} = 6.1 - 6.7$. Die Kopplungskonstante von $J_{7,8} = 16$ Hz zeigt die trans Stellung der beiden Protonen zueinander, $J_{8,9}$ beträgt 10 Hz. Des Weiteren sind 5 aromatische Protonen im Spektrum zu erkennen. Das Signal im ¹³C-NMR-Spektrum bei $\delta_{\text{C}} = 169.5$ entspricht der α,β -ungesättigten Estergruppe. Die chemische Verschiebung der olefinischen Methylgruppe mit $\delta_{\text{C}} = 23.8$ kann auf den Einfluss der benachbarten Enoether-Gruppe zurückgeführt werden.

Die beiden Methoxygruppen geben Signale bei $\delta_{\text{C}} = 51.9$ und 62.3 . Mittels ¹H,¹H-COSY, HMBC und HSQC Experimenten, sowie den Abgleich mit Literaturwerten, wurde **5** eindeutig identifiziert.

In Tabelle 1 sind die chemischen Verschiebungen aus den ^{13}C -NMR- und ^1H -NMR-Spektren aufgeführt. Im Hinblick auf die Auswertung von Fütterungsexperimenten mit markierten Vorläufern war eine genaue Zuordnung der Kohlenstoff-Atome im Molekül notwendig.

Position	^{13}C -NMR δ_{C} (ppm) (Lit.) ⁵⁰	^{13}C -NMR δ_{C} (ppm)	^1H -NMR δ_{H} (ppm) und J [Hz]
1	132.5	132.43	---
2	128.0	127.16	7.32 ($J_{2,3} = 7.0, J_{2,6} = 2.0$)
3	128.3	129.59	7.25 ($J_{2,3} = J_{3,4} = 7.0, J_{3,5} = 2.0$)
4	127.3	128.21	7.1 ($J_{4,3} = J_{4,5} = 7.0, J_{4,2} = J_{4,6} = 2.0$)
5	128.3	129.59	7.25 ($J_{5,4} = J_{5,6} = 7.0, J_{5,3} = 2.0$)
6	128.0	127.16	7.32 ($J_{6,5} = 7.0, J_{6,4} = J_{6,2} = 2.0$)
7	129.7	131.89	6.42 ($J_{7,8} = 16$)
8	131.1	127.83	6.6 ($J_{8,9} = 10.0, J_{8,7} = 16.0$)
9	132.0	130.9	6.17 ($J_{9,8} = 10.0$)
10	139.3	139.19	---
11	111.7	111.6	---
12	161.0	160.9	7.42 (H-12)
13	169.7	169.5	---
14	23.9	23.8	1.9 (CH_3)
15	62.4	62.3	3.7 (15- OCH_3)
16	52.0	51.9	3.84 (16- OCH_3)

Tabelle 1: Literatur NMR-Daten (CD_3OD Bruker WH 90); Eigene NMR-Daten (CD_3OD , 600 bzw. 150.8 MHz) von **5**

2.3. Kultivierung im Fermenter

Alle Versuche, eine Kultivierung im Fermenter durchzuführen, sind fehlgeschlagen. In den zur Verfügung stehenden Fermentern zeigte sich immer das gleiche Phänomen. Der Sauerstoffgehalt sank nach zwei bis drei Tagen auf 0% und stieg nicht mehr an. Der Stamm war stets abgestorben. Um dem Sauerstoffmangel entgegenzuwirken, wurde die Luftzufuhr stufenweise in verschiedenen Fermentationen bis zum Maximum erhöht, jedoch ohne Erfolg. Auch eine pH-Sperre und Veränderungen der Rührgeschwindigkeit führten zu keinem besseren Ergebnis.

2.4. Diskussion

Die Kultivierung des Stammes stellte sich von Beginn an als sehr schwierig heraus. Viele Ansätze mussten abgebrochen werden, da der Stamm abgestorben war. Bereits bei den Vorkulturen waren oft 50% und mehr nicht zum Animpfen der Hauptkulturen geeignet. Die Ursachen für dieses Verhalten konnten nicht eindeutig geklärt werden. Vermutlich spielten Scherkräfte, durch die das Mycel zerschlagen wurde, eine entscheidende Rolle. Dies konnte besonders gut in den Fermentern beobachtet werden. Mit dem Abfall des Sauerstoffgehalts in der Kulturlösung ging der Zerfall des Mycels einher, der bei den Fermentationen in verschiedenen Fermentern beobachtet werden konnte. Von weiteren Versuchen, eine Kultivierung im Fermenter durchzuführen, wurde daher abgesehen. Für alle Fütterungsexperimente in dieser Arbeit verwendeten Schüttelkulturen waren 250 mL-Kolben mit drei Schikanen, gefüllt mit je 100 mL M2-Nährlösung, 22 °C und 120 rpm die Basis. Es wurden immer 20 Schüttelkolben für die Vorkulturen angesetzt. So wurde gewährleistet, dass genügend Animpfmaterial zur Verfügung stand, auch wenn einige der Vorkulturen abstarben. Eine konstante Ausbeute an **5** konnte jedoch nicht erreicht werden. Ursache hierfür ist, dass **5** im Mycel gebildet und gespeichert wird. Je mehr Mycel zum Animpfen verwendet wurde, und je besser das Wachstum in den Hauptkulturen war, desto mehr an **5** konnte isoliert werden. Als vorteilhaft stellte sich heraus, das Mycel vor der Extraktion mit dem UltraTurrax zu zerkleinern. Die Ausbeute an **5** konnte so um ca. 30% gesteigert werden.

III. Biosynthese von Strobilurin A (5)

1. Allgemeines

In der Naturstoff-Forschung spielt neben der Suche nach neuen und interessanten Molekülen auch die Aufklärung der Biosynthese von Sekundärmetaboliten eine wichtige Rolle. Überwiegend sind Biosyntheseuntersuchungen erkenntnisorientiert. Mit den Informationen lassen sich anwendungsorientierte Experimente durchführen. Ein Beispiel hierfür ist die vorläufer-dirigierte Biosynthese^{68,69} (siehe Kapitel IV). Zur Aufklärung der Biosynthese eines Naturstoffes bedient man sich des Wissens über den Primärstoffwechsel, da die Sekundärmetaboliten aus Bausteinen des Primärstoffwechsels hervorgehen. Zu den Substanzklassen, aus denen Sekundärstoffe gebildet werden, gehören Carbonsäuren, Aminosäuren und Zucker.⁷⁰ Anhand einer bekannten Struktur lassen sich Vorhersagen über mögliche Bausteine sowie über die Biosynthese machen. Wurden die Experimente früher mit radioaktiv markierten Substanzen wie ^{14}C oder ^3H durchgeführt, verwendet man heute ^{13}C , ^2H , ^{18}O oder ^{15}N markierte Substanzen. Der Vorteil ist, dass ein Einbau über NMR-Experimente schneller ermittelt wird und nicht erst nach dem chemischen Abbau des Moleküls. Bei einem Einbau von ^{13}C kommt es zu einer Zunahme der Intensität des betreffenden Signals und ein Einbau von ^{18}O bewirkt einen Hochfeldshift des benachbarten C-Atoms. Ein weiterer Vorteil ergibt sich, wenn man doppelt markierte Verbindungen, wie z.B. $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Acetat}$, verwendet. Anhand der Multiplizität und der Kopplungskonstanten erhält man Aufschluss darüber, ob und welche C-Atome aus einer intakten Acetat Einheit stammen. Umlagerungen von C-Atomen, die aus einer Acetat-Einheit stammen, können z.B. über 3J -Kopplung aufgezeigt werden.

Ziel von Biosyntheseuntersuchungen ist es auch, mögliche Intermediate, die während der Biosynthese des Naturstoffes entstehen, zu isolieren. In vielen Fällen ist jedoch die Konzentration der Intermediate für einen Nachweis zu gering. Unter Verwendung von Enzyminhibitoren können gewisse Biosyntheseschritte unterbunden, und somit eine Anreicherung der Biosyntheseintermediate erreicht werden. Ein Beispiel hierfür sind Oxygenase Hemmer. Mit dem Nachweis von Intermediaten können mögliche Mechanismen, die zur Bildung des Naturstoffes führen, untermauert werden. Im Zusammenspiel mit der genetischen Untersuchung von Biosynthese-Wegen ist es möglich, die postulierten Mechanismen zu bestätigen.

Eine Möglichkeit den Biosynthesegencluster zu finden, ist die Verwendung von Gensonden. Die verwendeten Sonden werden in Analogie zu Sonden entwickelt, die für vergleichbare Biosyntheseschritte verantwortlich sind. Wird mit einer Sonde ein Gen, das an der

Biosynthese beteiligt ist, erkannt, kann man davon ausgehen, dass die weiteren an der Biosynthese beteiligten Gene in diesem DNA-Abschnitt liegen. Eine Sequenzierung des Biosynthesegens müsste sich anschließen. Der Vergleich mit bekannten Biosynthesegenen in Datenbanken führt bei einer Homologie zur Aufklärung des Biosyntheseschrittes, für dessen Enzymgruppe das Gen verantwortlich ist. Ist über einen Homologievergleich keine Zuordnung des Gens gelungen, wird mittels knock out Mutanten versucht, die Funktion des Gens zu entschlüsseln. Wesentlich aufwendiger gestaltet sich die genetische Untersuchung einer Biosynthese, wenn man nicht auf Gensonden zurückgreifen kann. In diesem Fall steht die zeitaufwendige Suche nach dem Biosynthesegencluster auf dem Genom an erster Stelle. Hierzu werden DNA-Fragmente isoliert und Cosmidbanken angelegt. Anschließend werden die Fragmente in einen Wirtstamm exprimiert und überprüft, ob der Stamm den Naturstoff produziert. Erst bei einem positiven Befund wird das entsprechende Cosmid sequenziert und die Funktion der Gene studiert.

Mittlerweile sehr gut untersuchte Naturstoffe sind die aus Acetyl-CoA und Aminosäuren aufgebauten Polyketide bzw. nichtribosomalen Peptide. Ist man zu Beginn davon ausgegangen, zwischen PKS (Polyketid-Synthese)⁷¹ und NRPS (Non-ribosomal-Polyketid-Synthese)⁷² zu unterscheiden, kann man eine strikte Trennung heute nicht mehr vornehmen. Rapamycin ist ein Beispiel für einen Naturstoff, der aus einem Hybrid-System gebildet wird. Die Information zum Aufbau solcher Naturstoffe befindet sich bei diesen Systemen auf einem 200 – 2000 kDa großen Enzymkomplex.⁷³ Ein solcher Komplex ist aus Modulen aufgebaut, die wiederum in Domänen unterteilt sind. Hier befinden sich die Informationen für die Kettenverlängerung sowie die nötigen Teilschritte.

Man unterscheidet bei Polyketid Biosynthese zwischen PKS I, II und III, deren Unterschiede in Abbildung 5 dargestellt sind.⁷⁴ Bisherige Untersuchungen in diesem Bereich beziehen sich hauptsächlich auf Bakterien, insbesondere auf Streptomyceten, wie den Erythromycin Produzenten.⁷⁵ Streptomyceten haben den Vorteil, dass die für die Biosynthese verantwortlichen Gene als Cluster vorliegen. Bei Pflanzen und Pilzen hingegen liegen die an der Biosynthese beteiligten Gene nicht in Clustern vor, sondern sind über das gesamte Genom verteilt. Dies erschwert das Auffinden der beteiligten Biosynthesegene. Erste Erfolge konnten im Arbeitskreis von R. J. Cox mit der Identifizierung des für die Methylierung verantwortlichen Gens erzielt werden.⁷⁶

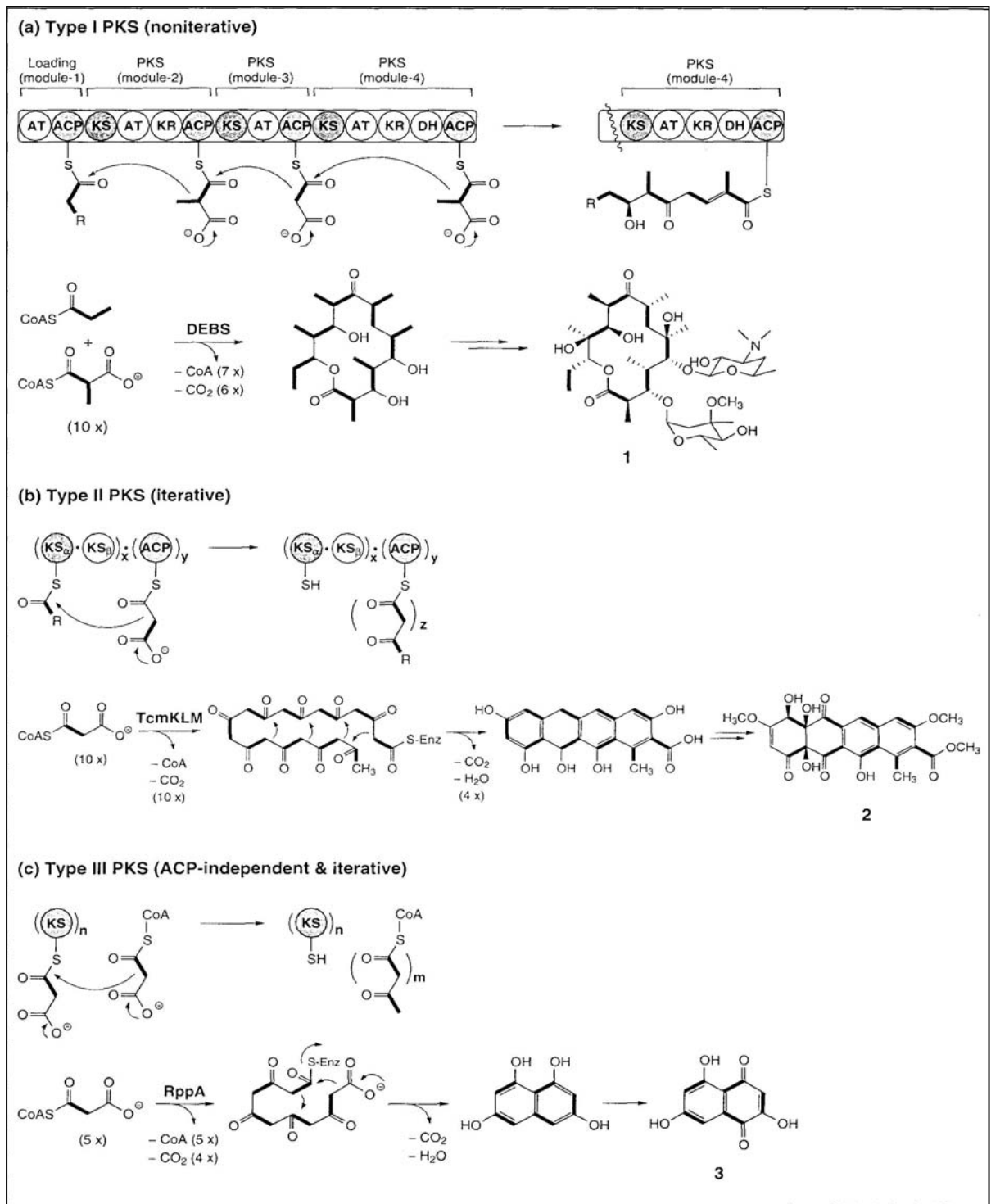


Abb. 5: Darstellung von PKS I, II und III⁷⁴

Die Beiträge zur Aufklärung der Biosynthese von Sekundärmetaboliten aus Pilzen beruhen auf Fütterungsexperimenten mit isoto­penmarkierten Vorläufern. Im folgendem steht die Biosynthese von **5** im Mittelpunkt.

2. Bisherige Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen

2.1. Untersuchungen in Prag

Erste Untersuchungen zur Biosynthese von **5** wurden unter „Biosynthesis of Mucidin...“ im Jahre 1982 von V. Musilek et. al. veröffentlicht.⁷⁷ Die Untersuchungen wurden am Stamm *Oudemansiella mucidia* aus der Gruppe der Basidiomyceten durchgeführt, aus dem die Arbeitsgruppe Ende der 60'er Jahre **5** isolierte. Die Fütterungen mit ¹⁴C-markierten Vorläufern erfolgten während des sechsten Tags der Fermentation, am siebten Tag wurde aufgearbeitet. Die Fütterungen ¹³C-markierter Vorläufern erfolgten vom sechsten bis zum neunten Tag der Fermentation im Abstand von 24 Stunden, am zehnten Tag wurde geerntet. Aus diesen Experimenten ergab sich das in Abbildung 6 dargestellte Einbaumuster mit den genannten Einbauraten.

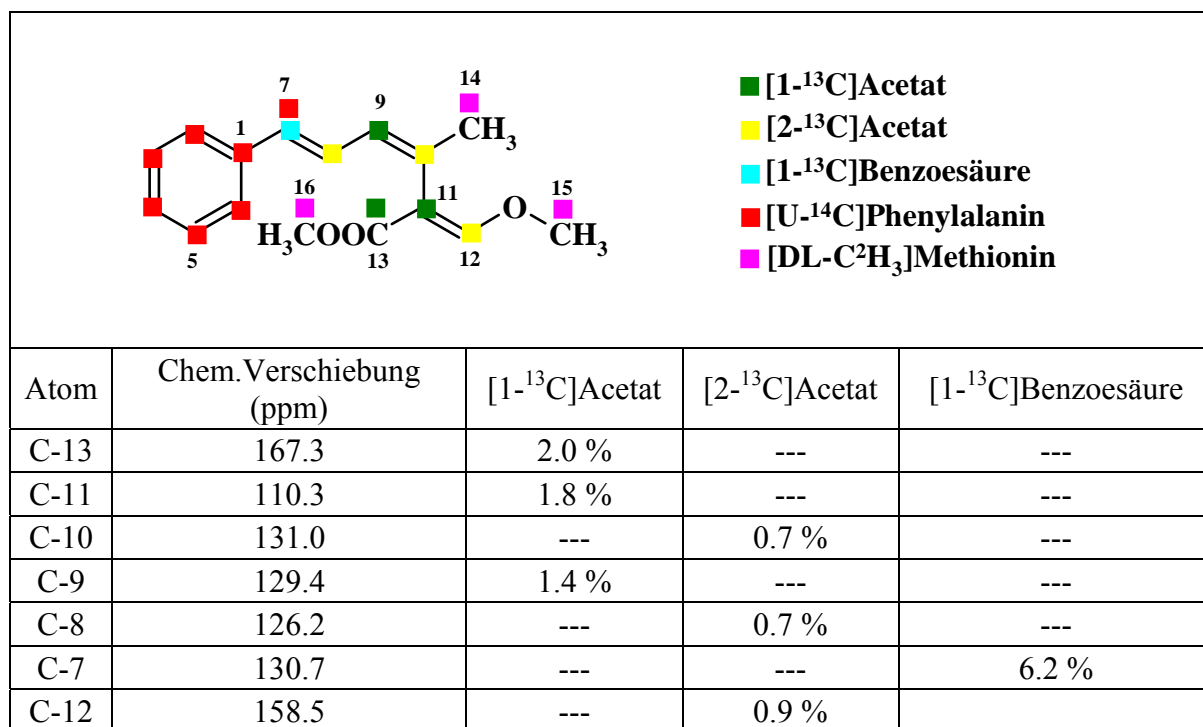


Abb. 6: Einbaumuster der Fütterungsexperimente in Prag und die spezifischen Einbauraten⁷⁷

Aufgrund des beobachteten Einbaus von Phenylalanin und Benzoessäure wird davon ausgegangen, dass der Aufbau des aromatischen Systems auf dem Shikimat-Weg erfolgt. Eine Erklärung für den Aufbau der Seitenkette gestaltete sich schwieriger. Aus dem Einbaumuster der [1-¹³C]Acetat Fütterungen ergab sich, dass zwei ¹³C markierte Kohlenstoffatome im Molekül nebeneinander liegen, für die keine Kopplung beobachtet werden konnte. Ein Erklärungsansatz ist, dass es sich bei C-13 um einen Vorläufer mit einem C-Atom handelt und die Seitenkette ansonsten durch die Kondensation von Acetateinheiten entsteht. Nicht nur

dieser Sachverhalt ist kritisch zu betrachten, sondern auch die angebenen Einbauraten aus den ^{13}C -Acetat Experimenten. Die sind zumeist schwach, was die Ursache für nicht beobachtbare Kopplungen zwischen C-13 und C-12 sein kann.

2.2. Untersuchungen in Bristol

„Biosynthetic Studies of Strobilurin“ ist der Titel der zweiten Arbeit, die sich mit der Biosynthese von **5** beschäftigt.⁷⁸ Zur Durchführung der Biosynthese-Experimente diente der Stamm *Bolinea lutea*, welcher zur Gruppe der Ascomyceten gehört. Grundlage für die ersten Versuche waren die Arbeiten aus Prag. Die ersten Experimente mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat wurden unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. So wurden einzelne Fütterungen an Tag 4, 5 und 6 mit jeweils 50 mg/L sowie eine weitere Fütterung jeweils Tag 3, 4, 5 und 6 der Fermentation mit insgesamt 50 mg/L $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat durchgeführt. Lediglich das Experiment über mehrere Tage führte zu einem schwachen Einbau. Weitere Experimente mit Benzoesäure und Zimtsäure, die jeweils in der ortho-, meta- oder para-Stellung mit Fluor markiert waren, wurden auch über den langen Fütterungszeitraum durchgeführt. Alle Experimente führten entweder zu wenig aussagekräftigen oder keinen Ergebnissen. Das gleiche Bild zeigte sich bei einem Experiment mit 4-Fluorphenylalanin. Bei dem Experiment mit 3-Fluorphenylalanin konnte jedoch ein Einbau von 19% ermittelt werden, für den in Abbildung 7 folgender Mechanismus formuliert wird.

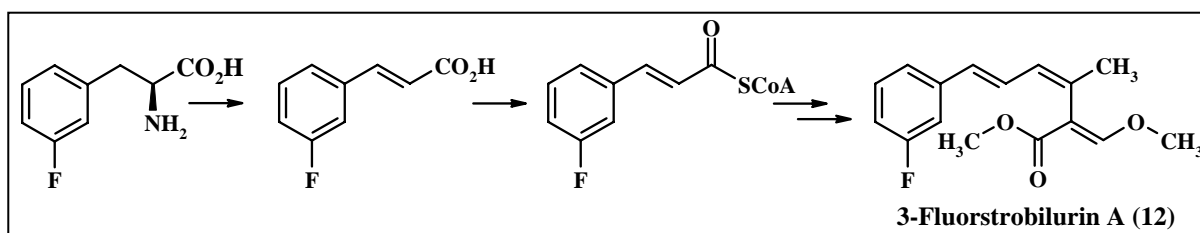


Abb. 7: Mechanismus zur Bildung von 3-Fluorstrobilurin A (**12**) ausgehend von 3-Fluorphenylalanin⁷⁸

Die Ergebnisse ließen vermuten, dass die Vorläufer nicht membrangängig sind und dem Organismus für die Biosynthese somit nicht zur Verfügung stehen. Man entschloss sich daher, die Vorläufer in Form von SNAC-Thioestern einzusetzen. Erwartet wurde mit N-Acetylcysteamin eine Steigerung der Akzeptanz des Vorläufers zu erreichen.

Einige Ergebnisse der verschiedenen Experimente unter diesem Gesichtspunkt sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Vorläufer	Strobilurin A Einbau [%]	Strobilurin B Einbau [%]
[1,2- ¹³ C ₂]Acetat	---	---
[7- ¹³ C]Benzoessäure Thioester	28	10
2-Fluorbenzoessäure Thioester	44	---
3-Fluorbenzoessäure Thioester	45	---
4-Fluorbenzoessäure Thioester	30	---
2-Fluorzimtsäure Thioester	62	---
3-Fluorzimtsäure Thioester	67	---
4-Fluorzimtsäure Thioester	78	---
3-Fluor-4-methoxybenzoessäure Thioester	---	54
3-Fluor-4-methylbenzoessäure Thioester	---	22

Tabelle 2: Einbauraten aus den verschiedenen Fütterungsexperimenten in Bristol ⁷⁸

Auffällig ist, dass erneut kein Einbau von [1,2-¹³C₂]Acetat in der Seitenkette beobachtet wurde. Alle anderen Experimente verliefen positiv. Die hohen Einbauraten der verschiedenen Fluorzimtsäure Vorläufer bei Strobilurin A mit weit über 50 % lassen darauf schließen, dass Zimtsäure ein Intermediat während der Biosynthese ist. Auch könnte Zimtsäure die Startereinheit sein. Erstaunlich sind auch die hohen Einbauraten bei den analogen Versuchen mit fluormarkierter Benzoessäure als Thioester, die zwischen 30 und 45 Prozent liegen. Benzoessäure kann somit auch als Startereinheit in Betracht gezogen werden. Die Frage nach der Startereinheit sowie nach dem Aufbau der Seitenkette wird in dieser Arbeit jedoch nicht eindeutig geklärt. Eine Veröffentlichung der Ergebnisse wurde nicht vorgenommen, da es nicht gelungen war, die fluormarkierten Strobilurine von den nicht markierten zu trennen. Die oben genannten Einbauraten wurden daher aus den Massenspektren der Gemische beider Verbindungen ermittelt.

Dennoch wurde anhand der vorliegenden Versuchsergebnisse, sowie unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Prag, ein möglicher Biosyntheseweg aufgezeichnet, der in Abbildung 5 dargestellt ist.

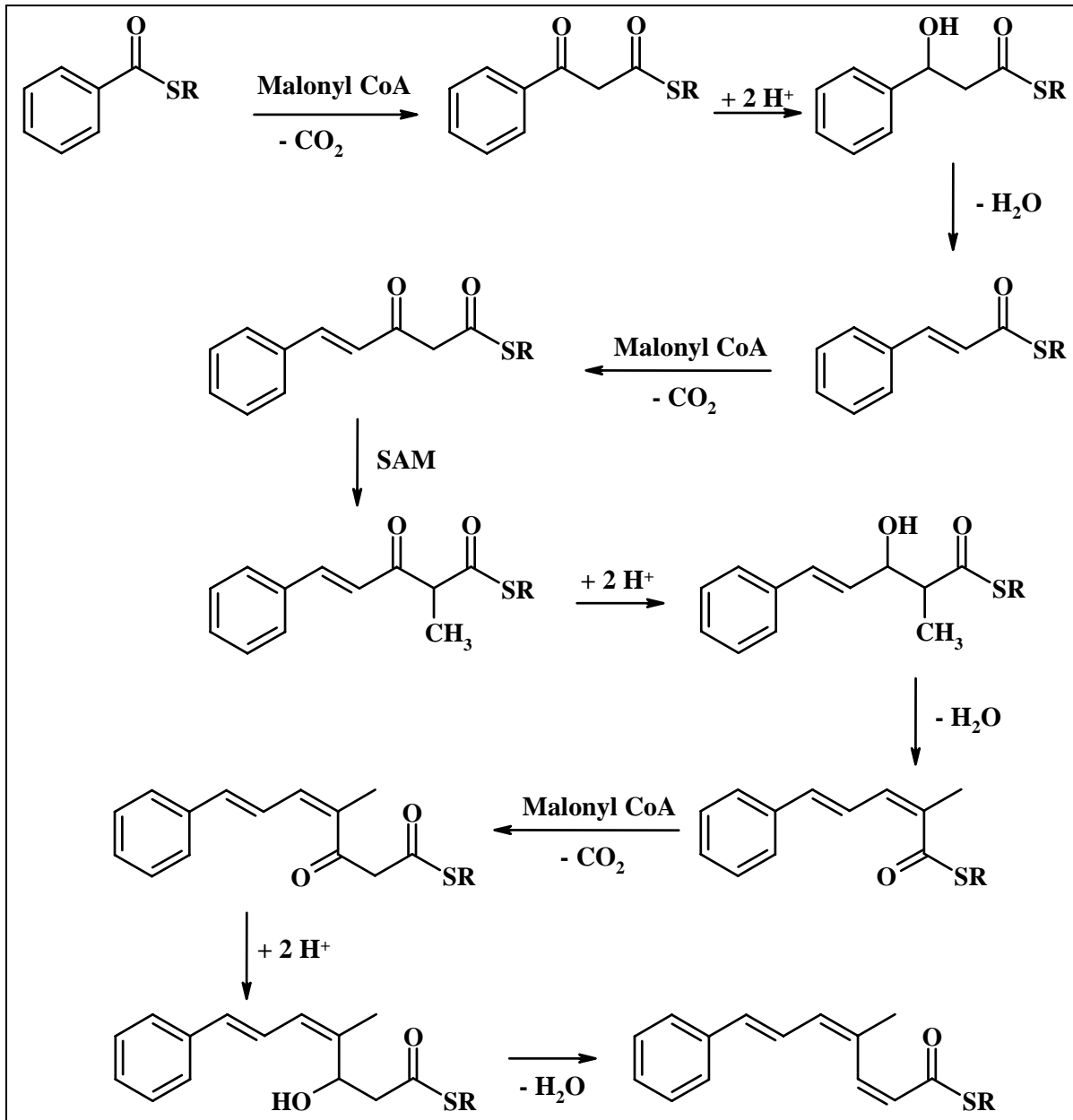


Abb. 8: Hypothetischer Biosyntheseweg für den Aufbau der Seitenkette von 5⁷⁸

Aufgrund des in Prag beobachteten Acetat-Einbaus wird angenommen, dass der Seitenkette drei Einheiten zugrunde liegen. Die Methylgruppen sollten daher zu verschiedenen Zeiten aus SAM (S-Adenosyl-Methionin) kommen. Als Startereinheit fungiert in Abbildung 8 Benzoesäure jedoch kommt auch Zimtsäure, wie in Abbildung 7 gezeigt in Betracht.

Im Falle der Zimtsäure würde dann die Seitenkette im weiteren Verlauf nur um zwei Acetat-Einheiten verlängert werden. Im Zuge einer Umlagerung entsteht **5** (Abbildung 9).

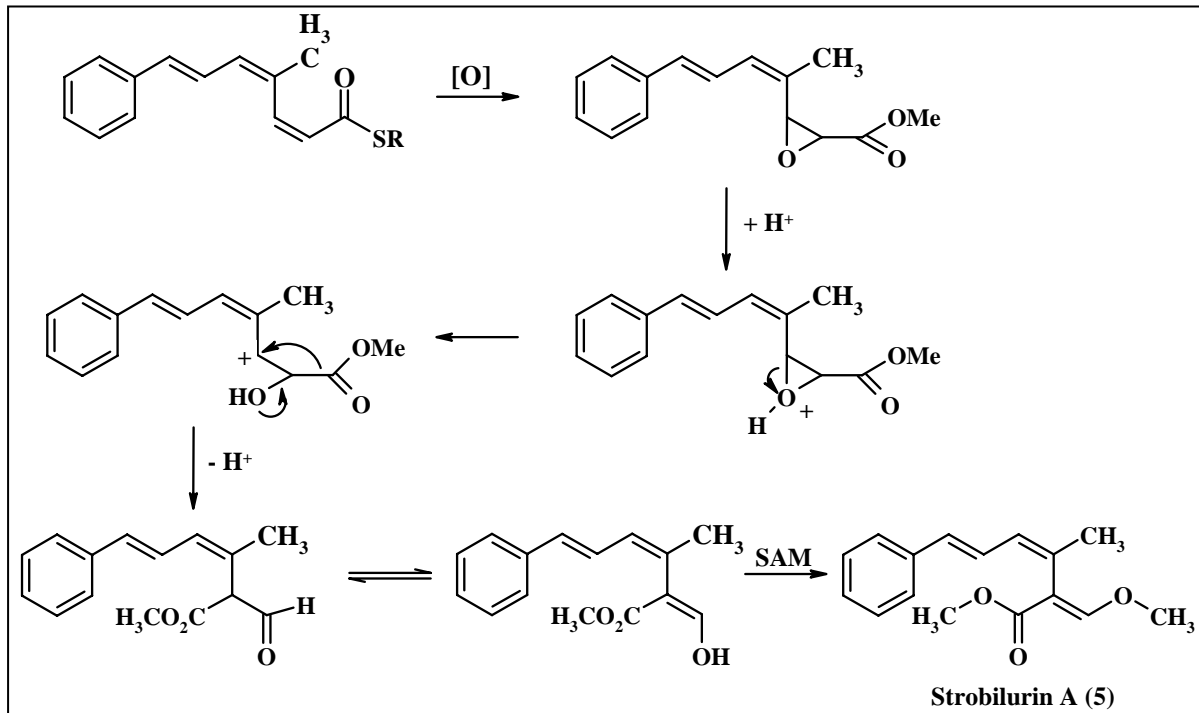


Abb. 9: Hypothetische Umlagerung die zur Bildung von **5** führt⁷⁸

Im ersten Schritt der Umlagerung wird eine Epoxid Bildung postuliert. Anschließend erfolgt eine säurekatalysierte Ringöffnung des Epoxid, dem sich eine Pinacol ähnliche Umlagerung anschließt. Eine Keto/Enol-Tautomerie führt zum Vinylalkohol, der durch Methylierung das Strobilurin A (**5**) ergibt.

Ein möglicher Biosyntheseweg für Strobilurin B (**13**) wurde ebenfalls aufgezeigt.⁷⁸ Der Weg beruht auf der Annahme, dass **13** aus **5** hervorgeht. Die vermuteten Intermediate Strobilurin F₁ (**14**) und Strobilurin H (**15**) sind beide aus dem Stamm isoliert worden.

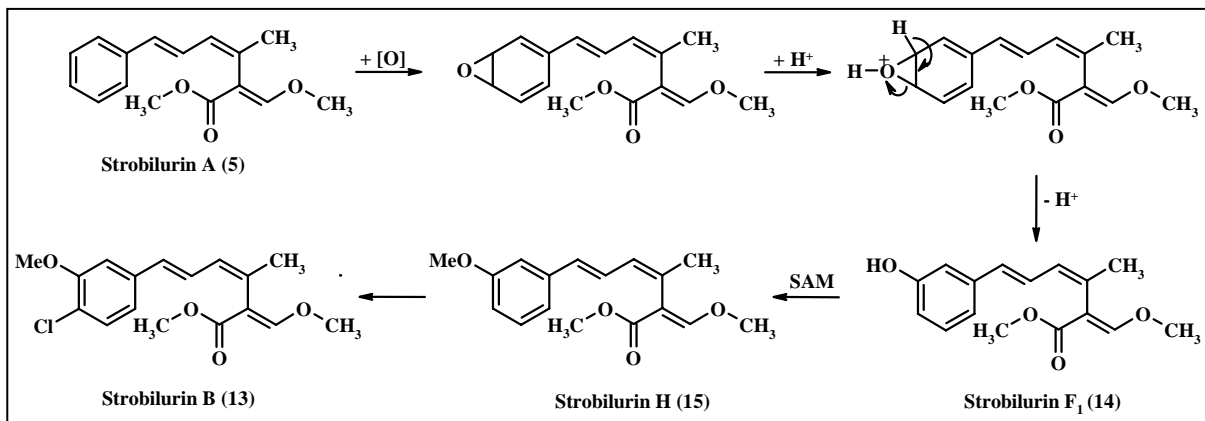


Abb. 10: Hypothetische Bildung von **13** ausgehend von **5**⁷⁸

3. Beiträge zur Biosynthese von Strobilurin A (5)

Im vorherigen Kapitel wurden die beiden Arbeiten, die sich mit der Biosynthese von Strobilurin A beschäftigt haben, vorgestellt. Der vorgeschlagene Biosyntheseweg steht jedoch im Widerspruch zu den Experimenten, weil kein Acetateinbau zu beobachten war. Außerdem kann aufgrund der Einbauraten aus den Fütterungsexperimenten mit Fluorbenzoesäure (45 %) und Fluorzimtsäure (67 %) nicht zwingend folgen, dass Benzoesäure die Startereinheit ist, es spricht sogar mehr für Zimtsäure. In diesem Fall würde die Seitenkette nur um zwei Acetat Einheiten verlängert und nicht um drei, wie dargestellt (s. Abb. 8). Ferner konnte auch für die Umlagerung kein experimenteller Beweis erbracht werden, stattdessen könnte es sich auch um eine C-1-Einheit unbekannter Herkunft, wie von V. Musilek et. al. vermutet, handeln.⁷² Zur Klärung der Biosynthese von **5** wurden daher erneut Fütterungsexperimente mit ¹³C-markiertem Acetat und deuteriertem Phenylalanin durchgeführt, zusätzlich jedoch auch mit ¹³C-markiertem Phenylalanin und Methionin sowie [¹³C, ¹⁸O]-markierten Acetat.

3.1. Bestimmung des Produktionsverlaufs

Für die Bestimmung des optimalen Fütterungszeitpunktes wurde für *Strobilurus tenacellus* eine Fermentationskurve aufgenommen. Hierzu wurde eine Fermentation in 20 Schüttelkolben mit 100 ml M2 Nährmedium durchgeführt. Im Intervall von 24 Stunden wurden jeweils zwei Kolben geerntet und die erhaltenen Rohprodukte an der HPLC vermessen. Aus einer ebenfalls an der HPLC aufgenommenen Kalibrierungskurve ergab sich die Ausbeute an Strobilurin A (**5**). Der Verlauf der Produktion von **5** ist in Abbildung 11 dargestellt.

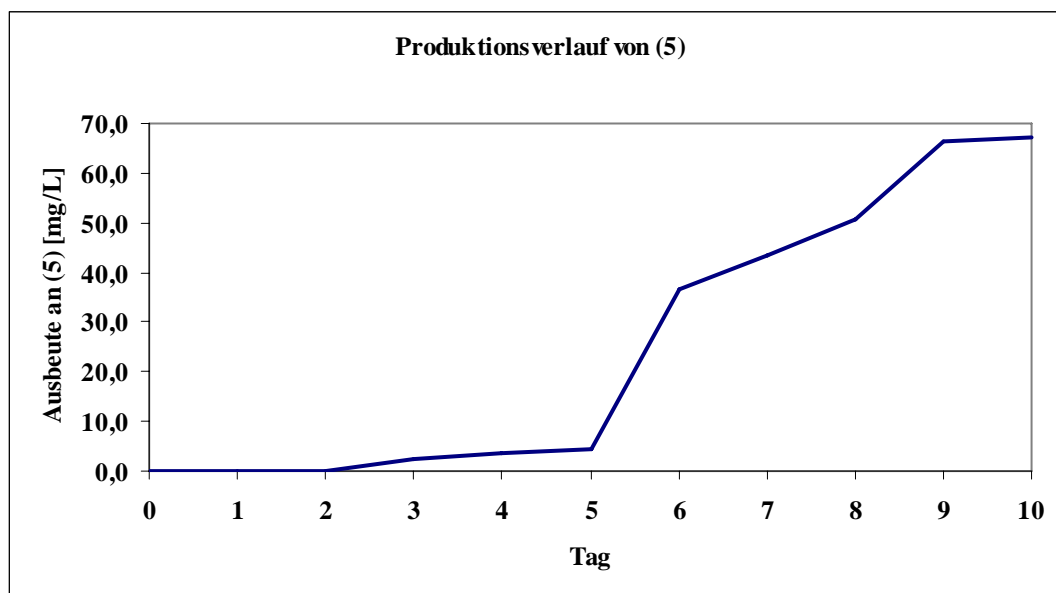


Abb. 11: Verlauf der Produktion von **5** bei *Strobilurus tenacellus* (HPLC-Analyse)

Demnach setzt die Produktion von **5** zwischen dem zweiten und dritten Tag der Fermentation ein. Auffällig sind die beiden starken Anstiege der Produktion vom fünften auf den sechsten und vom achten auf den neunten Tag der Fermentation.

Vor der Fütterung markierter Vorläufer wurde die Verträglichkeit dieser in kleinen Ansätzen mit unmarkierten Substanzen überprüft. In allen Fällen gab es keine signifikante Änderung in der Ausbeute von **5**.

3.2. Experimente zum Aufbau der Seitenkette

Fütterungen von [1-¹³C]Acetat

In den bisher durchgeführten Biosynthese-Experimenten wurden die markierten Substanzen immer über mehrere Tage gefüttert. Hierdurch ist jedoch die Möglichkeit eines Scramblings gegeben. Die ersten Experimente mit Acetat erfolgten daher über kürzere Zeiträume und zu zwei unterschiedlichen Zeiten, um ein eventuelles Scrambling zu vermeiden. So wurden Fütterungen jeweils in einem Intervall von sechs Stunden vom zweiten auf den dritten Tag (Produktionsbeginn von **5**), im weiteren Verlauf als „früher Zeitpunkt“ bezeichnet, sowie vom fünften auf den sechsten Tag (erster Zeitraum mit einem Produktionsmaximum von **5**), im weiteren Verlauf der Arbeit als „später Zeitpunkt“ bezeichnet, der Fermentation durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgte jeweils 24 Stunden nach Fütterungsende.

Aus diesen Experimenten mit [1-¹³C]Acetat konnte für **5** eine Anreicherung an den Kohlenstoffatomen 9, 11 und 13 ermittelt werden (s. Tabelle 3). Die berechneten Einbauraten

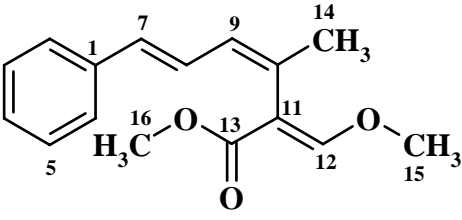
 <p style="text-align: center;">Strobilurin A (5)</p>			
Fütterungsmodus	Ausbeute in (mg/L)	Kohlenstoffatom	Einbaurate in (%)
2-3 Tag (früh)	11.8	C-9	23.53
		C-11	45.07
		C-13	31.05
5-6 Tag (spät)	16.3	C-9	3.59
		C-11	1.51
		C-13	1.26

Tabelle 3: Einbauraten aus den [1-¹³C]Acetat Experimenten (Fütterungen zum frühen und späten Zeitpunkt)

sind in den Experimenten sehr unterschiedlich. So konnte aus der Fütterung vom zweiten auf den dritten Tag eine Anreicherung zwischen 23 % und 45 % ermittelt werden. Aus dem Experiment zum späteren Zeitpunkt ergab sich eine Anreicherung von 1.26 % und 3.59 %.

Unter Berücksichtigung der aufgespalteten Signale ergeben sich Einbauraten von 45.07 % für C-11 und von 31.05 % für C-13 zum frühen Zeitpunkt sowie von 1.51 % und 1.26 % zum späten Zeitpunkt. Die aus beiden Experimenten berechneten Einbauraten für diese Kohlenstoffatome sind jedoch nicht sehr aussagekräftig, da diese Kerne miteinander koppeln. Die Berechnung erfolgte jedoch nach der Formel für nicht miteinander koppelnde Kerne. Aus beiden ^{13}C -NMR-Spektren konnte eine C-C Kopplungskonstante von $^1J_{11,13} = 78 \text{ Hz}$ bestimmt werden. In Abbildung 12 ist die statistische Kopplung gezeigt.

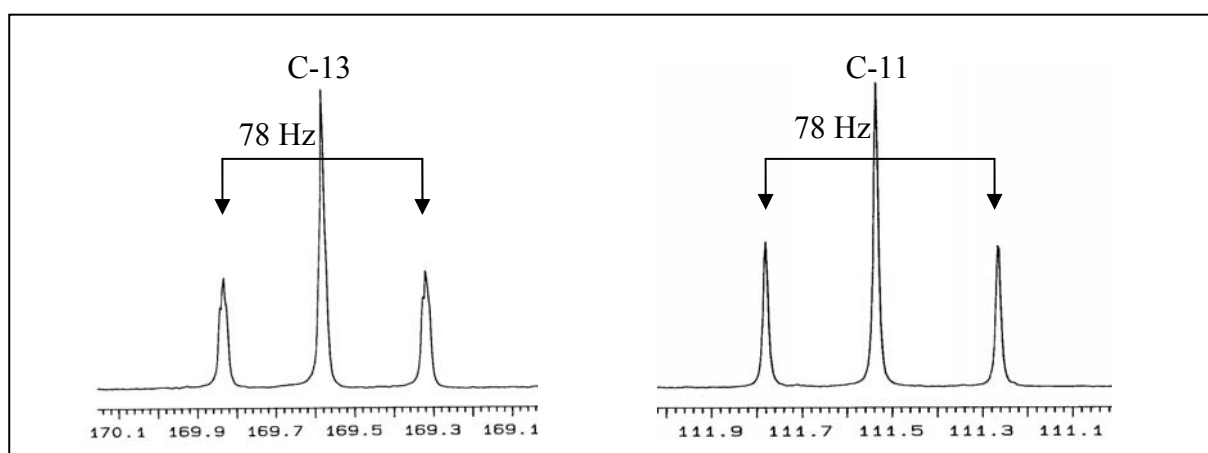


Abb. 12: Statistische Kopplung zwischen C-11 und C-13

Bei der Fütterung von $[1-^{13}\text{C}]$ Acetat zum späten Zeitpunkt konnten nur relativ geringe Einbauraten beobachtet werden. Dies passt zu den Ergebnissen aus Prag und Bristol, bei denen ebenfalls nur ein geringer bzw. gar kein Einbau von Acetat in **5** beobachtet werden konnte.

Fütterung von $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat

Auf Grund der höheren Einbauraten von $[1-^{13}\text{C}]$ Acetat für die Fütterung zum frühen Zeitpunkt wurde uniform markiertes Acetat über denselben Zeitraum gefüttert. Dieses Experiment führte zu einem Einbau an den Kohlenstoffatomen C-8 bis C-12. Alle angereicherten Signale spalteten im ^{13}C -NMR-Spektrum zum Dublett auf. Die dazugehörigen 1J -Kopplungskonstanten sind in Tabelle 4 aufgeführt. Zu den erwarteten $^1J_{\text{C-C}}$ -Aufspaltungen

zum Dublett konnte für die Kohlenstoffatome 12 und 13 eine Aufspaltung zum Dublett vom Dublett, mit einer Fernkopplung (${}^2J = 6$ Hz), ermittelt werden, die in Abbildung 12 gezeigt wird. Eine 2J Kopplung konnte nur zwischen den Kohlenstoffatomen 12 und 13 beobachtet werden, die auf eine vormals intakte Acetat Einheit deutet, und somit auf eine Umlagerung

C-Atom	${}^{13}\text{C}$ -NMR δ_{C} (ppm)	${}^1J_{\text{C,C}}$ Kopplungen [Hz]
8	127.83	$J_{8,9} = 58$
9	130.9	$J_{9,8} = 58, J_{9,10} = 74$
10	139.19	$J_{10,9} = 74, J_{10,11} = 56$
11	111.6	$J_{11,10} = 56, J_{11,12} = 82, J_{11,13} = 78$
12	160.9	$J_{12,11} = 82$
13	169.5	$J_{13,11} = 78$

Tabelle 4: ${}^1J_{\text{C,C}}$ Kopplungen im ${}^{13}\text{C}$ -NMR-Experiment von **5** nach Fütterung von $[1,2-{}^{13}\text{C}_2]\text{Acetat}$

Aufgrund einer Umlagerung lassen sich auch die statistischen Kopplungen zwischen C11 und C-13 aus dem ${}^{13}\text{C}$ Experiment erklären. Somit gibt es in **5** nur zwei intakte Acetateinheiten und eine, die aufgespalten wurde.

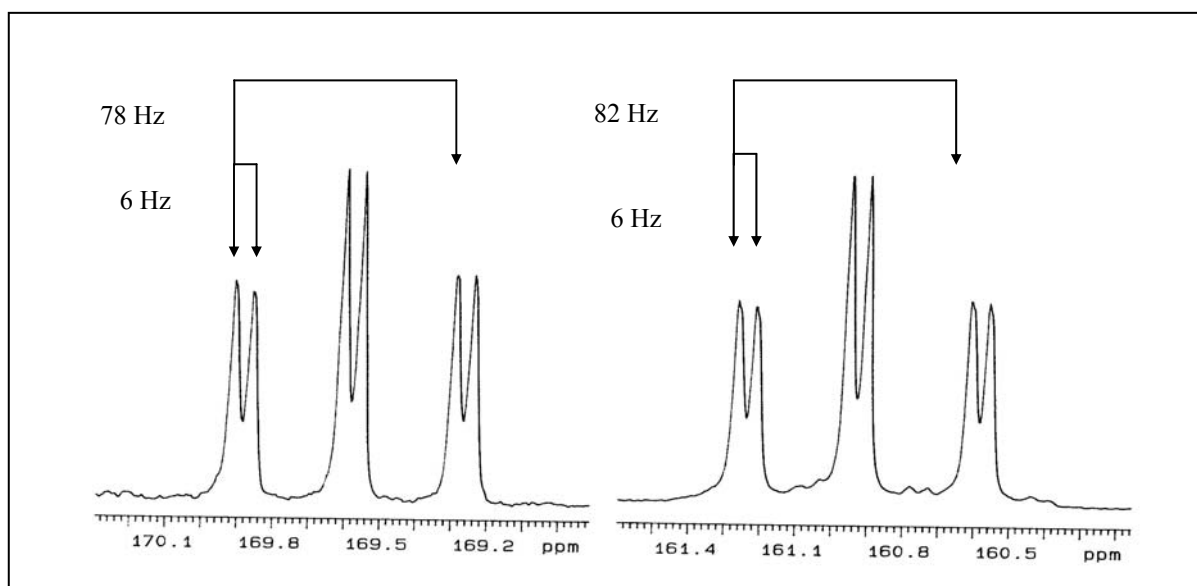


Abb.12: ${}^{13}\text{C}$ -NMR-Signale von C-12 und C-13 mit 1J - und 2J -Kopplungen

Fütterung von $[1-{}^{13}\text{C}^{18}\text{O}_2]\text{Acetat}$

Hilfreich für Aussagen über den Mechanismus einer Biosynthese ist die Klärung der Herkunft von Sauerstoffatomen. Vorläufer, die ${}^{18}\text{O}$ markiert sind, können bei einem Einbau im ${}^{13}\text{C}$ -Spektrum identifiziert werden. Verbleibt ein ${}^{18}\text{O}$ -Isotop im Metaboliten, so kommt es zu einem Isotopenshift am sauerstoffbindenden Kohlenstoffatom. Der Isotopeneffekt ist

abhängig von der Art der funktionellen Gruppe und liegt zwischen 0.016 bis 0.050 ppm.^{79,80} Für Carbonyle ist ein Wert von 0.034 – 0.050 ppm und bei sekundären Alkoholen von 0.016 – 0.023 ppm zu erwarten. Ein Einfluss des Lösungsmittels auf den Isotopenshift ist nur bei den sekundären Alkoholen zu beobachten. Ein additiver Effekt ergibt sich bei einem Einbau von mehreren ¹⁸O-Isotopen an ein Kohlenstoffatom.

Für den Versuch wurde [1-¹³C¹⁸O₂]Acetat nach der AAV II durch den Austausch von ¹⁶O gegen ¹⁸O dargestellt. Die Zugabe erfolgte vom zweiten auf den dritten Tag der Fermentation. Nach Aufarbeitung konnte für das Kohlenstoffatom 13 ein Isotopenshift von 0.038 ppm ermittelt werden. Dieser bestätigt die Herkunft des Carbonyl-Sauerstoffs aus Acetat. Isotopenshifts an anderen Kohlenstoffatomen konnten nicht beobachtet werden. Die beiden Sauerstoffatome der Methoxygruppen haben offenbar einen anderen Ursprung. Insbesondere 12-O stammt vermutlich aus der Luft und wird während der Biosynthese über eine Oxygenase eingeführt. Einen Beweis hierfür könnte eine Fermentation in einer ¹⁸O₂-Atmosphäre liefern. Aufgrund der wechselhaften Ausbeuten wurde auf diesen Versuch jedoch verzichtet.

Fütterung von [Methyl-¹³C]Methionin

In **5** sind drei Methylgruppen enthalten. Zwei davon als Methoxygruppen, die nach den Ergebnissen von V. Musilek et. al.⁷⁷ aus Methionin stammen. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurde ein Experiment mit [¹³C-Methyl]Methionin durchgeführt. Die Fermentation lief über vier Tage und die Zugabe von Methionin erfolgte in Intervallen von sechs Stunden von der 48. – 72. Stunde. Der erwartete Einbau konnte an den Kohlenstoffatomen C-14, C-15, C-16 festgestellt werden. Die spezifischen Einbauraten für diese Kohlenstoffatome sind in Tabelle 5 aufgelistet.

C-Atom	¹³ C-NMR δ _C (ppm)	[¹³ C-Methyl]Methionin
14	23.8	17.75
15	62.3	42.66
16	51.9	42.98

Tabelle 5: Einbauraten aus dem Experiment mit [¹³C-Methyl]Methionin

3.3. Experimente zur Klärung der Startereinheit

Aus den vorangegangenen Arbeiten folgt, dass es sich bei der Startereinheit von **5** um Benzoesäure oder Zimtsäure handelt. Dabei scheint Phenylalanin eine wesentliche Rolle für die Bereitstellung der Startereinheit zu spielen. Zur Klärung wurden daher Versuche mit $[3-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin, $[\text{D}_8]$ Phenylalanin und $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Phenylalanin durchgeführt. Die Zugabe der verschiedenen Vorläufer erfolgte jeweils vom zweiten auf den dritten Tag der Fermentation in Abständen von sechs Stunden.

$[3-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin

Dieses Experiment würde bei einem Einbau beweisen, dass die Startereinheit aus Phenylalanin hervorgeht, und somit die Vermutungen aus Bristol bestätigen (s. Kapitel III 2.2). Zugleich könnte die Annahme aus Prag, dass die Startereinheit vor der Bildung von Phenylalanin über den Shikimat-Weg abzweigt, widerlegt werden. Aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum konnte ein Einbau von 13.13% für C-7 ermittelt werden. Somit steht fest, dass die Startereinheit aus Phenylalanin hervorgeht, d.h. die Vermutungen aus Bristol konnten bestätigt werden. Die Frage, ob es sich um Benzoesäure oder Zimtsäure als Startereinheit handelt, die beide aus Phenylalanin hervorgehen können, ließ sich mit diesem Experiment nicht klären.

$[\text{D}_8]$ Phenylalanin

Aus der Fütterung von $[\text{D}_8]$ Phenylalanin konnte nach der Aufarbeitung 12 mg **5** erhalten werden. Im EI-Massenspektrum wurde neben dem Massenpeak von $m/z = 258$ ein weiterer Massenpeak mit $m/z = 263$ gefunden. Der Unterschied von fünf Masseneinheiten lässt auf den Einbau von fünf Deuteriumatomen schließen. Der Einbau konnte aus dem Massenspektrum mit 20 % bestimmt werden. Im Protonenspektrum konnte ferner eine Abschwächung der Intensität der aromatischen Protonensignale beobachtet werden. Somit handelt es sich bei dem im EI-Massenspektrum beobachteten Einbau um die fünf Deuteriumatome am Aromaten des Phenylalanins. Aus der Verringerung der Intensitäten im ^1H -NMR-Spektrum lässt sich die Einbaurate errechnen. Zur Berechnung des Einbaus werden die Signalintensitäten der betroffenen Protonen im unmarkierten und markierten Protonenspektrum betrachtet (siehe Abbildung 13). Die Intensitäten im ^1H -NMR-Spektrum der unmarkierten Substanz wird auf 100 % festgelegt und mit den Intensitäten des markierten Spektrums ins Verhältnis gesetzt. Auf diese Weise ließ sich eine Einbaurate von 19.5 % berechnen. Dieser Wert ist mit der aus dem EI-Massenspektrum ermittelten Einbaurate praktisch identisch. Da der Einbau

sowohl aus dem ^1H -NMR-Spektren als auch aus dem Massenspektrum bestimmt werden konnte, wurde auf die Aufnahme eines Deuterium-Spektrums verzichtet.

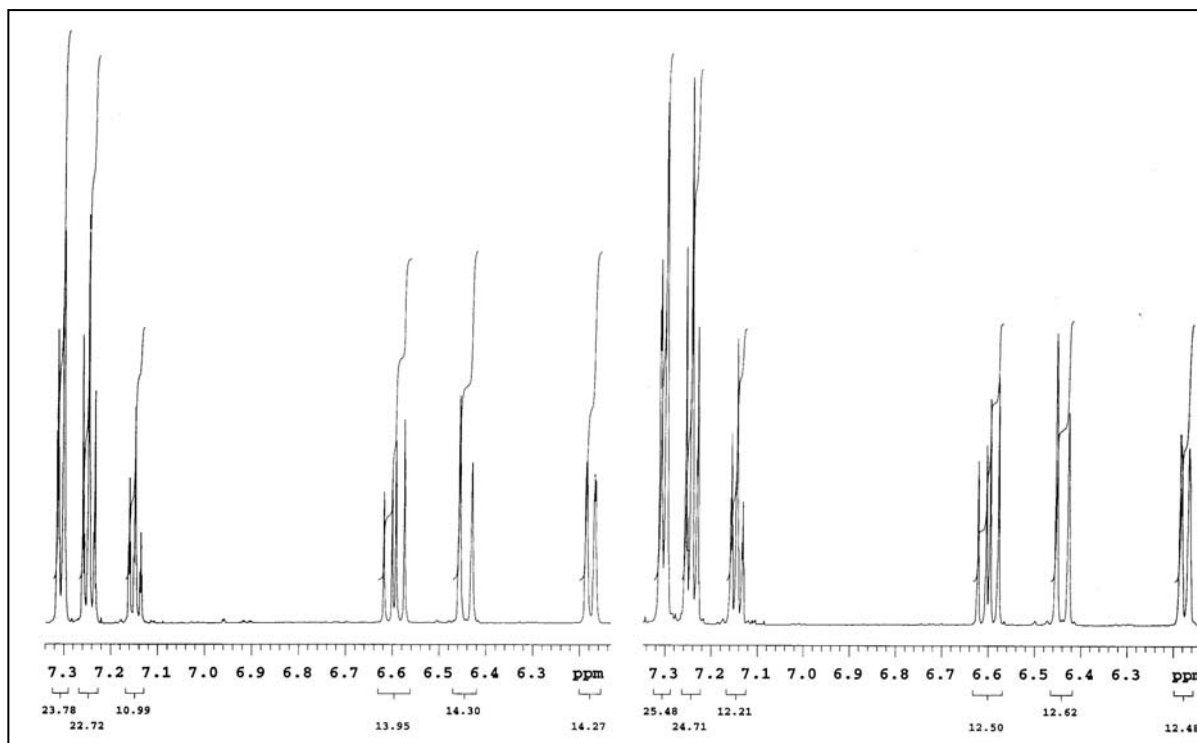


Abb. 13: Ausschnitte der ^1H -Spektren von **5** (links: aus der Fütterung von $[\text{D}_8]$ Phenylalanin und rechts: normal; Die Intensitäten sind in Prozent unter den jeweiligen Signalen aufgeführt.)

Zudem kommt es bei der Aufnahme von Deuteriumspektren zu einer Signalverbreiterung, wodurch die Signale im aromatischen Bereich nicht mehr zu unterscheiden sind. Die schlechte Auflösung in Deuterium-Spektren wird durch die kleine magnetogyrische Konstante und der schnellen Relaxation des Deuteriums Kerns hervorgerufen. Eine exakte Auswertung des Deuterium-detektierten Spektrums ist daher nicht gewährleistet.

Dass sich am C-7 kein Deuteriumatom findet, lässt vermuten, dass es sich bei der Startereinheit um Benzoesäure handelt, da sich bei Zimtsäure als Startereinheit ein Deuteriumatom an C-7 befinden sollte. Eine genaue Aussage ist jedoch nicht möglich, da während des Abbaus von Phenylalanin bis zur Zimtsäure theoretisch alle Deuteriumatome mit abgebaut oder gegen Protonen ausgetauscht werden können.

[2,3-¹³C₂]Phenylalanin

Die Frage, ob es sich bei der Startereinheit nun um Benzoesäure oder Zimtsäure handelt, sollte sich mit einer Fütterung von [2,3-¹³C₂]Phenylalanin klären lassen. Geht man von einem Abbau des Phenylalanins bis zur Zimtsäure aus, so bleiben die beiden markierten Kohlenstoffatome im Stoffwechsel und man erhält im ¹³C-NMR-Spektrum eine Kopplung zwischen den Kohlenstoffatomen C-7 und C-8. Erfolgt hingegen erst ein Abbau bis zur Benzoesäure, so würde das Kohlenstoffatom C-2 verloren gehen, und man erhält bei C-7 ein Singulett, wie bei der Fütterung mit [3-¹³C]Phenylalanin. Im ¹³C-NMR-Spektrum des Fütterungsproduktes konnte keine Aufspaltung zum Dublett beobachtet werden. Die Intensität von C-7 ist jedoch erhöht; es errechnet sich eine spezifische Anreicherung von 13.75 %. Somit steht fest, dass es sich bei der aus Phenylalanin gebildeten Startereinheit um Benzoesäure und nicht um Zimtsäure handelt.

Die Ergebnisse der Experimente mit ¹³C-markiertem Phenylalanin sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

C-Atom	¹³ C-NMR δ _C (ppm)	Spez. Anreicherung in % [3- ¹³ C]Phenylalanin	Spez. Anreicherung in % [2,3- ¹³ C ₂]Phenylalanin
7	131.89	13.13	13.75

Tabelle 6: Einbauraten aus den Experimenten mit ¹³C-markiertem Phenylalanin

3.4. Postulierter Biosyntheseweg von Strobilurin A (5)

Die Ergebnisse der verschiedenen Fütterungsexperimente zur Biosynthese von **5** führen zu dem in Abbildung 13 dargestellten Einbaumuster.

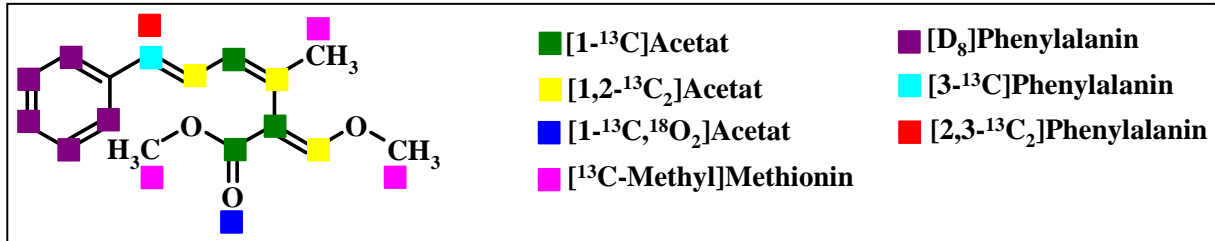


Abb. 13: Einbaumuster für **5** aus den Fütterungsexperimenten

Entscheidend für die Bildung der Startereinheit ist somit Phenylalanin, welches über den Shikimat/Chorismat Weg aufgebaut wird.⁸¹ Der Abbau zur Benzoesäure kann auf den in Abbildung 14 gezeigten Wegen erfolgen.

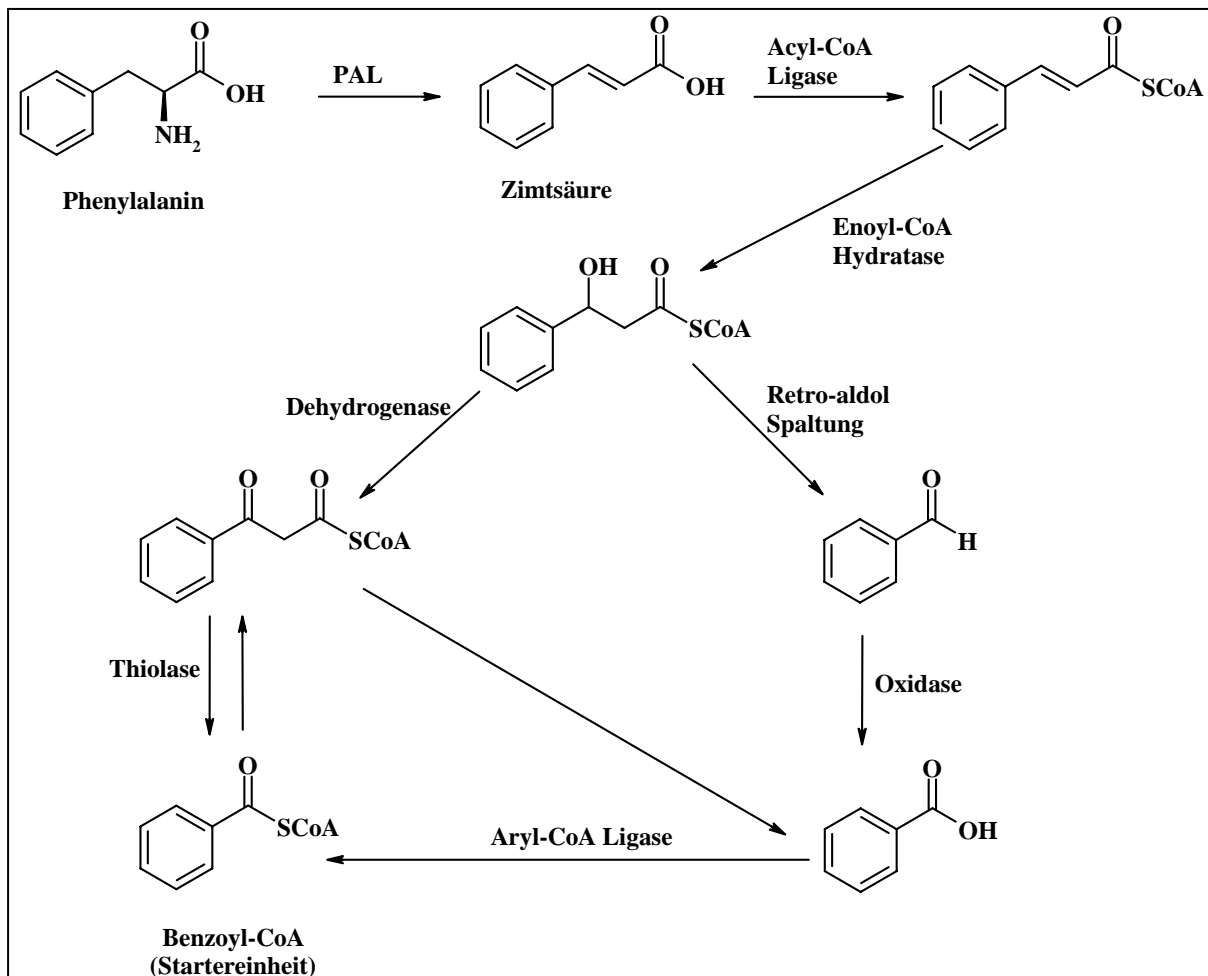


Abb. 14: Bildung der Startereinheit für **5** aus Phenylalanin⁸²

Für die Biosynthese von **5** ist die Bildung von Phenylalanin und dessen Abbau bis zur Benzoesäure nach den aufgezeigten Biosynthesewegen anzunehmen. Ein derartiger Abbau wurde sowohl für Pflanzen als auch für Pilze und Bakterien bereits beschrieben.⁸² Eine Aussage, ob der Abbau von Phenylalanin über die verschiedenen Zimtsäure Zwischenstufen läuft oder aber über Benzaldehyd, kann an dieser Stelle nicht gemacht werden. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die Untersuchungen im Arbeitskreis von T. J. Simpson (Bristol) mit dem Stamm *Bolinea lutea* durchgeführt wurden, der zur Gruppe der Ascomyceten gehört. Unsere Experimente dagegen erfolgten mit einem Basidiomyceten, also einem Stamm aus einer anderen Gattung. Es ist nicht auszuschließen, dass sich die Biosynthesewege bezüglich der Startereinheit unterscheiden (s. Kapitel III 2.2).

Bisher gelten aromatische Systeme als ungewöhnliche Startereinheiten und sind eher selten anzutreffen. Ein weiteres Beispiel für ein Polyketid, bei dem ein Aromat als Startereinheit dient, ist Aureothin. Diese Substanz wird aus dem Stamm *Streptomyces thioluteus* isoliert und wirkt antifungal, insektisid sowie gegen Tumore. Als Startereinheit fungiert hier para Amino-Benzoesäure. Insgesamt erfolgt die Biosynthese von **5** über die bei Eukaryonten übliche iterative PKS I, wie von T.J. Simpson et. al. postuliert. Nachdem die Startereinheit auf die Loading Domäne übertragen wurde, wird die Kette zunächst um zwei Acetat-Einheiten verlängert. Nach der Methylierung durch SAM und anschließender Wasserabspaltung kommt es zur Ausbildung der Z-Konfiguration an der Doppelbindung zwischen C-9 und C-10. Die Kette wird anschließend um eine weitere Acetat-Einheit verlängert bevor es zu der Umlagerung kommt, durch welche die typische Acrylateinheit ausgebildet wird.

Bei der in Kapitel III 2.2 (Abb. 9) dargestellten Umlagerung würde ein Angriff eines partial positiv geladenen C-Atoms auf ein positiv geladenes C-Atom erfolgen, was relativ unwahrscheinlich ist. Zudem wird die C-C Bindung, die gespalten werden muss, durch die Methylgruppen stabilisiert. Diese Stabilisierung sollte jedoch dazu führen, dass es möglich wäre, die Struktur als Intermediat zu isolieren. Dies ist jedoch auch bei Experimenten im größeren Maßstab nicht gelungen. Aus diesem Ergebnis ergibt sich, dass die Umlagerung wahrscheinlich sehr schnell erfolgen muss und die entstehenden Intermediate sehr kurzlebig sind. Mit dieser Annahme und den Ergebnissen aus den Fütterungen wird die in Abbildung 15 dargestellte Umlagerung postuliert. Im ersten Schritt erfolgt eine Oxidation, die zum Epoxid führt. Dieses wird anschließend durch Protonierung geöffnet, an C-12 entsteht eine Hydroxygruppe und an C-11 ein Carbenium-Ion. Dem folgt die Abspaltung des Protons von C-12 unter Ausbildung einer Doppelbindung zwischen C-11 und C-12. Anschließend kommt es zum nucleophilen Angriff der Doppelbindungs- π -Elektronen auf das Carbonyl-

Kohlenstoffatom, wodurch ein Cyclopropanring entsteht (Bindung zwischen C-11 und C-13). Erst jetzt kommt es unter Abgabe eines Protons zur Abspaltung vom Enzymkomplex, und somit zur Ausbildung eines 2-Hydroxy-cyclopropen-1-on Ringes. Der letzte Schritt der Umlagerung ist eine oxidative Ringöffnung zwischen C-12 und C-13 im Cyclopropenring. Hierbei wird vom Wasser eine Hydroxygruppe auf C-13 und ein Proton auf C-12 übertragen. Im Ergebnis liegen jetzt C-11 und C-13 nebeneinander. Nach zweimaliger Methylierung der Hydroxygruppen durch SAM kommt man zu **5**.

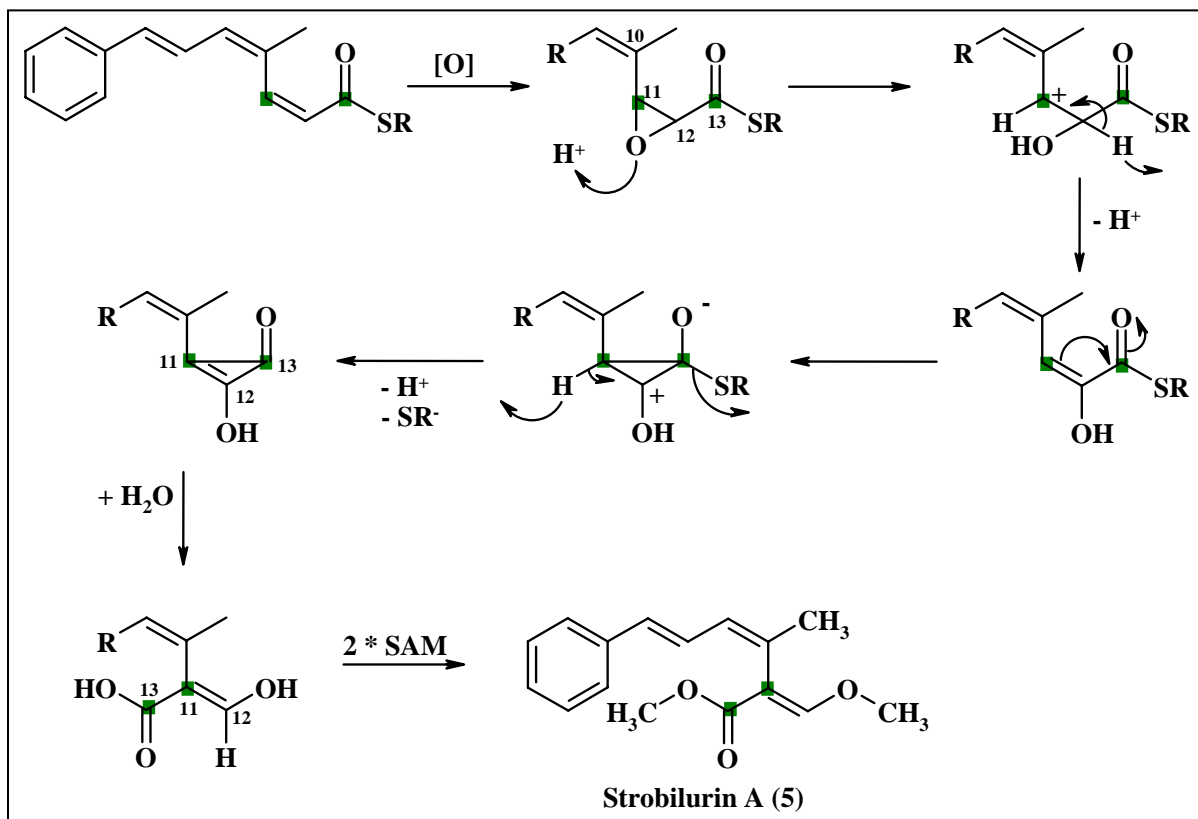


Abb. 15: Postulierte Umlagerung zur Entstehung der Methoxyacrylat-Einheit

Die vorgestellte späte Abkopplung vom Enzymkomplex und der relativ stark gespannte Cyclopropenring dürften somit die Ursache dafür sein, dass keine Intermediate isoliert werden konnten. Die letzten beiden Schritte der Umlagerung sollten zudem sehr schnell ablaufen. Der intramolekulare Charakter dieser Umlagerung wird durch die $^2J_{C,C}$ -Kopplung zwischen C-12 und C-13 bewiesen.

3.5. Acetat-Pool-Hypothese

Aufgrund der unterschiedlichen Einbauraten bei Fütterungen zum frühen und späten Zeitpunkt sollte herausgefunden werden, ob sich dieser Effekt auf eine „Speicherung von Acetat“ im Organismus zurückführen lässt. Zur Klärung dieser Frage wurden zwei weitere Fütterungsexperimente mit $[1-^{13}\text{C}]$ Acetat durchgeführt. Im ersten Experiment erfolgte die Fütterung vom zweiten bis zum sechsten Tag (langer Zeitraum) im Abstand von 24 Stunden. Im zweiten Versuch wurden markiertes und unmarkiertes Acetat im Verhältnis 1:1 gemischt und dann vom zweiten auf den dritten Tag der Fermentation alle sechs Stunden zugegeben. Die Auswertung der NMR-Daten zeigt Tabelle 7; zusätzlich ist noch das Ergebnis des Einbaus zum frühen Zeitpunkt aufgeführt.

C-Atom	^{13}C -NMR δ_{C} (ppm)	Früh (Tag 2 -3)	Früh 1:1	Lang (Tag 2 -6)
9	130.9	23.53 %	8.96 %	26.70 %
11	111.6	45.07	6.30	12.69
13	169.5	31.05	7.71	10.18

Tabelle 7: Einbau an $[1-^{13}\text{C}]$ Acetat in **5** verschiedenen Fütterungsexperimenten

3.5.1. Diskussion

Aus den Experimenten zum frühen Zeitpunkt konnte ein Einbau von 23.53% erhalten werden. Zudem war die Ausbeute an **5** höher als bei einer normalen Fermentation zu diesem Zeitpunkt. Die hohen Einbauraten beim frühen Fütterungszeitraum und die erhöhte Ausbeute können dadurch erklärt werden, dass Acetat in einem Pool für die Biosynthese bereitgestellt wird. Aufgrund der hohen Konzentration des markierten Vorläufers zu Beginn der Ausbildung des Acetat-Pools wird dieser überwiegend mit markiertem Acetat gefüllt. Somit kommt es zu hohen Einbauraten, wenn man die Fütterung zu einem frühen Zeitpunkt durchführt. Zudem wird durch Zugabe von Acetat zu einem früheren Zeitpunkt die Biosynthese von **5** gefördert, da der Pool rechtzeitig von außen gefüllt wird. Diese Befunde sprechen für eine Acetat-Pool-Bildung, bei der Acetat zunächst gespeichert, und dann aus diesem Speicher für die Biosynthese von **5** genutzt wird.

Ein weiteres Indiz für die Pool-Bildung sind die Ergebnisse aus den Fütterungen zum späteren Zeitpunkt der Biosynthese. Die Zugabe des Vorläufers erfolgte zu einem Zeitpunkt entsprechend dem Anstieg der Ausbeute gemäß dem Produktionsverlauf (Abb. 11) von **5**. Obwohl in der gleichen Konzentration wie beim ersten Versuch gefüttert, ist der Einbau wesentlich geringer. Das zugegebene Acetat wird mit nicht markiertem Acetat, welches der Pilz bereitstellt, gemischt. Dies lässt sich mit einer Acetat-Pool-Bildung gut erklären.

Aus diesen Überlegungen heraus, und um die Acetat-Pool-Bildungs Hypothese zu untermauern, wurden die weiteren Experimente durchgeführt. So ergab die Fütterung eines Gemisches von markiertem und unmarkiertem Acetat im Verhältnis von 1:1 zum frühen Zeitpunkt eine Einbaurrate von 8.96 %. Demgegenüber steht ein spezifischer Einbau von 23.53 % bei der Fütterung von 100% markiertem Acetat zum gleichen Zeitpunkt. Zu erwarten gewesen wäre eine Einbaurrate von ungefähr 12 %. Der etwas geringere Einbau kann darauf zurückzuführen sein, dass im Pool schon mehr Acetat enthalten war als im ersten Experiment. Der spezifische Einbau von 26.7 % bei der Fütterung über mehrere Tage deutet ebenfalls auf eine Pool-Bildung hin. In dem Pool wäre demnach annähernd eine konstante Menge an markiertem Acetat, das zum Aufbau von **5** dient. Zu erwarten wäre ein Einbau, der dem des Fütterungsexperimentes zum frühen Zeitpunkt entspricht. Der etwas höhere Einbau kann dadurch erklärt werden, dass der Pool kontinuierlich mit einer hohen Konzentration von markiertem Acetat gefüllt wurde. Hierdurch wird während des Produktionsanstiegs mehr markiertes Acetat aus dem Pool zum Aufbau von **5** verwendet. Zudem lässt sich die Acetat-Pool-Bildungs Hypothese aus den auftretenden statistischen Kopplungen erklären, die in Abbildung 16 gezeigt sind.

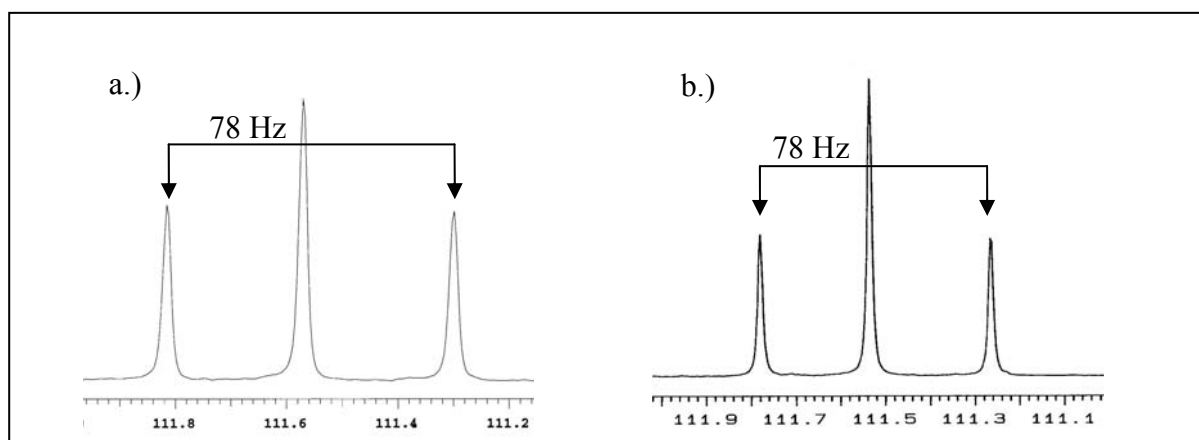


Abb. 16: Statistische Kopplungen zwischen C-11 in **5** in Abhängigkeit der gefütterten Konzentration an $[1-^{13}\text{C}]$ Acetat zum frühen Zeitpunkt (a. = 12 mmol/L; b. = 6 mmol/L).

Statistische Kopplungen sind selten zu beobachten, da die natürliche Häufigkeit von ^{13}C bei 1.1 % liegt. Die auftretende Kopplung zwischen einem angereicherten Kern mit einem benachbarten Kern, der die natürliche Häufigkeit aufweist, ist daher sehr schwach (siehe Kapitel IV 3.2). Die in den vorgenommenen Fütterungen zu beobachtenden statistischen Kopplungen hingegen weisen eine gut sichtbare Aufspaltung zum Dublett auf. Dies lässt sich nur durch eine hohe Einbaurrate am Anfang der Produktbildung erklären. Zu diesem Zeitpunkt tragen viele Moleküle in **5** eine Markierung an C-11 und C-13. Da die Umlagerung

intramolekular läuft (s. Abb.15), ergibt sich in diesen Fällen die Kopplung. Bei später gebildeten Molekülen verdünnt sich die Markierung. Die tatsächlich gefundene Einbaurrate ist gewissermaßen ein Mittelwert, der durch die Markierung in Molekülen mit unterschiedlicher Einbauqualität entsteht.

Führt man den Versuch zum frühen Zeitpunkt mit unmarkierten/markiertem Acetat in einem Verhältnis von 1:1 durch, so ist beim Vorliegen eines Acetat-Pools eine Abschwächung der Signalintensität um 50 % zu erwarten. Wie in Abbildung 16 gezeigt, konnte die vermutete Intensitätserniedrigung von ca. 50 % beobachtet werden.

3.6. Ausblick

Weitere Hinweise auf die Umlagerung zum Acrylat könnte eine Kultivierung des Stammes in einer $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre liefern. Zu erwarten wäre ein Isotopenshift bei C- 12. Auch mit einer Kultivierung in D_2O sollte ein Hinweis auf den Mechanismus der Umlagerung ergeben. Im EI-Massenspektrum von **5** wäre ein M+1 Peak zu beobachten, weil 12-H partiell durch Deuterium substituiert sein sollte. Zudem wäre im ^1H -NMR Spektrum eine Abschwächung des 12-H-Signals zu erwarten.

Eine Steigerung der Ausbeuten von **5** könnte eventuell erreicht werden, wenn dem Medium frühzeitig Acetat zugesetzt wird. Ausgehend von der Acetat-Pool Hypothese würde die Produktion von **5** zu einem früheren Zeitpunkt gefördert. Der Stamm reagiert jedoch mitunter sehr empfindlich auf Vorläufer, so dass zuvor in einer größeren Versuchsreihe die verträgliche Acetatkonzentration zu ermitteln wäre.

Molekulargenetische Untersuchungen an diesem Stamm könnten weitere Erkenntnisse zum Biosyntheseablauf liefern. Vor allem die Identifizierung des für die Umlagerung verantwortlichen Enzyms wäre von Interesse, weil sich durch dieses erst die für die biologische Aktivität so wichtige Acrylateinheit ausbildet. Für die kombinatorische Biosynthese würde somit ein weiteres interessantes Enzym als Werkzeug zur Verfügung stehen.

IV. Strobilurin-Analoga durch vorläufer-dirigierte Biosynthese

1. Allgemeines

Neben den genetischen Methoden und der Kombinatorischen Chemie ist die vorläufer-dirigierte Biosynthese eine weitere Möglichkeit, Naturstoffe abzuwandeln. Für die Durchführung solcher Experimente ist eine genaue Kenntnis des Biosynthesewegs nötig. Sind die einzelnen Bausteine eines Metaboliten bekannt, können strukturverwandte Bausteine während der Fermentation zugefüttert werden, um so neue Derivate des Naturstoffes zu generieren. Vor allem bei komplexen Strukturen bietet diese Methode einen Vorteil gegenüber den chemischen Derivatisierungsmethoden. Besonders die Variation der Startereinheit bietet sich für vorläufer-dirigierte Biosynthese an. Hierdurch kann mitunter die Aktivität signifikant modifiziert werden. Mittlerweile sind einige aromatische Systeme bekannt, die als Startereinheit dienen, und die anscheinend beliebig ausgetauscht werden können. Zudem können sich neue Metabolite bilden, wenn der Vorläufer für eine Induktion anderer Biosynthesewege sorgt.⁸³

Untersuchungen zur vorläufer-dirigierten Biosynthese an höheren Pilzen, zu denen auch die Basidiomyceten gehören, sind bisher selten durchgeführt worden. Dies mag zum einen daran liegen, dass Basidiomyceten als schlecht kultivierbar gelten und zum anderen an den langen Fermentationszeiten.

2. Variation der Startereinheit

2.1. Fütterung von fluormarkierten Vorläufern

An dem Ascomyceten *Bolinea lutea* wurden auch Experimente unter dem Aspekt der vorläufer-dirigierten Biosynthese durchgeführt.⁷⁸ Diese Experimente zielten auf eine Variation der Startereinheit ab (siehe Kapitel III 2.2). So wurden Versuche u.a. mit unterschiedlich fluormarkierten Benzoessäure- und Zimtsäure-Vorläufern unternommen. Es konnte zwar ein Einbau der Fluorvorläufer beobachtet werden, jedoch gelang es nicht, die Fluorderivate aufzureinigen (Abb. 17).

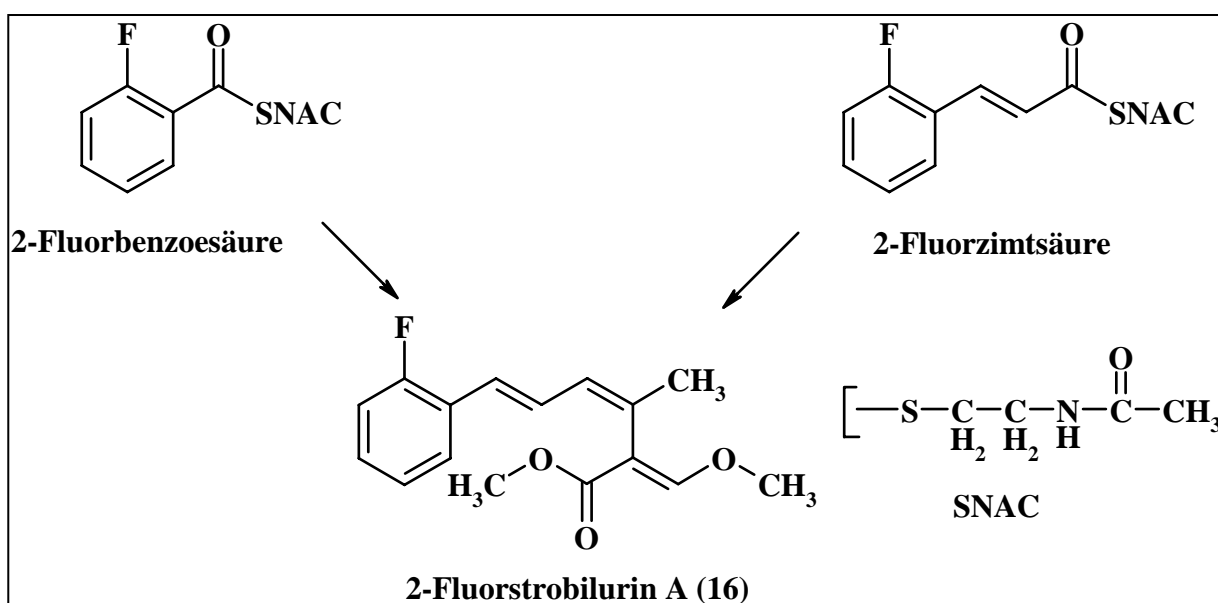


Abb. 17: Beispiel für ein fluorsubstituiertes Strobilurin A ausgehend von 2-Fluorbenzoesäure- und 2-Fluorzimtsäure-SNAC-thioester (nicht als Reinsubstanz erhalten)⁷⁸

In Zusammenarbeit mit T.J. Simpson wurden in Bristol die gleichen fluormarkierten Vorläufer für Fütterungsexperimente mit unserem Stamm synthetisiert.^{*2} Die Zugabe der verschiedenen Vorläufer als SNAC-Thioester zur Kulturlösung von *Strobilurus tenacellus* erfolgte zu den beschriebenen frühen und späten Zeitpunkten während der Fermentation (siehe Kapitel III 3.3) in einer Konzentration von 0.5 mmol/L. Die Aufarbeitung der verschiedenen Ansätze erfolgte nach Abbildung 3 (Kapitel II 2.2). Erste NMR-Messungen deuteten auf ein Mischspektrum von zwei verschiedenen Strobilurinen hin, die mit der HPLC zunächst nicht zu trennen waren.

² Für die Überlassung von 2-, 3- und 4-Fluorbenzoesäure-SNAC und Zimtsäure-SNAC, sowie für die Überlassung der PhD-Arbeit zu der Biosynthese von Strobilurin A danken wir Prof. Dr. T.J. Simpson FRS (University of Bristol, School of Chemistry, Organic and Biological Chemistry)

Aufgrund der Kenntnis, dass die Strobilurine temperaturstabil sind, wurde eine GC-EI-MS-Messung durchgeführt. Die gaschromatographischen Untersuchungen brachten Erfolg und offenbarten zwei Substanzen, von denen eine ihren höchsten Massenpeak bei $m/z = 258$ aufwies. Der anderen Verbindung konnte eine Masse von 276 g/mol zugeordnet werden (siehe Abb. 18).

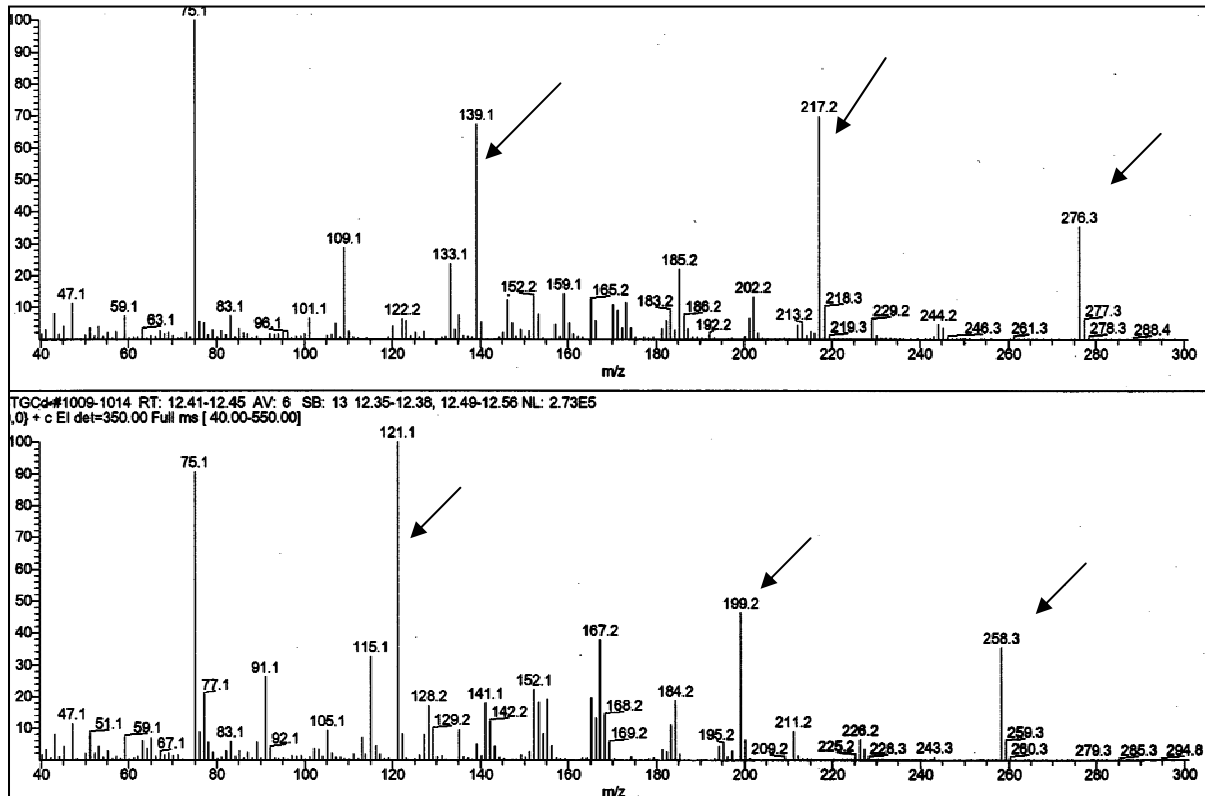


Abb. 18: EI-MS-Spektrum von **16** (oben) und **5** (unten) aus GC-EI-MS-Experiment

Das Molekülion bei $m/z = 258$ sowie die ersichtliche Fragmentierung zeigen Strobilurin A (**5**) an. Die berechnete Massendifferenz von 18 g/mol zur zweiten Verbindung entspricht der erwarteten bei einem Einbau des Fluor-Vorläufers. Mit diesem Wissen wurden weitere Versuche unternommen, eine Trennung des Gemisches über HPLC zu erreichen. Dies gelang mit einem isokratischen Programm ($\text{MeOH:H}_2\text{O} = 60:40$) über 100 min. an einer semipräparativen HPLC-Säule (Material: Kromasil). Aus den verschiedenen Experimenten konnten so die erwarteten Strobilurin Derivate isoliert werden. In Tabelle 8 unter IV 2.3 sind die Ausbeuten aufgeführt. Die drei Fluorderivate färben mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 blau an und sind bei 254 nm stark UV-löschend. Ebenfalls gemeinsam ist die Molmasse von 276 g/mol , die sich aus dem EI-Massenspektren ergibt. Auch in den für **5** typischen Fragmenten im EI-Massenspektrum konnte für die einzelnen Fluor-Derivate der jeweiligen $M+18$ Massenpeaks gefunden werden. Die drei Fluor-Derivate wurden bislang nicht publiziert.

2-Fluorstrobilurin A (16)

Anhand des Aufspaltungsmusters der aromatischen Protonen im ^1H -NMR-Spektrum konnte die *ortho*-Position von Fluor bestätigt werden. Für die mit Fluor koppelnden aromatischen Protonen sind komplexe Spinsysteme zu beobachten. Im ^{19}F -NMR-Spektrum liegt ein Signal bei $\delta_{\text{F}} = -120.5$, in dem diese Kopplungen wieder gefunden werden und die H-F Interaktion verdeutlichen (siehe Abb. 19). Im ^{13}C -NMR-Spektrum waren doppelte Signalsätze für die aromatischen Kohlenstoffatome zu beobachten, die auf eine Kopplung von Fluor mit den ^{13}C -Kernen zurückzuführen sind.

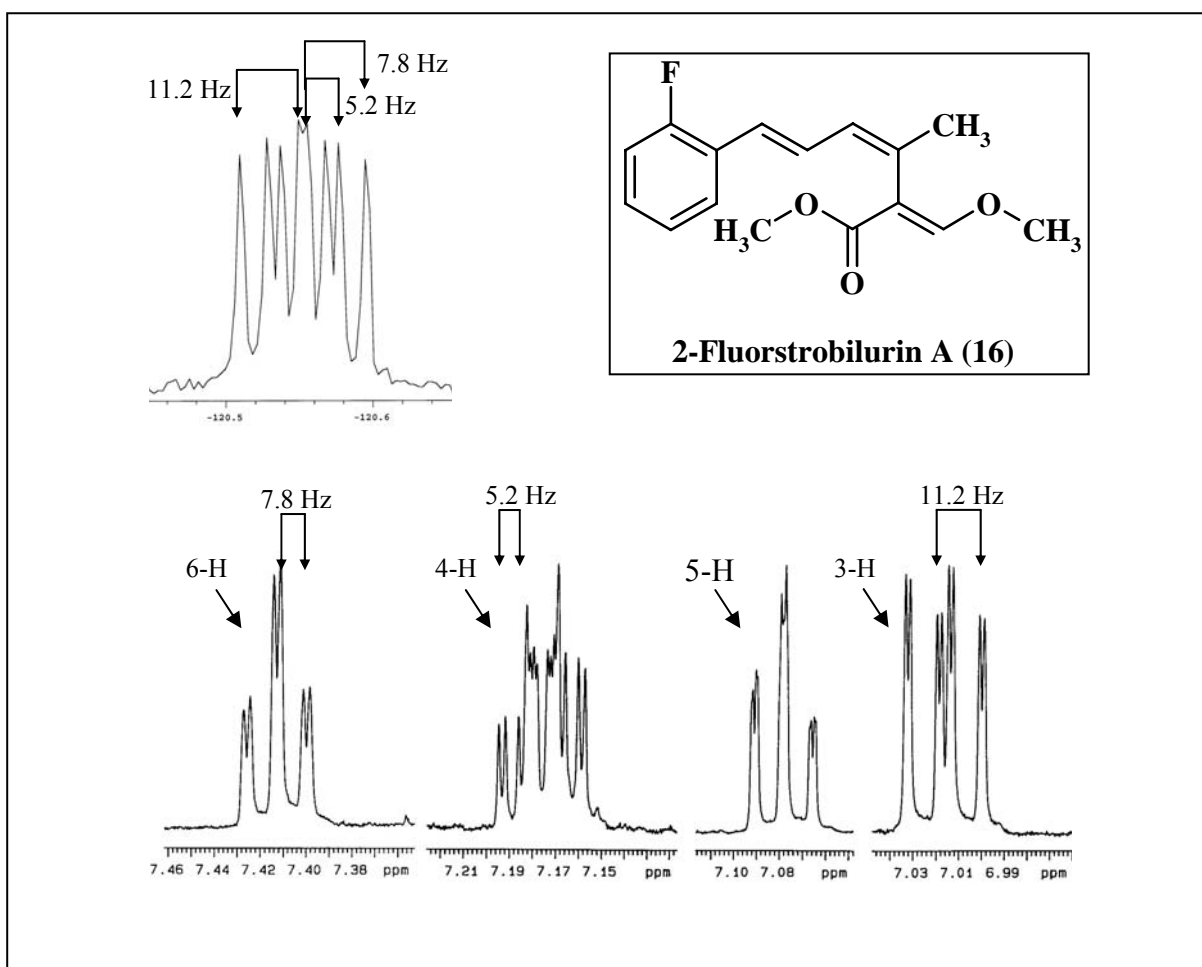


Abb.19: ^{19}F -NMR und ^1H -NMR (aromatische Protonen) mit Kopplungskonstanten von 2-Fluorstrobilurin A

3-Fluorstrobilurin A (12)

Im ^1H -NMR-Spektrum konnte aus dem Aufspaltungsmuster der aromatischen Protonen auf die *meta*-Position des Fluorsubstituenten geschlossen werden. Auch hier zeigten sich für die aromatischen Protonen komplexe Spinsysteme für mit Fluor koppelnde Kerne. Im ^{19}F -NMR-Spektrum bei $\delta_{\text{F}} = -112.3$ konnten im Aufspaltungsmuster die Kopplungen wieder gefunden werden (siehe Abb.20). Der doppelte Signalsatz für die aromatischen Kohlenstoffatome im ^{13}C -NMR-Spektrum ist ebenfalls zu beobachten. Die 1J -Kopplung ^{13}C - ^{19}F beträgt 233.9 Hz.

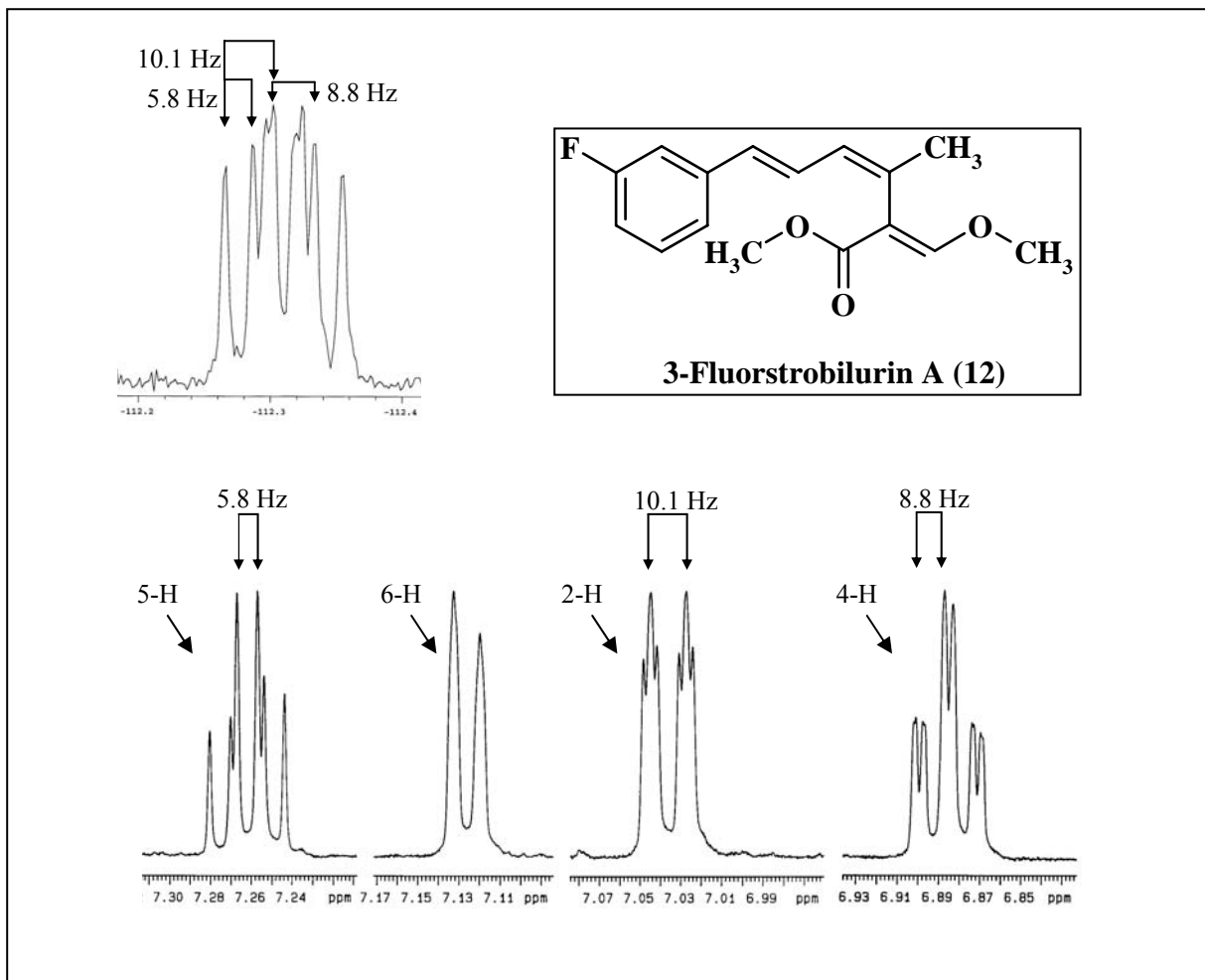


Abb.20: ^{19}F -NMR und ^1H -NMR (aromatische Protonen) mit Kopplungskonstanten von 3-Fluorstrobilurin A

4-Fluorstrobilurin A (17)

Wie bei beiden Fluorverbindungen zuvor wurde die Position des Fluors in *para*-Stellung anhand des Aufspaltungsmusters der aromatischen Protonen im ^1H -NMR-Spektrum ermittelt (siehe Abb.21). Im ^{13}C -NMR-Spektrum tritt wieder ein doppelter Signalsatz auf. Die ^{13}C - ^{19}F - ^1J -Kopplung konnte mit 245.1 Hz bestimmt werden.

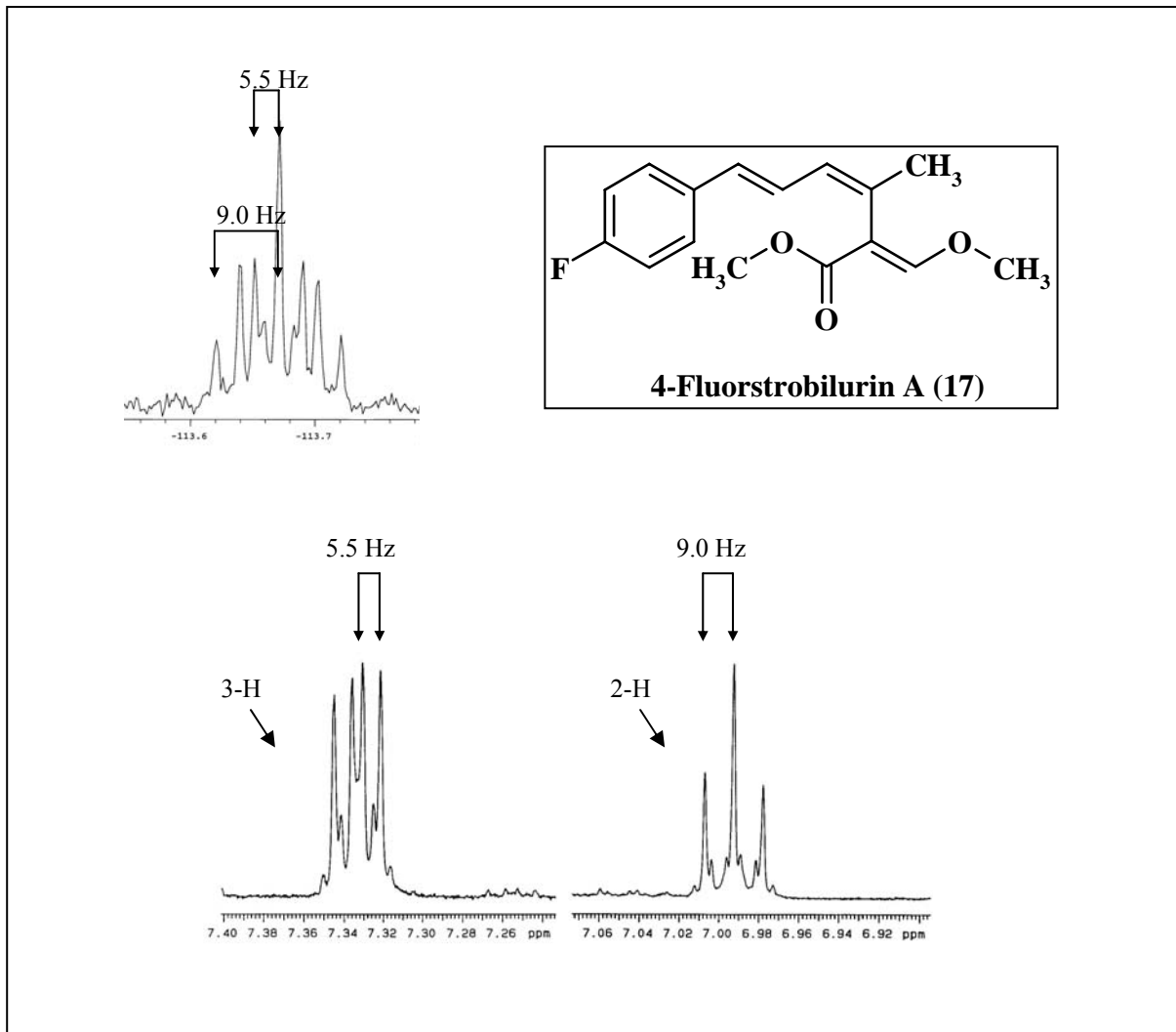


Abb.21: ^{19}F -NMR und ^1H -NMR (aromatische Protonen) mit Kopplungskonstanten von 4-Fluorstrobilurin A

2.2. Fütterung von Nicotinsäure

Die Akzeptanz von heterocyclischen Sechsringen als Startereinheit sollte in einem Fütterungsexperiment mit Nicotinsäure untersucht werden. Die Zufütterung von Nicotinsäure führte nach Aufarbeitung zu zwei verschiedenen Metaboliten, die, wie Strobilurin A, mit Anisaldehyd/H₂SO₄ blau anfärbten. Es gelang jedoch nicht, die Metabolite zu trennen. Vermutlich haben sich die über HPLC aufgetrennten Substanzen zersetzt, so dass am Ende nur verunreinigte Fraktionen vorlagen. Aus dem ¹H-NMR-Spektrum der einen Fraktion lassen sich jedoch Vermutungen anstellen (siehe Abb.22).

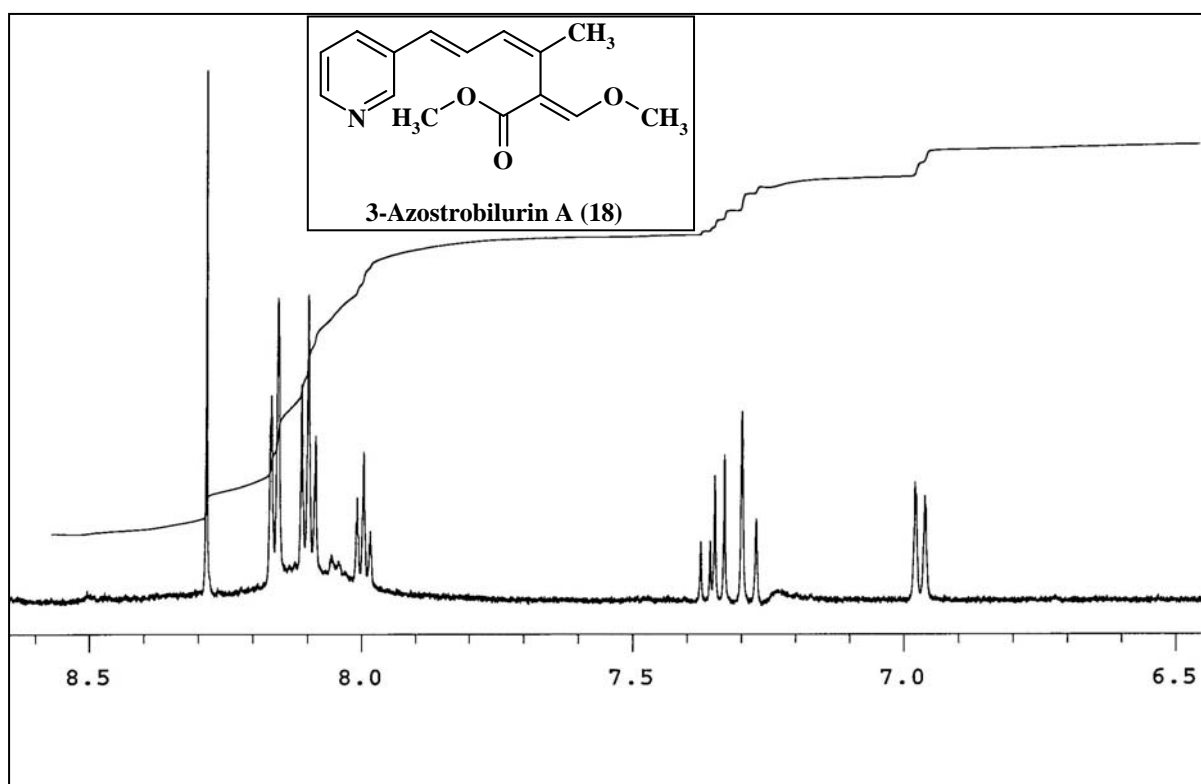


Abb. 22: ¹H-NMR-Experiment der erhaltenden Fraktion (aromatische Protonen)

Neben dem Aufspaltungsmuster des Diensystems und dem typischen Singulett für Strobilurin A (5) konnte eine Tieffeldverschiebung der aromatischen Protonen beobachtet werden. Das Erscheinen der Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 8.0$ bis 8.2 kann nur auf ein Heteroatom im Aromaten zurückzuführen sein. Ein Vergleich mit hetero-aromatischen Systemen deutet auf ein Pyridin ähnliches System. Demnach wurde die Nicotinsäure als Startereinheit akzeptiert und führte zu 3-Azostrobilurin A (18). In der Literatur ist dieses Derivat noch nicht beschrieben.

2.3. Diskussion der Ergebnisse

Bei dem Experiment mit Nicotinsäure als Startereinheit kann ein Einbau angenommen werden. Es war trotz HPLC Aufreinigung aber nicht gelungen, die Verbindung als Reinsubstanz zu erhalten. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Strobilurine wird es zu einer Zersetzung der Verbindung gekommen sein.

Die Experimente mit den verschiedenen fluormarkierten Vorläufern ergaben nach Aufarbeitung die zu erwartenden Strobilurin-Derivate **16**, **12**, **17**. In Tabelle Nr. 8 sind die erhaltenen Ausbeuten sowie das Verhältnis zwischen Strobilurin A und dem jeweiligen Fluorstrobilurin aufgeführt.

V.	Früh			Spät		
	5	Fluor-Derivat	Verhältnis	5	Fluor-Derivat	Verhältnis
2 FB	k.A	k.A	~ 3:1	1.5 mg/L	0.4 mg/L	~ 3:1
3 FB	5.4 mg/L	1.8 mg/L	3:1	0.9 mg/L	1.1 mg/L	~ 3:1
4 FB	3.9 mg/L	1.1 mg/L	~ 3:1	2.7 mg/L	0.8 mg/L	~ 3:1
2 FZ	k.A	k.A	k.A	3.0 mg/L	0.3 mg/L	~ 10:1
3 FZ	1.2 mg/L	0.1 mg/L	12:1	2.8 mg/L	0.3 mg/L	~ 10:1
4 FZ	6.9 mg/L	0.6 mg/L	~ 12:1	1.0 mg/L	~ 0.1 mg/L	~ 10:1

Tabelle 8: Erhaltenen Ausbeuten an 16, 12 und 17 aus den verschiedenen Fluor-Vorläufern Experimenten (V. = Vorläufer; FB = Fluorbenzoesäure-SNAC; FZ = Fluorzimtsäure-SNAC; k.A = keine Angabe (die Substanz hat sich zersetzt))

Aus den verschiedenen Experimenten mit den Fluorbenzoesäure-SNAC Vorläufern ergibt sich ein Verhältnis von 3:1 zwischen **5** und dem jeweiligen Fluor-Analogon. Eine Änderung des Verhältnisses zwischen der frühen und späten Zufütterung konnte nicht festgestellt werden. Jedoch sind die Ausbeuten der Fluor-Analoga bei der frühen Fütterung etwas höher. Ein anderes Bild zeigt sich bei der Zugabe von Fluorzimtsäure-SNAC. Hier beträgt das Verhältnis zum frühen Zeitpunkt 12:1 gegenüber 10:1 zum späten Zeitpunkt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Strobilurin-Produktion im späten Zeitraum der Fermentation stark ansteigt. Interessant ist auch ein Vergleich zwischen den Verhältnissen der Fluorbenzoesäure- und Fluorzimtsäurethioester Fütterung. Nach Zugabe der Benzoesäure-SNAC Vorläufer konnte wesentlich mehr des Fluoranalogs isoliert werden. Somit kann der postulierte Abbau von Phenylalanin zur Benzoesäure (Kapitel III 3.5 Abbildung 14) indirekt erneut bestätigt werden. Während Fluorbenzoesäure direkt als Startereinheit dient, muss Fluorzimtsäure erst zu dieser über den in Abbildung 14 dargestellten Weg abgebaut werden.

Bei den Experimenten in Bristol hatte sich allerdings das Gegenteil gezeigt. Hier war die Ausbeute des Fluoranalogs bei Zugabe von Fluorzimtsäure-SNAC wesentlich höher. Somit stellt sich erneut die Frage, ob in beiden Stämmen, die zu verschiedenen Gattungen gehören, die gleiche Startereinheit zum Einsatz kommt. Die Ausbeute an den jeweiligen Fluorderivaten ist bei Zugabe von 3-Fluorbenzoesäure-SNAC am höchsten.

3. Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Produktion

3.1. Bedeutung von SNAC-Thioester

In den zuvor durchgeführten Experimenten mit Fluor markierten Vorläufern, vorgelegt als SNAC-Thioester, konnte gezeigt werden, dass es zur Produktion von verschiedenem Fluorstrobilurin A kommt.

Die Überführung eines Vorläufers in einen Thioester wird aus verschiedenen Gründen vorgenommen und hat sich zur Aufklärung von Biosynthesen etabliert. Freie Säuren unterliegen häufig einer β -Oxidation. Zudem kann sich das hydrophile Strukturelement negativ auf die Membrangängigkeit auswirken. Zu bedenken ist weiterhin, dass die freie Säure für die Biosynthese im Organismus in einen aktivierten Zustand überführt werden muss. Am sinnvollsten wäre es, die Natur zu imitieren. Schaut man in die Literatur sind Versuche, die Vorläufer als Co-Enzym A darzustellen, bisher nicht sehr erfolgreich. Hierfür sind chemisch anspruchsvolle Veresterungen mit sehr reaktiven Anhydriden oder eine enzymatische Umsetzung des leicht zersetzbaren Co-Enzym A nötig. In beiden Fällen ist die Ausbeute eines aktivierten Vorläufers sehr gering. Für Polyketidbiosyntheseuntersuchungen wurde dazu übergegangen, die Vorläufer-Carbonsäuren mit N-Acetylcysteamin in einen Thioester zu überführen. Ein Vergleich der Strukturen von N-Acetylcysteamin (NAC) (**18**) mit dem Acyl Carrier Protein (ACP) (**19**) und Coenzym A (**20**) zeigt eine gewisse Ähnlichkeit und ist in Abbildung 23 aufgezeigt. Aufgrund dieser Strukturverwandschaft wird eine höhere Akzeptanz des Vorläufers vom ACP angenommen.

Der lipophile Anteil im Vorläufer kann zudem zu einer besseren Membrangängigkeit führen und der Thioester ist gegenüber einer β -Oxidation unempfindlicher.

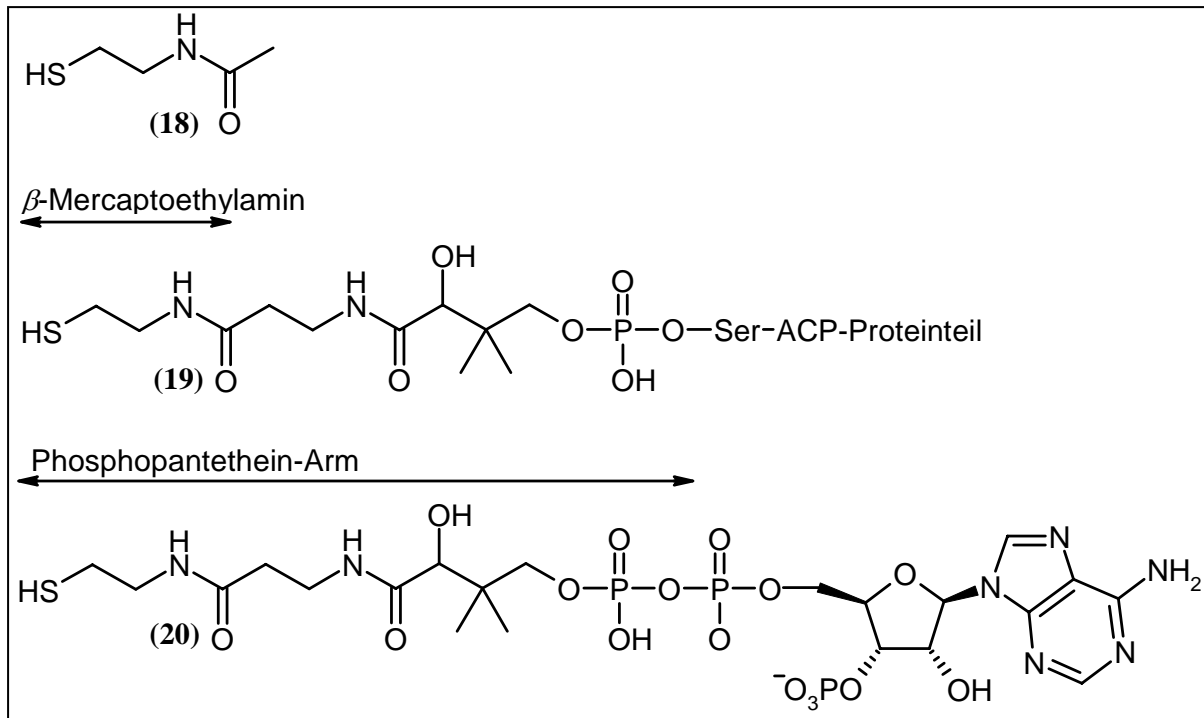


Abb. 23: Vergleich der Struktur von NAC, ACP und Coenzym A

Aufgrund der geringen Ausbeute an den Fluorstrobilurinen (0.3 bis 1.0 mg/L) sollte in nachfolgenden Versuchen geklärt werden, ob sich die Ausbeute erhöhen lässt, wenn die Fütterungen konzentrationsabhängig durchgeführt werden. Außerdem sollte geprüft werden, wie sich die Ausbeuten verhalten, wenn der Vorläufer nicht als Thioester sondern als freie Säure angeboten wird.

3.2. Darstellung von 2-Fluorbenzoesäure-thioester

Zunächst wurde die 2-Fluorbenzoesäure nach der AAV 1 in den Thioester überführt. Der Mechanismus der Synthese ist in Abbildung 24 aufgezeigt. In den ersten beiden Schritten wird die Säure zunächst mit DCC (Dicyclohexylcarbodiimid) und nachfolgend mit DMAP (4-Dimethyl-aminopyridin) gekoppelt, bevor der nucleophile Angriff von N-Acetylcysteamin erfolgt und der gewünschte Thioester erhalten wird.

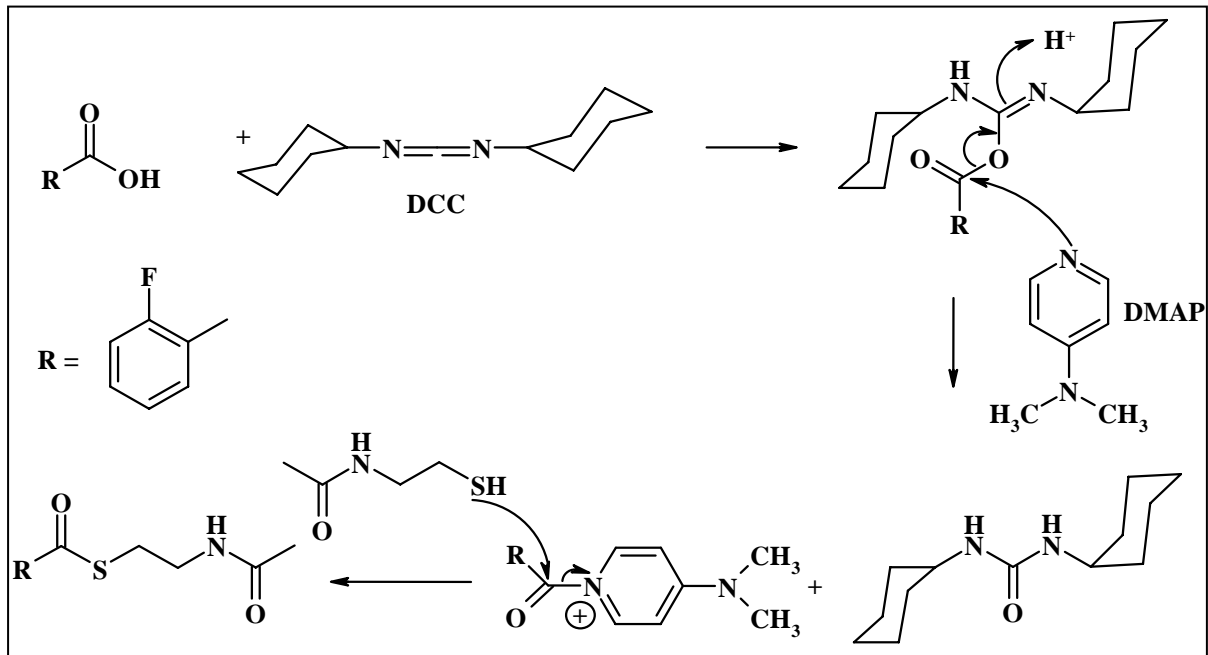


Abb. 24: Mechanismus zu Darstellung von 2-Fluorbenzoesäure-SNAC-thioester

Insgesamt wurden 28 mmol des 2-Fluorbenzoesäure-thioesters auf diesem Wege dargestellt und in verschiedenen Konzentrationen zugefüttert.

3.3. Fütterung von 2-Fluorbenzoesäure-thioester

Die Fütterungen wurden in 1 L Ansätzen durchgeführt, wobei die Zugabe vom 2. auf den 3. Tag (früher Zeitpunkt) der Fermentation im Intervall von sechs Stunden erfolgte. Die Konzentration wurde von 1 bis 7 mmol variiert; es ergaben sich sieben Experimente.

Anschließende Aufreinigung mittels Säulenchromatographie und HPLC lieferte die in Tabelle 9 genannten Ausbeuten an **5** und **16**.

Konzentration [mmol/L]	1	2	3	4	5	6	7
Rohprodukt [mg/L]	1.9	1.4	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3
Strobilurin A (5)	0.8	0.7	1.1	0.7	--	--	--
2-Fluorstrobilurin A (16)	0.9	1.0	1.1	0.5	--	--	--

Tabelle 9: Ausbeuten [mg/L] aus den konzentrationsabhängigen Versuchen mit 2-Fluorbenzoesäure-SNAC-Thioester

3.4. Fütterung von 2-Fluorbenzoesäure

Die Experimente mit 2-Fluorbenzoesäure wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie bei den Fütterungen zuvor. Die Ausbeuten an 2-Fluorstrobilurin A (**16**) waren bei allen Experimenten sehr gering (unter 0.2 mg/L).

3.5. Diskussion der Ergebnisse

Aus den Ergebnissen der Fütterungen mit 2-Fluorbenzoesäure-thioester ergibt sich eine Zunahme der Produktion von **16** bei einer Fütterungskonzentration von 2 bis 3 mmol/L. Bei einer Konzentration von 4 mmol/L waren die Ausbeuten des fluorierten Produktes wesentlich geringer und lagen sogar unter denen der 1 mmol/L- Fütterung. Gleichzeitig ging auch die Menge an erhaltenem Rohprodukt zurück. Ab einer Zugabe von 5 mmol/L an Thioester-Precursor wurde die Produktion sowohl von Strobilurin A als auch von **16** eingestellt, und es konnte eine Anreicherung des Vorläufers im Mycel beobachtet werden.

Bei den vergleichenden Experimenten mit freier 2-Fluorbenzoesäure, ist aufgrund der geringen Ausbeuten keine Aussage möglich, es trat lediglich eine Anreicherung des Vorläufers im Mycel auf. Beim Vergleich der beiden Versuchsreihen war die Ausbeute an 2-Fluorstrobilurin A (**16**) nach Zugabe des Vorläufers als Thioester deutlich höher. Aufgrund der Anreicherung der Vorläufer im Mycel in beiden Versuchsreihen dürfte die Überführung in den Thioester keinen signifikanten Einfluss auf die Membrangängigkeit haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch Überführung des Vorläufers in den SNAC-Thioester die Akzeptanz erhöht und bis zu einer gewissen Konzentration sogar gesteigert werden kann.

4. Tandemfütterungen

4.1. Strategie für Tandemfütterungen

Führt man eine Datenbanksuche zu Strobilurinen durch, so wird deutlich, dass die Substanzklasse durch unterschiedliche Pilzstämme produziert wird. Betrachtet man den aromatischen Strukturteil wird eine Variation im Substitutionsmuster deutlich (Abbildung 25).

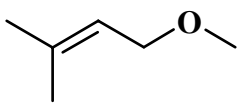
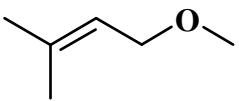
	R1	R2	R3
Strobilurin A (5)	H	H	H
Strobilurin B (13)	OCH ₃	Cl	H
Strobilurin H (15)	OCH ₃	H	H
Strobilurin X (21)	H	OCH ₃	H
9-Methoxystrobilurin A (22)	H	H	OCH ₃
Strobilurin F1 (14)	OH	H	H
Strobilurin F2	H		H
Strobilurin C		H	H

Abb. 25: Bekannte Strobilurine mit Veränderungen am Aromaten

So kommt bei **15** und **21** eine Methoxygruppe in 3- bzw. 4-Position vor. **14** hingegen weist eine Hydroxy-Gruppe in 3-Position auf. Eine Methoxygruppe in 3-Stellung sowie ein Chlor-Substituent in 4-Position kennzeichnet **13**. Aus dem Stamm *Strobilurus tenacellus* konnten von T. Anke et. al. **5** und **13** isoliert werden. Uns gelang es anfangs nur **5** in diesem Stamm nachzuweisen. Aufgrund der Erkenntnisse aus den Biosynthese-Untersuchungen schien es

möglich, die genannten Strobilurine durch eine geeignete Wahl der Vorläufer in dem Stamm zu exprimieren (s. Abb. 26).

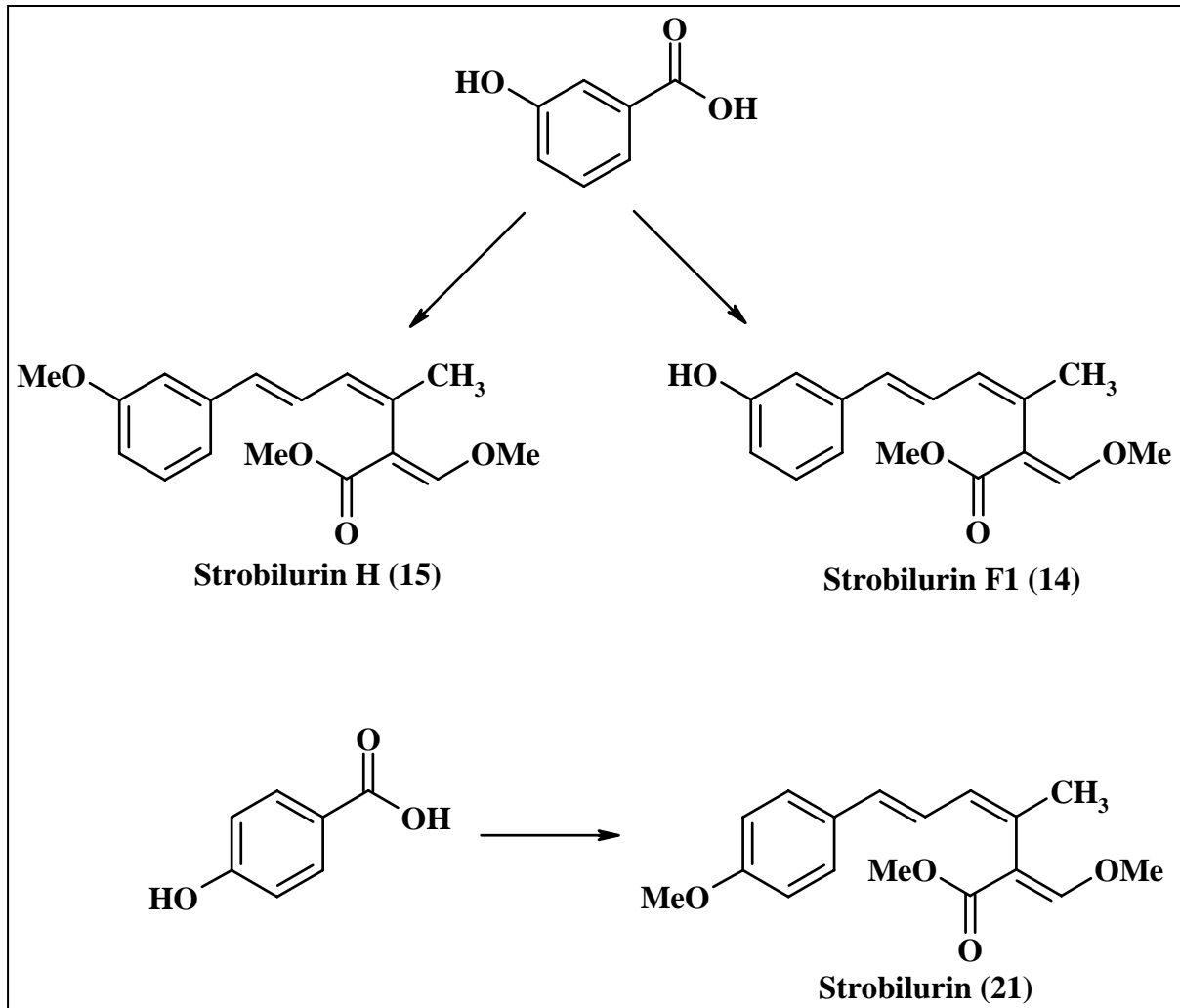


Abb. 26: Durch geeignete Wahl des Vorläufers mögliche Strobilurine

13 ist, wie oben erwähnt, der einzige Vertreter mit einem Chlorsubstituenten. Die Einführung eines Halogens erfolgt durch eine Haloperoxidase oder eine Halogenase. Die Zugabe von Halogensalzen könnte Einblicke in den Ablauf der Halogenierung geben. Zudem besteht die Möglichkeit, andere halogenierte Strobilurine zu erhalten. Eine Tandemfütterung mit einem Halogensalz und in Verbindung mit 3- oder 4-Hydroxybenzoesäure erscheint sinnvoll, um die Ausbeute des gewünschten Metaboliten zu steigern. Hierfür spricht, dass beide Benzoesäuren in früheren Arbeiten von V. Musilek et. al. im Mycel von *Oudemansiella mucidia* als Metaboliten nachgewiesen werden konnten.⁸⁴

Demnach könnte bei Zugabe von 3-Hydroxybenzoesäure und Kaliumbromid das Fluoranaloga zu **13** gebildet werden (s. Abb. 27). Ähnliche Derivate könnten bei Zugabe von Kaliumfluorid, Kaliumchlorid und Kaliumiodid entstehen.

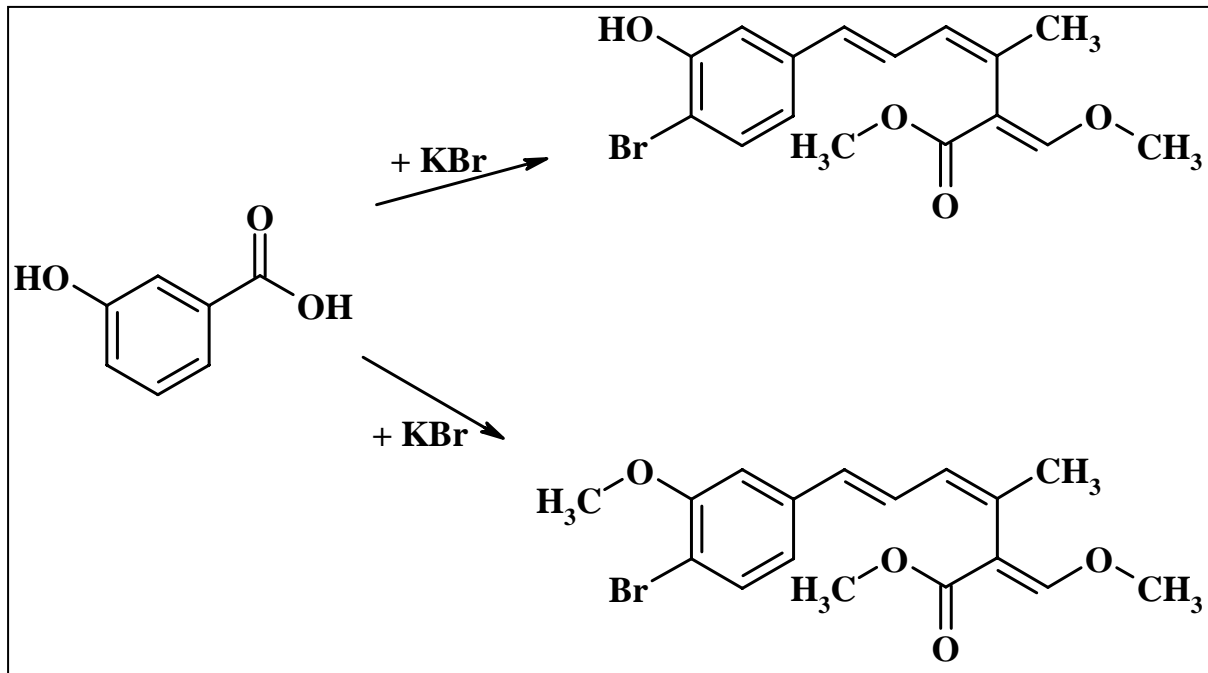


Abb. 27: Mögliche Produkte bei Zugabe von 3-Hydroxybenzoesäure und Kaliumbromid

Durch Zufüttern von 4-Hydroxybenzoesäure könnte **21** entstehen. Die Zugabe der oben genannten Halogensalze würde bei einer unspezifischen Halogenierung halogenierte Derivate von Strobilurin X ergeben (Abb. 28).

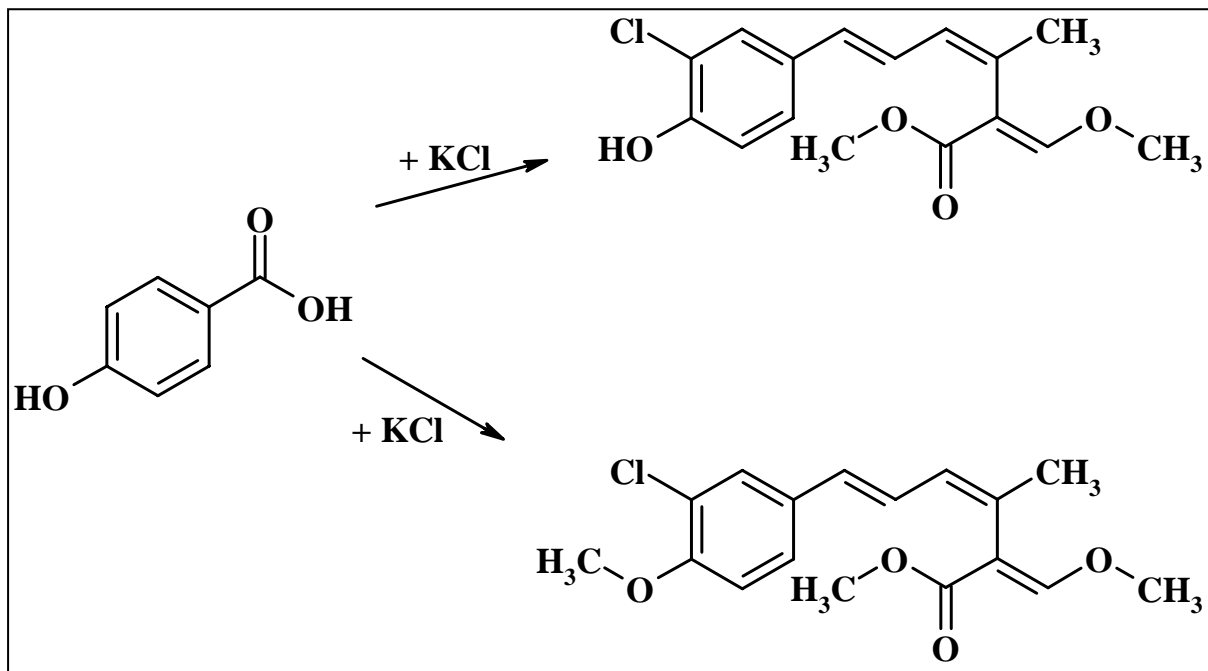


Abb. 28: Mögliche Metabolite bei Zugabe von 4-Hydroxybenzoesäure und Kaliumchlorid

Aus den zuvor angestellten Überlegungen zur vorläufer-dirigierten Biosynthese ergeben sich folgende Experimente:

Experiment 1: MeOH

Experiment 2: 3- bzw. 4-Hydroxybenzoesäure

Experiment 3: 3- bzw. 4-Hydroxybenzoesäure + Kaliumfluorid

Experiment 4: 3- bzw. 4-Hydroxybenzoesäure + Kaliumchlorid

Experiment 5: 3- bzw. 4-Hydroxybenzoesäure + Kaliumbromid

Experiment 6: 3- bzw. 4-Hydroxybenzoesäure + Kaliumiodid

Zunächst galt es, die Verträglichkeit der gewählten Vorläufer bei dem Stamm zu untersuchen. Alle genannten Experimente wurden in 0,5 L Ansätzen über einen Zeitraum von vier Tagen durchgeführt. Es hatte sich gezeigt, dass, wenn die Salze auf einmal zugegeben wurden, dies zum Absterben des Stammes führte. Aus diesem Grund wurde dazu übergegangen, die Hydroxybenzoesäuren in einer Konzentration von 3 mmol/L und die genannten Salze in einer Konzentration von drei Massenprozent (bezogen auf Kulturvolumen) zu lösen, und in einem Intervall von 6 Stunden von der 48. – 72. Stunde der Fermentation zuzugeben. Nach der Aufarbeitung am vierten Tag wurden die erhaltenen Rohprodukte an der HPLC-EI-MS analysiert. In den Spektren konnten einige Massen der zu erwartenden Derivate aufgefunden werden. Die Ausbeuten schienen jedoch sehr gering zu sein.

4.2. Neue Metabolite aus *Strobilurus tenacellus*

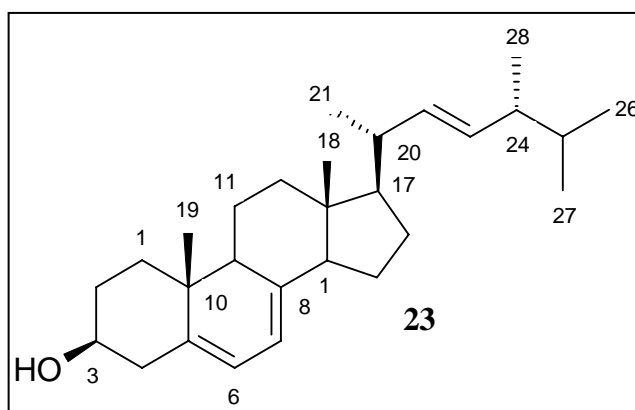
Für die Hauptproduktion wurden die Experimente daher in vier Liter-Ansätzen und über einen Zeitraum von neun Tagen vorgenommen, um beide Produktionsanstiege zu erfassen (siehe Kapitel III 3.2 Abb.11). Für die Fütterungen wurden täglich 3 mmol/L der jeweiligen Benzoesäure vom 2. – 8. Tag der Fermentation in einem Intervall von 12 Stunden zugegeben. Parallel wurden über den gleichen Zeitraum insgesamt drei Massenprozent des Salzes hinzugefügt. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei den Fluor-Derivaten mittels Säulenchromatographie und HPLC. Aus den Experimenten mit 3-Hydroxybenzoesäure und den Halogensalzen konnten über HPLC mehrere Metabolite erkannt werden. Jedoch waren die Ausbeuten der verschiedenen Derivate zu gering, um eine Strukturaufklärung vorzunehmen. Diese lagen zum Teil weit unter 0.2 mg/L. Der erhoffte Effekt, die Ausbeute durch Zusatz von Benzoesäure zu steigern, blieb aus.

Ein anderes Bild zeigte sich bei den Fütterungen von 4-Hydroxybenzoesäure und Halogensalzen. Nach Aufarbeitung konnte man im Dünnschichtchromatogramm jeweils zwei

Strobilurine bei der Zugabe mit Kaliumfluorid und Kaliumchlorid erkennen. Bei der gleichzeitigen Zugabe von Kaliumbromid waren drei Derivate und unter Verwendung von Kaliumiodid sogar vier verschiedene Strobilurine nachzuweisen. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Strobilurine konnten aber nicht alle Substanzen isoliert und aufgeklärt werden. In vielen Fällen haben sich die Derivate zersetzt. Neben Strobilurin A wurden drei weitere Strobilurin-Derivate, sowie ein auffälliger Spot aufgereinigt, deren Strukturaufklärung nun folgen soll.

Ergosterol (23)

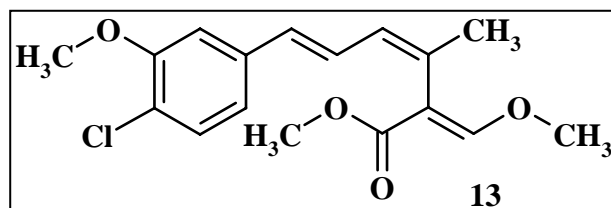
In allen Experimenten war ein stark UV-Löschender und mit Anis dunkel violett anfärbender Spot auf dem Dünnschichtchromatogramm zu sehen. Die Substanz konnte als weißer Feststoff isoliert werden. Sie löst sich gut in Chloroform und DMSO, jedoch kaum in Methanol. Der Schmelzpunkt beträgt 168 °C. Im EI-Massenspektrum konnte der Peak höchster Masse mit $m/z = 396$ bestimmt werden. Aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnten 44 Protonen und aus dem $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum 28 Kohlenstoffatome abgeleitet werden.



Die Anzahl der Doppelbindungsäquivalente wurde zu sieben bestimmt, von denen drei durch Doppelbindungen, ersichtlich in den NMR-Spektren, eingenommen werden. Demnach muss die Struktur vier Ringe aufweisen. Eine Struktursuche in Antibase und anschließender Literaturvergleich führte zu Ergosterol (23).

Strobilurin B (13)

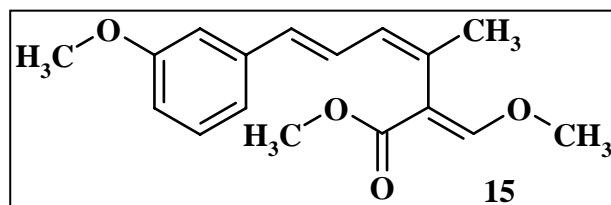
Das Experiment 4 führte zu 6,9 mg eines farblosen Öles. Die Substanz färbte mit Anisaldehyd/H₂SO₄ blau an. Dem EI-Massenspektrum konnte eine Masse von 322 g/mol entnommen werden. Ein weiterer Peak mit einer um 2 Masseneinheiten höhere Masse ($m/z = 324$), dessen Intensität 33 % entspricht, deutete auf ein Isotopensignal hin. In der Literatur ist $[M+2]^+ \geq 33\% M^+$ für Chlorisotopensignale beschrieben. Daraus folgte, dass in der Substanz ein Chlor-Atom enthalten ist.



Dem ¹H-NMR-Spektrum waren 17 Protonen zu entnehmen, von denen drei aromatischen Ursprungs sind. Die chemischen Verschiebungen zeigten eine hohe Ähnlichkeit zu **5**. Das ¹³C-NMR-Spektrum wies 17 Kohlenstoffatome aus, von denen fünf der Acrylateinheit zuzuordnen waren. Ein anschließender Abgleich mit Literaturdaten führte zu der Identifizierung von Strobilurin B (**13**).

Strobilurin H (15)

Insgesamt konnten 1.7 mg eines farblosen Öles aus Experiment 6 isoliert werden. Auch diese Substanz färbte mit Anisaldehyd/H₂SO₄ blau an. Im EI-Massenspektrum war der Peak höchster Masse bei $m/z = 288$. Neben dem für Strobilurin typischen Signal im ¹H-NMR-Spektrum konnte aufgrund der Aufspaltung der aromatischen Protonen eine 1,3-di- Substitution angenommen werden.



Zudem waren im Spektrum drei Methoxygruppen zu erkennen. Dem ¹³C-NMR-Spektrum konnten 17 Kohlenstoffatome entnommen werden. Hier waren die typischen Signale für die Acrylateinheit zu erkennen. Die Vermutung, dass es sich um Strobilurin H handelt, konnte durch Abgleich mit Literaturdaten bestätigt werden. Strobilurin H wurde bisher nur aus *Bolinea lutea* isoliert.⁷⁸

4-Deschlor-4-brom-strobilurin B (24)

Aus dem Experiment 5 konnten 6,3 mg eines farblosen Öles isoliert werden. In der Wärme färbte die Substanz mit Anisaldehyd/H₂SO₄ ebenfalls blau an. Aus dem EI-Massenspektrum war eine Masse von 366 g/mol sowie ein weiterer Peak mit $[M+2]^+ \geq 98 \% M^+$ (s. Abb. 29) zu entnehmen, was erneut auf ein Isotopensignal schließen lässt. Die Intensität ist ein Hinweis auf Brom. Das Isotopensignal ist auch bei den Fragmenten $m/z = 309$ und 229 zu sehen.

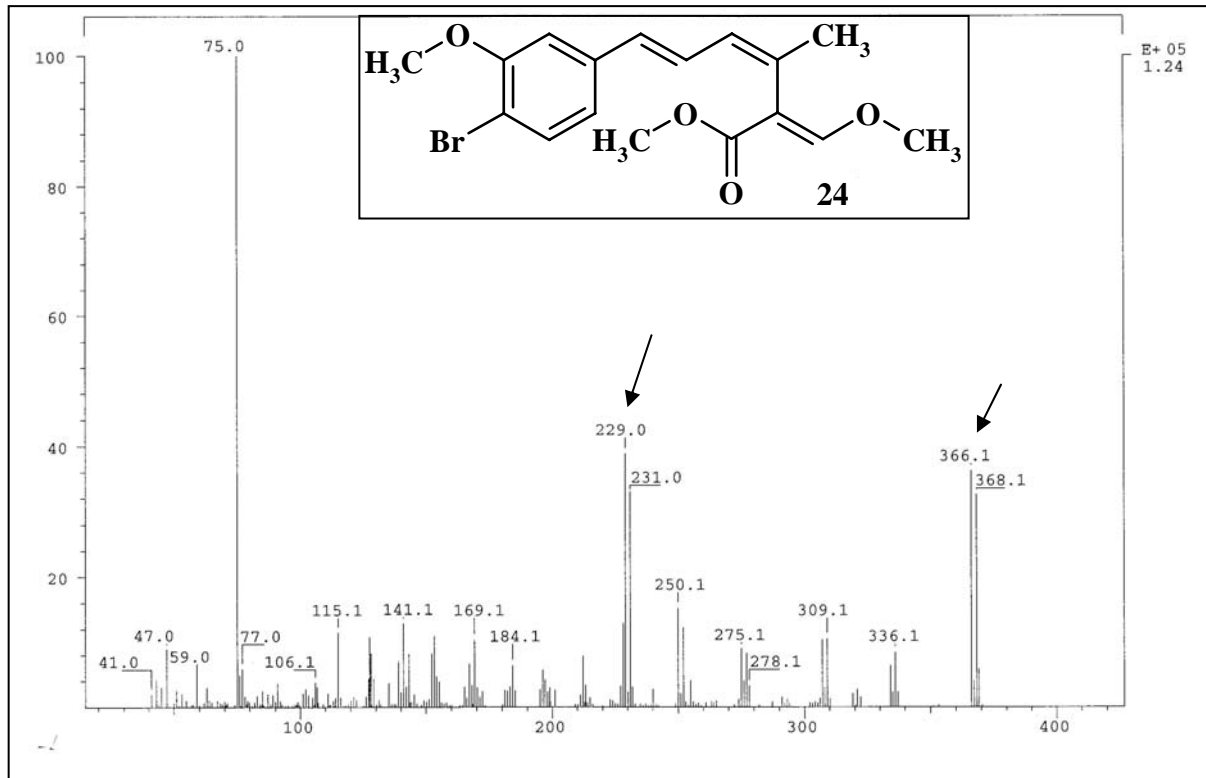


Abb. 29: EI-Massenspektrum von 24

Dem ¹H-NMR Spektrum waren 19 Protonen zu entnehmen. Von denen konnten neun drei Methoxygruppen und drei einer Methylgruppe zugeordnet werden. Auch das für Strobilurine typische Singulett für 12-H bei $\delta_H = 7.40$ konnte identifiziert werden. Der Tieffeldbereich ist gekennzeichnet durch die Signale dreier aromatischer sowie drei olefinischer Protonen. Das Aufspaltungsmuster der aromatischen Protonen impliziert eine 1,3,4-Substitution. Im Vergleich mit Strobilurin A waren zwei aromatische Protonensignale zu höherem Feld sowie das Proton 5-H zu tieferem Feld verschoben.

Dem ¹³C-NMR-Spektrum waren 17 Kohlenstoffatome zu entnehmen. Ausgehend von Strobilurin A kann die gleiche ungesättigte Seitenkette angenommen werden. Der ehemalige Phenylring wurde durch zwei Substituenten erweitert. Die chemische Verschiebung des Signals bei $\delta_C = 157.4$ zeigt eine aromatische Methoxygruppe an. Über die Signallage bei $\delta_C = 111.0$ und das Massenspektrum kann auf einen Bromsubstituenten geschlossen werden.

Über die mesomeren und induktiven Effekte des Halogens erklären sich auch die Hoch- und Tieffeldverschiebungen der aromatischen Protonen. Eine eindeutige Klärung der Position von Brom- und der Methoxysubstituent am Aromaten konnte durch Messung eines 2D-NOE-NMR-Spektrum vorgenommen werden (s. Abb. 30).

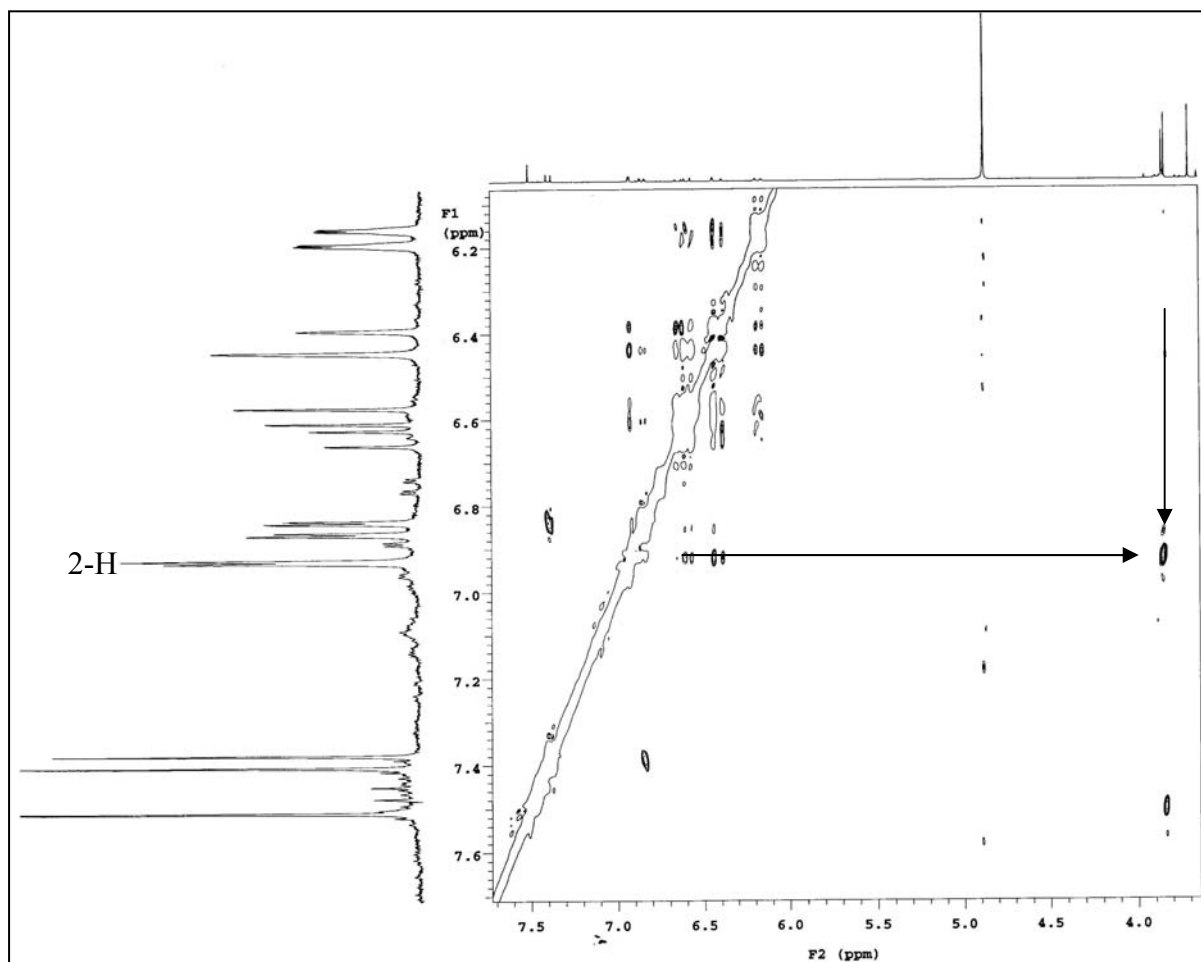


Abb. 30: NOE-Experiment zur Bestimmung der Position von Brom

Es konnte eine Kopplung über den Raum des bei $\delta_{\text{H}} = 6.90$ Singulett (2-H) auf die Protonen der Methoxygruppe ($\delta_{\text{H}} = 3.83$) beobachtet werden. Dies ist nur möglich, wenn die Methoxygruppe in ortho-Stellung zum 2-H steht. Daraus kann die 4-Position für Brom und die 3-Position für die Methoxygruppe als bewiesen angesehen werden. Bei dem isolierten Strobilurin-Derivat handelt es sich somit um 4-Dechloro-4-bromo-strobilurin B, das bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde.

4.3. Hypothetischer Verlauf der Halogenierung

Die aufgereinigten Strobilurin-Derivate unterscheiden sich nur in der Substitution am Aromaten, so dass für den Aufbau der Seitenkette der in Abbildung 8 postulierte Mechanismus anzunehmen ist.

Die Existenz der Metabolite **13** und **24** zeigt, dass die Halogenierung regiospezifisch, aber nicht substratspezifisch verläuft. Aufgrund der Regiospezifität kann eine Halogenase angenommen werden. In der Literatur ist für eine halogenaseabhängige Halogenierung ein hypothetischer Mechanismus beschrieben, der auch für die Biosynthese der halogenierten Strobilurin-Derivate herangezogen werden kann (Abb. 31).⁸⁵

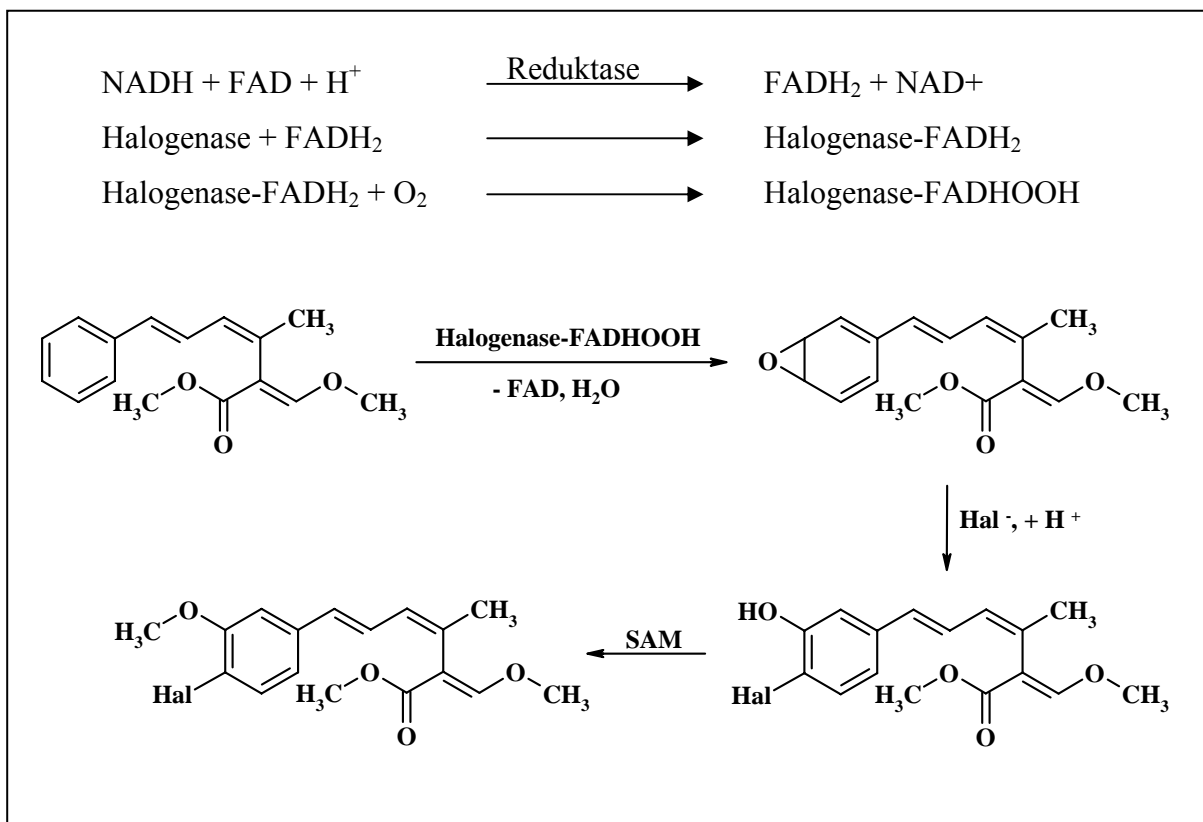


Abb. 31: Hypothetische Mechanismus zur Bildung halogener Strobilurine

Demnach wird FADH_2 über eine NADH-abhängige Reduktase gebildet und lagert sich an der Halogenase an. Anschließend wird FADH_2 mit Sauerstoff beladen und überträgt ein Sauerstoffatom auf das aromatische System, so dass es zu einer Epoxid-Bildung am Aromaten kommt und FAD und H_2O freigesetzt wird. Im folgenden Schritt wird das Epoxid durch nucleophilen Angriff des Halogens geöffnet und der Sauerstoff wird durch H^+ abgesättigt. Eine anschließende Methylierung führt zum Strobilurin-Derivat.

4.4. Diskussion der Ergebnisse

Mit Hilfe von Tandemfütterung ist es gelungen, die Strobilurin Derivate **13**, **15** und **24** zu gewinnen und in ihrer Struktur aufzuklären. Aus den Tandemfütterungen mit 4-Hydroxybenzoesäure und den Halogensalzen waren **13**, **15** und **24** eigentlich nicht zu erwarten, da die Methoxygruppe im Produkt an C-3 und nicht an C-4 steht. Hier müssen die Fütterungsexperimente zu einer Induktion eines anderen Biosyntheseweges geführt haben. Die eigentlich zu erwartenden Derivate bei Zufütterung von 4-Hydroxybenzoesäure und den Halogensalzen (Strobilurin X (**21**)-Derivate) waren nicht nachzuweisen. Bei Zufütterung von 4-Hydroxybenzoesäure und Kaliumfluorid sowie Kaliumchlorid wurden kaum nachweisbare Ausbeuten erhalten. Es ist zu vermuten, dass der Stamm sehr empfindlich auf die Zugabe dieser Halogensalze reagiert.

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den Experimenten mit 3-Hydroxybenzoesäure und den Halogensalzen. Zwar konnte aufgrund des Anfärbeverhaltens mit DC von der Bildung einiger an Strobilurin-Derivaten ausgegangen werden, jedoch waren die Ausbeuten zu gering, um eine Strukturaufklärung vorzunehmen.

5. Abschließende Betrachtung der Experimente

Bei den Fütterungen zur Untersuchung der Biosynthese von Strobilurin A konnte ein Einbau der direkten Vorläufer (Phenylalanin und Acetat) nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass der Stamm eine hohe Akzeptanz für direkte Vorläufer (Phenylalanin) aufweist, wohingegen die Akzeptanz substituierter Vorläufer (Fluorbenzoesäure und Hydroxybenzoesäure) eher gering zu sein scheint. So konnte in den konzentrationsabhängigen Experimenten bewiesen werden, dass 2-Fluorbenzoesäure als Vorläufer kaum akzeptiert wird. Die Akzeptanz ließ sich jedoch durch die Überführung in den SNAC-Thioester steigern.

Ausgehend von den Überlegungen zu den Tandemfütterungen wurde angenommen, dass es sich bei 3- bzw. 4-Hydroxybenzoesäure um direkte Vorläufer handelt. Die doch sehr geringen Ausbeuten bei den Experimenten mit 3-Hydroxybenzoesäure sprechen eher dafür, dass dies nicht der Fall ist. Einige Strobilurin-Derivate wurden aus den Tandemfütterungen mit 4-Hydroxybenzoesäure erhalten. Bei ihnen befand sich die Methoxygruppe jedoch in 3-Position und nicht, wie erwartet, in 4-Position. Hierdurch wurde offenbar der Biosyntheseweg aktiviert, der zu den halogenierten Strobilurinen der B-Reihe führte. Für die Biosynthese von Strobilurin B ist daher ein Biosynthesegen anzunehmen, das eine Domäne für eine

Halogenierung besitzt. Hierfür spricht, dass Strobilurin B erst nach Zugabe von 4-Hydroxybenzoesäure aus dem Stamm isoliert werden konnte.

Für Strobilurin X (**21**) kann im Gegensatz zu **5**, **13** und **15** 4-Hydroxybenzoesäure, die aus Tyrosin gebildet wird, als Startereinheit angenommen werden. In der Literatur ist für einige Basidiomyceten nachgewiesen worden, dass sie über eine Hydroxylase in der Lage sind, Phenylalanin in Tyrosin umzuwandeln.⁸⁶ Der Abbau zur 4-Hydroxybenzoesäure würde dann wie unter Kapitel III 3.5 beschrieben verlaufen. *Strobilurus tenacellus* besitzt anscheinend nicht die Fähigkeit, Phenylalanin in Tyrosin umzuwandeln oder besitzt nicht das Biosynthesegen so dass eine Produktion von Strobilurin X unterbleibt.

Zusammengefasst kann daher angenommen werden, dass eine Substratspezifität bezüglich der Startereinheit besteht und die Einführung anderer Startereinheiten erleichtert wird, wenn der Vorläufer als SNAC-Thioester zugefüttert wurde. Zudem ist anzunehmen, dass es sich bei 4-Hydroxybenzoesäure um einen Signalstoff handelt, der zur Aktivierung der Produktion von Strobilurin B (**13**) führt.

Zudem lassen die Ergebnisse vermuten, dass für die Biosynthese von Strobilurin A (**5**), Strobilurin B (**13**), Strobilurin H (**15**) und Strobilurin X (**21**) jeweils ein eigenes Biosynthesegen vorliegt.

6. Ausblick

Von Interesse wäre eine Untersuchung auf genetischer Ebene. Vor allem die Identifizierung des Gens, das für die Einführung des Halogens verantwortlich ist sowie das für die Methylierung. Gerade diese beiden Gene würden sich für die kombinatorische Biosynthese anbieten. Durch die Einführung von Methylgruppen können lipophilere Strukturen erzeugt werden, die eine bessere Membrangängigkeit aufweisen. Arbeiten, ein Methylierungs-Gen in Pilzen zu lokalisieren, wurden von R. Cox schon durchgeführt.⁷⁶ Mit der von ihm entwickelten Gen-Sonde sollte es gelingen, auch in diesem Stamm die Methyltransferase aufzuspüren.

Die Einführung von Halogenen kann dazu beitragen, dass eine biologische Aktivität herbeigeführt wird. Beim Rebeccamycin, eine Antitumor-Substanz, konnte gezeigt werden, dass der Naturstoff nur eine biologische Aktivität aufweist, wenn Chlor enthalten ist.⁸⁷

V. Biosynthese von Oudemansin A (7)

1. Allgemeines

Wie bereits erwähnt, gehören die Oudemansine auch zu der Substanzklasse der Methoxyacrylate. Oudemansin A (7) wurde erstmals von T. Anke et al. im Jahre 1979 aus dem Stamm *Oudemansiella mucidia* isoliert und die Struktur aufgeklärt.⁸⁸ Neben Oudemansin A wurde auch Strobilurin A aus dem Stamm isoliert. In den folgenden Jahren konnten weitere Oudemansine, die in Abbildung 32 dargestellt sind, aus verschiedenen Basidiomyceten Stämmen isoliert werden.⁵⁵

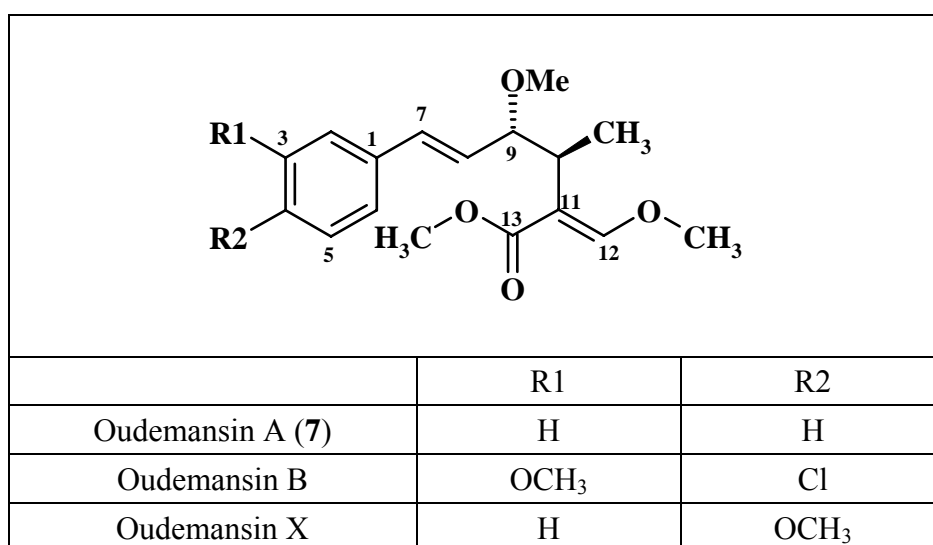


Abb. 32: Verschiedene Oudemansine

Von den verschiedenen Strobilurinen weist 22 die größte Ähnlichkeit mit 7 auf, wie aus Abbildung 33 deutlich wird.

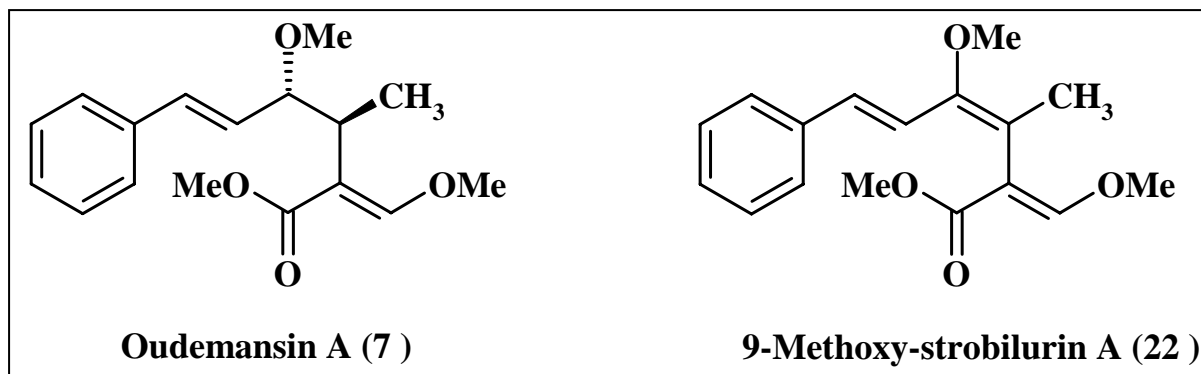


Abb. 33: Gegenüberstellung der Strukturen von 7 und 22

Bei allen Oudemansinen fehlt gegenüber den Strobilurinen die Doppelbindung zwischen C-9 und C-10, wodurch alle Oudemansine in der Seitenkette chiral werden. Außerdem weisen die Oudemansine aufgrund der Unterbrechung der Konjugation in der Seitenkette eine höhere Lichtstabilität als die Strobilurine auf. Dies ist ein wesentlicher Vorteil bei Experimenten zur Biosynthese und vorläufer-dirigierten Biosynthese. Die Strukturähnlichkeit der Oudemansine und Strobilurine lässt eine ähnliche Biosynthese vermuten, wobei Unterschiede in der Startereinheit bestehen können. Ähnlich wie bei den ersten Schritten der Biosynthese von Sorbicillacton A könnte der Aromatische Ring aus drei Acetat-Einheiten aufgebaut und der weitere Aufbau der Seitenkette mit Acetat vollzogen werden.⁸⁹ Es scheint jedoch wahrscheinlicher, dass es sich bei der Startereinheit auch um Benzoesäure oder um Zimtsäure handelt. Für die Ausbildung des pharmakophoren Acrylat-Strukturelements ist jedoch eine identische Umlagerung, wie beim Strobilurin A (**5**), zu vermuten.

Die Biosyntheseuntersuchungen sowie Versuche zur vorläufer-dirigierten Biosynthese am Oudemansin A (**7**) wurden am Stamm *Oudemansiella mucidia* vorgenommen.*³

2. Kultivierung und Strukturaufklärung

Ziel der ersten Kultivierungen war es, geeignete Fermentationsbedingungen sowie ein Aufarbeitungs- und Isolierungs-Schema zur Gewinnung von **7** zu entwickeln. Vorlage für die ersten Fermentationen waren frühere Angaben. Die Kultivierung erfolgte für die Vor- und Hauptkulturen in 250 ml Schüttelkolben mit drei Schikanen mit jeweils 100 mL M2a Medium bei 22°C und 120 rpm. Die Hauptkulturen wurden mit 10 mL einer sieben Tage alten Vorkultur angeimpft. Aufgrund der Erfahrung mit dem Strobilurin Produzenten wurde darauf geachtet, möglichst viel Mycel zum Animpfen der Hauptkulturen zu nehmen.

Zunächst wurde eine Kultivierung in 10 Schüttelkolben über 10 Tage durchgeführt. Zur Aufarbeitung wurden zunächst Mycel und Kulturfiltrat mittels Filtration getrennt. Das Mycel wurde wie unter (Kapitel II 2.2) beschrieben aufgearbeitet. Die Extraktion des Kulturfiltrates erfolgte zweimal mit je 500 mL Essigester. Anschließend wurden die Rohprodukte vom Mycel und Kulturfiltrat vereinigt und mittels Säulenchromatographie **7** isoliert (Abb. 34).

*³ Herrn Prof. Dr. T. Anke, Universität Kaiserslautern, Abteilung Biotechnologie am Fachbereich Biologie, danken wir für die Überlassung des Stammes.

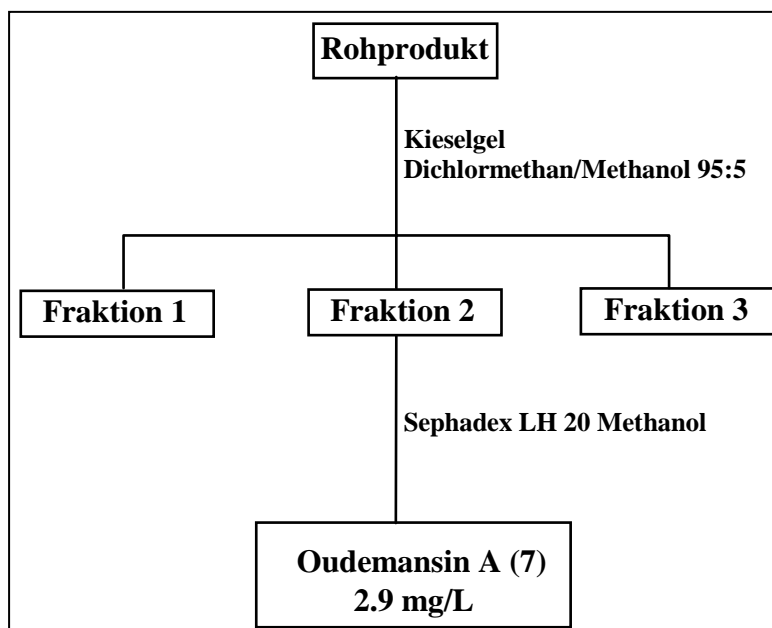


Abb. 34: Isolierungsschema von **7**

Die Identifizierung erfolgte mit Hilfe von Massen- und NMR-Spektren. Im EI-Massenspektrum konnte neben dem Molekülpeak mit $m/z = 290$ das für die Acrylateinheit typische Fragment mit $m/z = 75$ identifiziert werden. Außerdem deuten die Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum mit $\delta_{\text{C}} = 50.9, 61.3, 112.2, 159.47$ und 168.1 auf eine Acrylateinheit hin. Die dritte Methoxygruppe bei $\delta_{\text{C}} = 56.5$ ist an C-9 gebunden. Ein Abgleich aller erhaltenen Daten mit den Literaturwerten führte zu der Identifizierung von **7**.

3. Beiträge zur Biosynthese von Oudemansin A (7)

Ein Vergleich der Biosynthese von **5** und **7** ist nur dann sinnvoll, wenn dieselben Bedingungen für die Experimente gewählt werden. Die Fütterungen von Vorläufern sollte nach Möglichkeit zu der gleichen Zeit bzw. in den gleichen Zeiträumen der Fermentation erfolgen.

Um zu ermitteln, inwiefern dies möglich ist, wurde zunächst der Produktionsbeginn von **7** durch die Aufnahme einer Fermentationskurve bestimmt. Hierzu erfolgte eine Fermentation über 10 Tage in deren Verlauf im Intervall von 24 Stunden jeweils zwei Kolben, wie unter Kapitel III 3.2 beschrieben, aufgearbeitet wurden. Die erhaltenen Rohextrakte wurden jeweils in Methanol/Wasser (1:1) und dünnschichtchromatographisch untersucht. Demnach setzt die Produktion von Oudemansin A (**7**), wie bei Strobilurin A (**5**), zwischen dem zweiten und dritten Tag der Fermentation ein. Somit waren die Voraussetzungen gegeben, die Fütterungsexperimente wie bei *Strobilurus tenacellus*, durchzuführen. Für den Vergleich mit **5** genügen jedoch die Fütterungen von [1-¹³C]Acetat, [1,2-¹³C₂]Acetat und den verschiedenen Phenylalaninen jeweils zum frühen Zeitpunkt der Fermentation. Kultiviert wurde jeweils im 1 L Maßstab und die Aufarbeitung aller Experimente erfolgte nach Abb. 34.

3.1. Experimente zum Aufbau der Seitenkette

Fütterung von [1-¹³C]Acetat

Nach Aufreinigung wurden 2.9 mg an **7** erhalten. Es konnten ein Einbau an C-9, C-11 und C-13 ermittelt werden. Dies entspricht genau dem Einbaumuster von Strobilurin A (**5**). Auch die Aufspaltung zum Dublett ($^1J_{C,C} = 78$ Hz) von C-11 und C-13 konnte dem ¹³C-NMR-Spektrum entnommen werden. Die Einbauraten sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die Berechnung für die Kohlenstoffatome 11 und 13 wurde wie beim entsprechenden Strobilurin-Experiment vorgenommen (siehe Kapitel III 3.3).

C-Atom	¹³ C-NMR δ _C (ppm)	[1- ¹³ C]Acetat
9	85.03	15.64
11	112.23	20.08
13	168.19	13.86

Tabelle 10: Einbauraten in **7** nach [1-¹³C]Acetat Fütterung

Fütterung von [1,2-¹³C₂]Acetat

Aus diesem Experiment wurden 3.1 mg an **7** erhalten. Es konnte der erwartete Einbau an C-8, C-9, C-10, C-11, C-12 und C-13 das ¹³C-NMR-Experiment bestätigt werden. Die ¹J_{C,C} Kopplungen sind in Tabelle 11 aufgeführt.

C-Atom	¹³ C-NMR δ _C (ppm)	¹ J _{C,C} Kopplungen [Hz]
8	129.54	$J_{8,9} = 49$
9	85.03	$J_{9,8} = 49, J_{9,10} = 88$
10	35.60	$J_{10,9} = 88, J_{10,11} = 48$
11	112.23	$J_{11,10} = 48, J_{11,12} = 82, J_{11,13} = 78$
12	159.47	$J_{12,11} = 82$
13	168.19	$J_{13,11} = 78$

Tabelle 11: ¹J_{C,C} Kopplungen im ¹³C-NMR-Experiment von **7** nach Fütterung von [1,2-¹³C₂]Acetat

Ferner war eine Fernkopplung von ²J = 6 Hz zwischen C-12 und C-13 sichtbar, so dass auch hier wie bei **5** von einer ehemals intakten Acetat-Einheit ausgegangen werden kann.

3.2. Experimente zur Klärung der Startereinheit

Neben den Ergebnissen für den Aufbau der Seitenkette und dem Fehlen einer Acetatmarkierung im Aromaten sollte die Startereinheit bei **7** aus Benzoesäure oder Zimtsäure stammen. Hier sollten Fütterungen mit [D₈]Phenylalanin, [3-¹³C]Phenylalanin und [2,3-¹³C₂]Phenylalanin Klarheit bringen.

Fütterung von [D₈]Phenylalanin

Aus dem Experiment wurden 4.2 mg an **7** erhalten. Im EI-Massenspektrum konnte für das Molekülion m/z = 290 (0.7 %) kein M+5 Peak ermittelt werden. Lediglich für das Fragment m/z = 152 war ein um fünf Masseneinheiten höherer Peak gefunden worden. Das ¹H-NMR-Spektrum ergab auch keine genaueren Hinweise auf einen Einbau. Vielmehr war ein doppelter Signalsatz zu erkennen, der auf das Vorliegen eines Stereoisomers deutet. Eine deutliche Abschwächung der aromatischen Protonensignale war nicht zu erkennen, so dass eine Berechnung des Einbaus unterblieb.

Fütterung von [3-¹³C]Phenylalanin

Insgesamt wurden aus diesem Experiment 3.4 mg an **7** erhalten. Aus dem ¹³C-NMR-Experiment war ein spezifischer Einbau für C-7 von 18.59 % zu ermitteln. Zudem waren ¹J_{C,¹³C} Kopplungen zu erkennen, die aufgrund der niedrigen Intensität auf eine Kopplung zwischen dem angereicherten Kern (C-7) und den natürlich angereicherten Kernen (C-1, C-8) zurückzuführen sind. Die Kopplungskonstante beträgt für ¹J_{C-7,C-1} = 55,5 Hz und für ¹J_{C-7,C-8} = 72,1 Hz (s. Abb. 35).

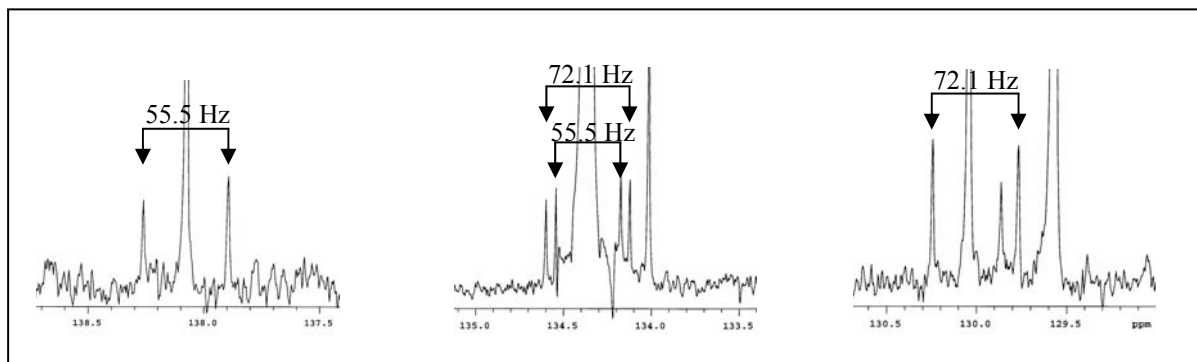


Abb. 35: ¹J_{C,C} Kopplungen im ¹³C-NMR-Spektrum von **7** nach Fütterung von [3-¹³C]Phenylalanin

Die hohe Anreicherung von ¹³C-Isotopen im Molekül durch den Vorläufer führen zu den beobachteten Kopplungen mit den benachbarten Kohlenstoffatomen, die einen natürlichen ¹³C-Isotopenanteil von 1,1 % aufweisen. Nur bei hohem Einbau eines hoch angereicherten Vorläufers werden diese statistischen Kopplungen sichtbar, da die Signale der Satelliten um den Faktor 200 geringer sind. Diese statistischen Kopplungen unterscheiden sich massiv von denen bei den Acetat-Fütterungen. Auf den hohen Einbau ist auch die im ¹H-NMR-Spektrum zu sehende ¹J_{CH} Kopplung zurückzuführen. Das Signal bei δ_H = 6.42 weist eine Kopplung von 150 Hz auf (s. Abb.33). ¹J_{CH} Kopplung werden in der Literatur mit Werten zwischen 100 – 280 Hz angegeben.⁹⁰ Solche Kopplungen waren bei Strobilurin A nicht zu erkennen.

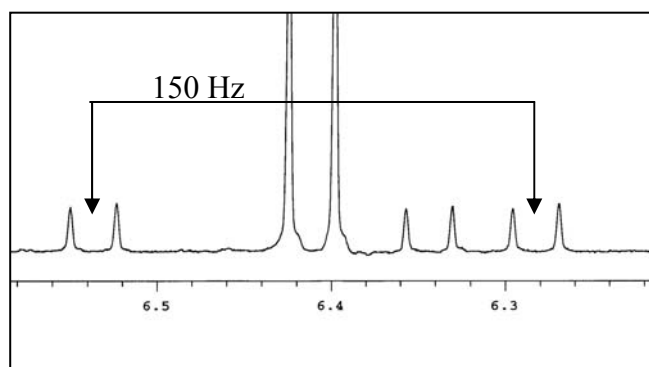


Abb. 33: ¹J_{CH} Kopplung im ¹H-NMR Experiment aufgrund hoher Anreicherung

Fütterung von [2,3-¹³C₂]Phenylalanin

Die Unterscheidung, ob Benzoesäure oder Zimtsäure als Startereinheit genutzt wird, war anhand der beiden zuvor durchgeführten Experimente nicht möglich. Vor allem das Experiment mit [D₈]Phenylalanin ließ keine Beweisführung zu. Eine Fütterung von [2,3-¹³C₂]Phenylalanin sollte jedoch eine Aussage erlauben.

Die Ausbeute an **7** betrug 3.5 mg. Im ¹³C-NMR-Spektrum war eine Aufspaltung zum Dublett für C-7 und C-8 nicht zu beobachten, was der Fall gewesen wäre, wenn Phenylalanin zu Zimtsäure werden würde. Es konnte jedoch ein Einbau von 10.18 % für C-7 berechnet werden.

Sowohl im Protonenspektrum als auch im ¹³C-NMR-Spektrum konnten wieder die C-H Kopplung mit 156 Hz und die beiden ¹J_{C,C} Kopplungen mit 55,7 Hz für C-1/C-7 und 72 Hz zwischen C-7/C-8 bestimmt werden. Dies ist umso erstaunlicher, da der Vorläufer nur zu 50 % angereichert war.

3.3. Vergleich der Biosynthese von Oudemansin A (**7**) und Strobilurin A (**5**)

Das Einbaumuster aus den Experimenten zu der Biosynthese von **7** ist in Abbildung 33 dem von **5** gegenübergestellt.

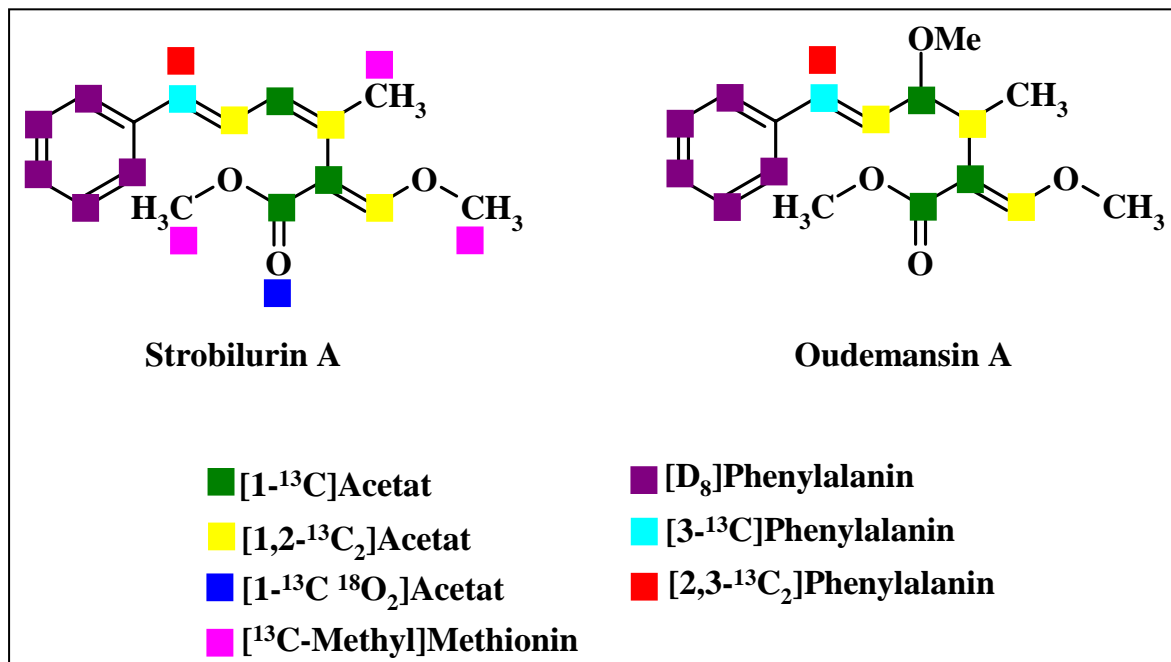


Abb. 33: Einbaumuster von **5** und **7** ermittelt aus den durchgeführten Fütterungsexperimente

Demnach wird die Grundstruktur bei beiden Naturstoffen aus den gleichen Bausteinen aufgebaut. Der Verlauf der Biosynthese von **7** und **5** ist identisch (siehe Kapitel III 2.2 Abb. 8 und 3.5 Abb.15).

Die nicht vorhandene Doppelbindung zwischen C-9 und C-10 ist somit auf das Fehlen einer Dehydrogenase zurückzuführen. Die Aufspaltung zum deutlich sichtbaren Dublett zwischen C-11 und C-13 nach der [1-¹³C]Acetat Fütterung sowie die Kopplung von $^2J = 6$ Hz zwischen C-12 und C-13 nach der [1,2-¹³C₂]Acetat Fütterung deutet auf einen gleichen Umlagerungsprozess hin (siehe Kapitel III 3.5 Abb. 15) wie er für Strobilurin A (**5**) postuliert wurde. Aufgrund der deutlichen Aufspaltung zum Dublett zwischen C-11 und C-13 ($^1J = 78$ Hz), die sich von den anderen statistischen Kopplungen deutlich unterscheidet, ist auch hier von einer Acetat-Pool-Bildung auszugehen. Die Herkunft der Methylgruppen dürfte ebenfalls, wie beim **5**, Methionin sein.

4. Vorläufer-dirigierte Biosynthese

4.1. Fütterungsexperimente

Die Versuche zur vorläufer-dirigierten Biosynthese sollten in Analogie zu den Experimenten mit dem Strobilurinproduzenten erfolgen. In einem ersten Experiment wurden 4-Hydroxybenzoesäure und Kaliumbromid während der Fermentation zugegeben. Zu erwarten wären Derivate des Oudemansins analog zu den Strobilurin-Derivaten aus den Tandemfütterungen (siehe Kapitel IV 4.). Die Konzentrationen, Zugabezeiten und Fermentationszeit wurden entsprechend für diese Fütterung übernommen. Nach Aufarbeitung konnten weder Oudemansin A (**7**) noch andere Derivate nachgewiesen werden. Die erhoffte Induktion von anderen Biosynthesewegen blieb somit aus. Das gleiche Bild zeigte sich bei dem parallel durchgeführten Experiment mit 2-Fluorbenzoesäure. In beiden Experimenten konnten lediglich die Vorläufer dünnschichtchromatographisch im Kulturfiltrat nachgewiesen werden. Auf weitere Versuche zur vorläufer-dirigierten Biosynthese wurde daher vorerst verzichtet.

4.2. Diskussion

Die in dieser Arbeit verwendeten Basidiomyceten Stämme haben unterschiedliche Eigenschaften, die während der Kultivierung sichtbar wurden. Im Gegensatz zu *Strobilurus tenacellus*, der Strobilurin A (**5**) im Mycel speichert, wird **7** von *Oudemansiella mucidia* an das Kulturfiltrat abgegeben. Im Oudemansin Produzenten muss daher ein Efflux-System vorhanden sein, das den gebildeten Metaboliten ausschleust.

Die gefütterten Vorläufer 4-Hydroxybenzoesäure und 2-Fluorbenzoesäure wurden vom Oudemansin-Produzenten nicht aufgenommen, deshalb bleiben diese im Kulturfiltrat. Dies kann eine fehlende Membrangängigkeit der Vorläufer signalisieren. Der Versuch, die

Vorläufer in die SNAC-Thioester zu überführen und dann zu füttern, steht noch aus. Zum einen, um die Membrangängigkeit zu erhöhen, und zum anderen, eine bessere Akzeptanz des Vorläufers durch die PKS zu erreichen. Die beobachtete Konzentrationsabhängigkeit bei solchen Fütterungen (siehe Kapitel IV 3.3) müsste auch bei *Oudemansiella mucidia* erst überprüft werden.

5. Ausblick

Die höhere Lichtstabilität von **7**, verglichen mit **5**, macht *Oudemansiella mucidia* Versuchen zur Aufklärung der Polyketid-Acrylat-Umlagerung attraktiv. Zudem ist die Biosynthese der beiden untersuchten Metabolite in den Gründzügen identisch, so dass die erhaltenen Ergebnisse übertragbar sind. Versuche mit $^{18}\text{O}_2$ und $^2\text{H}_2\text{O}$ könnten die postulierte Umlagerung untermauern (siehe Kapitel III 3.5). Für die $^{18}\text{O}_2$ Fütterung müssten zunächst umfangreiche Arbeiten zur Optimierung unter Sauerstoffatmosphäre durchgeführt werden. Des Weiteren gilt es unter diesen Bedingungen den Produktionszeitpunkt erneut zu bestimmen. Außerdem lassen sich aus diesem Experiment indirekt Hinweise auf die wahrscheinlich fehlende Dehydrogenase erhalten. Fehlt diese Funktion des Enzymkomplexes, sollte das Sauerstoffatom an C-9 aus Acetat stammen. Somit dürfte bei einer Fütterung mit markiertem Sauerstoff kein Isotopenshift an diesem Kohlenstoffatom zu beobachten sein. Ergänzend könnten Experimente mit ^{18}O markiertem Acetat die Vermutung bestätigen.

Zudem erscheint es möglich, Intermediate, die Rückschlüsse auf die Biosynthese erlauben, aus *Oudemansiella mucidia* zu isolieren. Aufgrund der Beobachtung, dass das vermutete Intermediat bei Zugabe von Phenylalanin auftritt, sollte dem Nährmedium von Beginn an Phenylalanin zugegeben werden. Ferner sollte versucht werden, ob der Stamm einer Kultivierung im Fermenter zugänglicher ist als *Strobilurus tenacellus*. Dies wäre auch für weitere Versuche zur vorläufer-dirigierten Biosynthese von Interesse. Zuerst sollte für diese Experimente in kleinem Maßstab eine Studie über den Zusammenhang von der zugegebenen Konzentration des Vorläufers in Bezug auf die Ausbeute der Derivate durchgeführt werden. Auch die verschiedenen Tandemfütterungen mit den Halogensalzen und den SNAC-Thioestern von 3- bzw. 4-Hydroxy-benzoesäure können zu neuen Oudemansin-Derivaten führen.

VI. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Vergleichende Biosynthese von Strobilurin A (5) und Oudemansin A (7)

1. Die in der Literatur bekannte Untersuchung zur Biosynthese von Strobilurin A (5) wurden zusammengetragen und diskutiert.
2. Die Basidiomyceten-Stämme *Strobilurus tenacellus* und *Oudemansiella mucidia* wurden kultiviert und die Fermentations- und Aufarbeitungsbedingungen bezüglich der Gewinnung von Strobilurin A (5) und Oudemansin A (7) optimiert.
3. Fütterungsexperimente mit den Vorläufern $[1-^{13}\text{C}]$ Acetat und $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat zeigten für 5 und 7 ein identisches Einbaumuster. Die Seitenkette wird aus drei Acetat-Einheiten aufgebaut. Die Vermutung, dass in der Acrylateinheit eine C_1 -Einheit unbekannter Herkunft steht konnte widerlegt werden.
4. Durch Fütterung von $[1-^{13}\text{C}, ^{18}\text{O}_2]$ Acetat konnte die Herkunft des Carbonylsauerstoffs an C-13 von 5 bewiesen werden. Bei diesem Befund und aufgrund der C,C-Kopplungen nach Fütterung der ^{13}C -markierten Acetate wurde eine Polyketid/Acrylat-Umlagerung postuliert, die auch Ergebnisse aus der Literatur berücksichtigt.
5. Aus den Ergebnissen der Fütterungsexperimente mit *Oudemansiella mucidia* kann für die Bildung von 7 eine analoge Umlagerung angenommen werden.
6. Die Fütterung an $[1-^{13}\text{C}]$ Acetat zu verschiedenen Zeiten in die Kulturen des Strobilurin-Produzenten zeigten stark unterschiedliche Einbauraten. Aus diesen Experimenten wurde die Acetat-Pool-Hypothese entwickelt. Demnach kommt es zu einer Art Speicherung von Acetat im Organismus. Wenn man das markierte Acetat erst spät füttert, sinken die Einbauraten dramatisch und führen noch zu eindeutigen Ergebnissen.

7. Experimente mit [D₈]-, [3-¹³C]- und [2,3-¹³C₂]Phenylalanin führten bei beiden Stämme zu der Identifizierung von Benzoesäure als Startereinheit. Für den Abbau von Phenylalanin zur Benzoesäure wird der für Pflanzen, Pilze und Bakterien in der Literatur beschriebene Weg angenommen.
8. Die Biosynthesewege für **5** und **7** sind praktisch identisch. Unterschiede treten wahrscheinlich nur in dem zweiten PKS Modul auf, dass im Fall des Oudemansins eine Dehydrogenase Domäne fehlt, weshalb keine Doppelbindung entsteht.

2. Vorläufer-dirigierte Biosynthese an Basidiomyceten Stämmen

1. Regioisomere Fluorbenzoesäure-thioester und Fluorzimtsäure-thioester wurden zwischen Tag 2 und 3 bzw. zwischen Tag 5 und 6 Tag der Fermentation zugegeben und sollten die Startereinheit variieren. Unter Verwendung der semip-räparativen HPLC gelang die Isolierung von 2-Fluorstrobilurin A (**16**), 3-Fluorstrobilurin A (**12**) und 4-Fluorstrobilurin A (**17**) als Reinsubstanzen. Zudem konnte über das Ausbeute-Verhältnis von Strobilurin A zu den Fluorderivaten auf Benzoesäure als Startereinheit geschlossen werden.
2. Durch die Überführung von 2-Fluorbenzoesäure in den SNAC-Thioester konnte die Ausbeute an **16** bis 1.1 mg/L gesteigert werden. Die maximale verträgliche Fütterungskonzentration lag bei 3 mmol/L
3. In einer weiteren Versuchsreihe mit freier 2-Fluorbenzoesäure war die Ausbeute bei allen gefütterten Konzentrationen wesentlich geringer.
4. Zur Variation der Startereinheit wurde auch Nicotinsäure während der Fermentation zugegeben. Die isolierten Metabolite hatten sich zum größten Teil zersetzt. Aus den ¹H-NMR-Daten eines Produktgemisches wird jedoch die Akzeptanz von Nicotinsäure als Startereinheit angezeigt.
5. Aus den Tandemexperimenten mit 3-Hydroxybenzoesäure und verschiedenen Halogensalzen konnten Strobilurin-Derivate in nicht ausreichenden Mengen isoliert werden, so dass keine Strukturaufklärung möglich war.

-
6. Neue Strobilurin-Derivate aus den Tandemfütterungen mit 4-Hydroxybenzoesäure und den verschiedenen Halogensalzen wurden nicht erhalten. Es ist jedoch zur Induktion eines anderen Biosynthesewegs gekommen. Als Reinsubstanz fiel Strobilurin H (**15**) an, das bisher nicht aus *Strobilurus tenacellus* isoliert wurde, sowie das neue Derivat 4-Deschlor-4-brom-strobilurin B (**24**). Die Stellung des Halogens und der Methoxygruppe am Aromaten wurde mit einem 2D-NOSY-NMR-Experiment bewiesen. Zudem konnte erstmals Strobilurin B aus dem Stamm isoliert werden, das offenbar zum natürlichen Metabolitenspektrum des Stammes gehört.

 7. Die Isolierung von **13** und **24** führte zur Ausarbeitung eines hypothetischen Halogenierungsmechanismus über eine FADH₂-abhängige Halogenase.

 8. Beide bearbeitende Stämme weisen Unterschiede in ihrem Wachstum sowie in der Aufnahme von Vorläufern auf. Unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführte Tandemexperimente an *Oudemansiella mucidia* verliefen bislang nicht erfolgreich.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Allgemeines

1. Instrumentelle Analytik

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. **ESI-MS:** *Finnigan* LC-Q. **HR-ESI-MS:** *Bruker* Apex-Q III, 7 Tesla.

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

Elektronenspektren (UV): Alle Elektronenspektren wurden mit einem Spektrometer der Fa. *Varian* Modell Cary 3E gemessen. Die Wellenlänge λ ist in [nm] angegeben, der molare Extinktionskoeffizient ε hat die Dimension [$1000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$], sh = Schulter; Methanol/HCl bzw. Methanol/NaOH: Zu 2 ml methanolischer Lösung wurde jeweils ein Tropfen 1 M HCl bzw. 1 M NaOH gegeben. Der Extinktionskoeffizient berechnet sich wie folgt:

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

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 [$10^{-1} \text{ grad cm}^2 \text{ mol}^{-1}$] angegeben.

$^1\text{H-NMR-Spektren}$: *Varian* Inova-600 (600 MHz), *Varian* Inova-500 (500 MHz), *Varian* Mercury-300 (300 MHz), *Varian* Unity-300 (300 MHz), *Bruker* AMX 300 (300 MHz). Chemische Verschiebungen in δ -Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard; Kopplungskonstanten (J) in Hertz (Hz).

Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett vom Dublett, ddd = Dublett vom Dublett vom Dublett, dddd = Dublett vom Dublett vom Dublett vom Dublett, dt = Dublett vom Triplet, t = Triplet, td = Triplet vom Dublett, tt = Triplet vom Triplet

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

¹³C-NMR-Spektren: *Varian Inova-600* (150.8 MHz), *Varian Inova-500* (125.7 MHz), *Varian Mercury-300* (75.5 MHz), *Varian Unity-300* (75.5 MHz), *Bruker AMX-300* (75.5 MHz). Chemische Verschiebungen in δ -Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard.

APT (**A**ttached **P**roton **T**est): CH und CH₃ stehen nach oben, C und CH₂ stehen nach unten.

¹³C-¹H-Multiplizitäten sind aus HSQC-Experimenten in Verbindung mit APT-Experimenten ableitbar. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplet, q = Quartett.

2D-NMR-Spektren: ¹H,¹H-COSY (¹H,¹H-Correlated Spectroscopy), **HSQC** (**H**eteronuclear **S**ingular **Q**uantum **C**oherence), **HMBC** (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**onnectivity), **HMQC** (**H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**oherence), **NOESY** (**N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscopy).

2. Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC): *Merck* HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄: 10 x 10 cm, Schichtdicke 0.2 mm; *Merck* DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄: 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm; *Merck* DC-Alufolien RP-18 F_{254s}: 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm. Angegeben sind R_f-Werte (Laufhöhe relativ zur Laufmittelfront).

Ermittlung von R_f-Werten: Zur Bestimmung der R_f-Werte wurden 0.5 mg der zu untersuchenden Reinsubstanz in 1 mL Lösungsmittel (p.a.) gelöst. Die Lösungen wurden auf Nano-DC-Platten aufgetragen, so dass ein Vorlauf von 5 cm eingehalten wurde. Die Gesamtlaufstrecke des Laufmittels betrug 15 cm. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht (254 und 366 nm) und mittels der unten beschriebenen Anfärbemethoden.

Sprühreagenzien: Nach *Merck*, Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie.

Die DC-Platten wurden nach dem Ansprühen auf ca. 120 °C erwärmt.

Anisaldehyd (Anis, Nr. 21): 1.0 mL Anisaldehyd wird in eine Lösung aus 85 mL Methanol, 10 mL Eisessig und 5 mL konz. Schwefelsäure gegeben.

Ehrlichs Reagenz (Ehrlich, Nr. 91): 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird in einer Mischung von 25 mL Salzsäure (36 %) und 75 mL Methanol gelöst.

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

Vanillin-Schwefelsäure (Vanillin, Nr. 322): 1 g Vanillin wird in 100 mL konz. Schwefelsäure gegeben.

Säulen- und Gelchromatographie: ICN Kieselgel 60 (KG), 32 – 63 µm, Fluka Sephadex® LH-20.

Adsorberharze: Serva Amberlite® XAD-2.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC):

LC-MS: Pumpe: Flux Instruments Rheos 4000; Autosampler: Jasco AS-851 (0 – 100 µL variable Aufgabenschleife); UV-Detektor: Linear UVIS-205; Massendetektor: Finnigan LC-Q; Entgaser: Flux Instruments ERC-3415α; Steuersoftware HPLC: Flux Instruments Janeiro; Datensystem: Finnigan Xcalibur; Vorsäule: Grom Supersphere 100 RP-18 endcapped, 4 µm, 10 x 2 mm; Säule: Jasco Kromasil 100 C18, 5µm, 250 x 4 mm
Programm: isokratisch 60 % MeOH und 40 % H₂O; Flussrate: 300 µL/min; UV-Detektion: 254 nm, Massendetektion: positive und negative Ionen.

Analytische HPLC: Pumpe: Kontron P 322 System; Autosampler: Kontron Sa 360; Detektor: Kontron Dioden Array Detektor 440; Mischkammer: Kontron HPLC 360; Software: Kontron Kroma System 2000 Version 1.60; analytische Aufgabenschleife: 20 µL; Säule Jasco Kromasil 100 C18, 5 µm, 250 x 4 mm.

Programm: isokratisch 60 % MeOH und 40 % H₂O;
Flussrate: 2.5 mL/min; UV-Detektion: 254 nm.

Semipräparative HPLC: Pumpe: Jasco PU-1587; UV-Detektor: Jasco UV 1575; manuelles Probenaufgäbeventil: Rheodyne mit 2.0 mL Aufgabenschleife; Chromatographiesoftware: Jasco Borwin; Steuersoftware: Jasco Borwin HSS-1500; Säule: Jasco Kromasil 100 C18, 5 µm, 250 x 8 mm.

Programm: isokratisch 60 % MeOH und 40 % H₂O;
Flussrate: 2.5 mL/min; UV-Detektion: 254 nm.

Gas Chromatography (GC):

GC-MS: Gaschromatograph: ThermoFinnigan Trace GC; Massendetektor: ThermoFinnigan Trace MS (EI-Ionisierung); Autosampler: ThermoFinnigan AS2000; Datensystem: ThermoFinnigan Xcalibur; Säule: J & W DB-5MS, 25 m x 0.25 mm, Filmdicke 0.25 µm.

Programm: 1 min bei 150°C, von 150°C auf 350°C in 10 min, 5 min bei 200°C; Flussrate Trägergas: 10 mL/min Helium; Split Flow: mL 50/min.

Lösungsmittel: Die Lösungsmittel für die Säulenchromatographie wurden zuvor destilliert. Für die HPLC wurden nur analysenreine Lösungsmittel und bi-distilliertes Wasser verwendet. Lösungsmittel für die HPLC wurden im Ultraschallbad (10 min) und anschließend durch Durchleiten von Helium (10 min) entgast.

3. Mikrobiologische Methoden

Nährmedienbestandteile: Malzextrakt und D-Glucose wurden von der Fa. *Merck* bezogen. Hefeextrakt stammt von der Fa. *Oxoid*, D(-)-Mannit von der Fa. *Riedel-deHaën*, Hafermehl wurde von der Firma Holo Hafergold bezogen, Sojamehl fettarm von der Fa. *Henselwerk GmbH* und BiTek Agar von der Fa. *Difco*.

Nährmedien: Für alle Nährmedien wurde demineralisiertes Wasser verwendet und der pH-Wert vor dem Autoklavieren mit 0.5 N NaOH bzw. 0.5 N HCl eingestellt. Die Nährmedien wurden durch Autoklavieren (feuchte Hitze, 121 °C, 1 bar Überdruck, 30 min) sterilisiert.

M2: Malzextrakt 10 g/L, Hefeextrakt 4 g/L, Glucose 4 g/L.

M2a: Malzextrakt 10 g/L, Hefeextrakt 4 g/L, Glucose 4 g/L, pH = 4.7;
für die Stammhaltung Zusatz von Agar 20 g/L.

NL 1158: 20 g/L Malzextrakt, 10 g/L Glucose, 2 g/L Hefeextrakt, 0.5 g/L Ammoniumhydrogenphosphat, pH = 6.5.

NL E2: 20 g/L Glucose, 20 g/L Hafermehl, 20 g/L entfettetes Sojamehl;
für die Stammhaltung Zusatz von Agar 20 g/L.

NL G20: 20 g/L Glycerin, 10 g/L Malzextrakt, 4 g/L Hefeextrakt.

NL 1405: 30 g/L Glucose, 3 g/L Natriumnitrat, 1 g/L Dikaliumhydrogenphosphat, 0.5 g/L Magnesiumsulfat, 0.5 g/L Kaliumchlorid, 0.01 g/L Eisensulfat, pH = 7.3.

Isotopenmarkierte Verbindungen: [1-¹³C]Acetat, [1,2-¹³C₂]Acetat, [3-¹³C]Phenylalanin, [D₈]Phenylalanin und [Methyl-¹³C]Methionin wurden von der Fa. *Cambridge Isotope Lab. (CIL)* bezogen. Alle Verbindungen waren zu 99 % mit markiertem Kohlenstoff angereichert. Von der Fa. *Campro* wurde [2,3-¹³C₂]Phenylalanin bezogen. Die Anreicherung mit markiertem Kohlenstoff betrug 50 %.

Schüttler und Fermenter: *Braun* Inkubationsschüttelschrank BS4, *Braun* Certomat RM, *Braun* Biostat B (5 L), *Braun* Biostat E (10 L), 10 L-Airlift-Fermenter, gebaut: *Uni Dortmund*, *Fischer & Porter* Gasflowmeter (45711M), *The Analytical Development Co Ltd.* CO₂-Analysator, *Ingold* O₂-Elektrode.

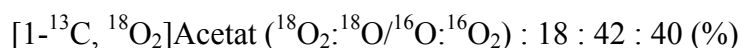
4. Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)

AAV1: Darstellung von 2-Fluor-N-acetylcysteamin-thioester

Alle Reaktionen wurden mit trockenen destillierten Lösungsmitteln und demineralisiertes Wasser durchgeführt. 2-Fluorbenzoesäure (1.00 eq) wurde in trockenem Dichlormethan gelöst und *N*-Acetylcysteamin (1.20 eq) hinzugefügt. Anschließend wurde *N*'-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimid Hydrochlorid (1.18 eq) sowie eine geringe Menge an DMAP als Katalysator zugegeben und 21 – 24 h bei 25 °C gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte zunächst durch Ausschütteln mit Dichlormethan/Wasser 1:1. Die wässrige Phase wurde nochmals mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Alle organischen Phasen wurden vereinigt, nacheinander mit gesättigten Ammoniumchlorid und Natriumchloridlösungen gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Säulenchromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol 9:1) ergab die Titelverbindung mit 88 % Ausbeute als weißes Pulver.

AAV 2: Austausch von ¹⁶O gegen ¹⁸O in Acetat

Zum Austausch von ¹⁶O gegen ¹⁸O löste man 900 mg [1-¹³C]markiertes Acetat in 8 mL H₂¹⁸O 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 H₂¹⁸O wurde destilliert. Das erhaltene ¹⁸O₂-markierte Acetat konnte direkt für Fütterungen eingesetzt werden. Das ¹⁸O/¹⁶O-Verhältnis konnte aus den Signalintensitäten im ¹³C-NMR-Spektrum des Vorläufers ermittelt werden. Es ergab sich folgende Austauschrate:



II. Arbeiten am Stamm *Strobilurus tenacellus*

1. Biosynthese- und vorläufer-dirigierte Biosyntheseuntersuchungen

1.1. Stammhaltung: Die Stammhaltung erfolgte auf Petrischalen mit NL E2 (2 % Agar). Die Platten wurden nach dem Ausstreichen bei 25 °C 14 Tage inkubiert und danach bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Nach spätestens 2 Monaten wurden neue Platten ausgestrichen.

1.2. Kultivierung und Standardaufarbeitung

Vorkulturen: Die Kultivierung erfolgte in 250 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, die jeweils mit 100 mL NL M2 befüllt, mit einem Wattestopfen verschlossen und anschließend sterilisiert wurden. Die Animpfung erfolgte mit 1/8 einer gut bewachsenen Platte. Inkubiert wurde für 7 d bei 22 °C und 120 rpm.

Hauptkulturen: Für die Hauptkulturen wurden 250 ml Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen verwendet, die mit 100 ml NL M2 befüllt, mit einem Wattestopfen verschlossen und sterilisiert wurden. Die Animpfung erfolgte mit 10 mL der Vorkulturen. Fermentiert wurde für 10 d bei 22 °C und 120 rpm.

Kultivierung im Fermenter: Kultivierungen im Fermenter konnten mit dem Stamm trotz Variation von verschiedenen Parametern, wie pH-Sperre, Sauerstoffzufuhr und Rührgeschwindigkeit, nicht erfolgreich durchgeführt werden.

Aufarbeitung:

Variante 1: Das Mycel wurde mittels Filtration vom Kulturfiltrat getrennt, in 1 L MeOH/Aceton (2:1) aufgenommen und für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Nach erneuter Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Eine weitere Bearbeitung des Kulturfiltrates wurde nicht vorgenommen.

Variante 2: Nach Trennung von Mycel und Kulturfiltrat wurde das Mycel in 1 L MeOH/Aceton (2:1) überführt und jeweils 15 min mit dem UltraTurrax und im Ultraschallbad extrahiert. Nach erneuter Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Das Kulturfiltrat wurde nicht weiter bearbeitet.

Die erhaltenen Mycelextrakte aus Variante 1 und 2 wurden jeweils an Kieselgel mit CH₂Cl₂ und Sephadex[®] LH 20 (MeOH) chromatographiert. Es wurden nach Variante 1: 27.8 mg und nach Variante 2: 40.1 mg an Strobilurin A (5) erhalten.

1.3. Durchführung des chemischen Screenings

Der Stamm wurde in fünf verschiedenen Medien (E2, M2, G20, 1405 und 1158) in 250 ml Erlenmyerkolben mit drei Schikanen kultiviert, die jeweils mit 100 ml Nährlösung gefüllt waren. Die Vorkulturen wurden im jeweiligen Medium mit 1/8 einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft und 7 d bei 22°C und 120 rpm inkubiert. Mit 10 mL der Vorkulturen wurden die Hauptkulturen beimpft und ebenfalls 7 d bei 22°C und 120 rpm kultiviert. Das Mycel wurde mittels Filtration vom Kulturfiltrat getrennt und 15 min im Ultraschallbad mit 200 mL Methanol/Aceton 2:1 extrahiert. Es erfolgte eine weitere Filtration und das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Die Absorbtion des Kulturfiltrates erfolgte an 30 mL Amberlite® XAD-2, das Absorberharz wurde mit 100 ml Wasser gewaschen und mit 100 mL Methanol eluiert. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt. Die erhaltenen Extrakte wurden in 2 mL MeOH/H₂O 1:1 gelöst und 10 µL dieser Lösung auf eine HPTC-Kieselgelplatte aufgetragen. Entwickelt wurden die Dünnschichtchromatogramme in CHCl₃/MeOH 9:1 und n-Butanol/Eisessig/H₂O 5:1:4. Die Detektion des Metabolitenspektrums erfolgte mit UV-Licht bei 254 und 366 nm, Eigenfarbe und unter Verwendung von Sprühreagenzien (Anis, Ehrlich, Orcin und VS).

Ein weiteres Screening wurde bei 28°C unter den gleichen Bedingungen wie oben genannt durchgeführt.

1.4. Biosyntheseuntersuchungen

Erstellen einer Eichgeraden per HPLC: Zur Erstellung einer Eichkurve von **5** wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1.0, 0.75, 0.5, 0.25 und 0.125 mg/mL hergestellt. Diese wurden mittels HPLC vermessen, und die gewonnenen Daten in einer Eichkurve aufgetragen (Integralfläche [mV x min] vs. Menge [mg/mL]).

Ermittlung des Produktionsverlaufs und der Ausbeute: Für die Aufnahme des zeitabhängigen Produktionsverlaufs von **5** wurden die Vor- und Hauptkulturen, wie unter B II 1.2 beschrieben, angesetzt. Die Fermentation verlief über 10 Tage, wobei alle 24 h, beginnend nach 24 h, 2 Kolben entnommen und unter der in B II 1.2 genannten Variante 2 aufgearbeitet wurden. Die erhaltenen Extrakte wurden 15 Minuten lang mit 3 mL Methanol p.a. im Ultraschallbad aufgeschlossen. Der Lösung entnahm man 0.5 mL, füllte diese in Eppendorf-Caps und zentrifugierte. Die Proben wurden anschließend mittels analytischer HPLC auf Strobilurin A untersucht. Unter Verwendung der Eichgeraden wurde der Produktionsverlauf aufgezeichnet (s. Abb. 11; Kapitel A II 4.1). Anhand der erhaltenen Daten wurden die verschiedenen Fütterungszeitpunkte ermittelt.

Kultivierungen für die Fütterungsexperimente: Die Vor- und Hauptkulturen für die Fütterungsexperimente, sowie die Aufarbeitung nach Variante 2, wurden, wie in Kapitel B II 3.1 beschrieben, im 1 L Maßstab durchgeführt. Alle markierten Verbindungen wurden in 25 mL sterilisiertem Wasser gelöst. Der Fütterungsbeginn zur 48. h ergab sich aus dem Fermentationsverlauf. Im Pulse-feeding verfahren wurden zwischen der 48. h und 72. h alle 6. h 0.5 mL des Vorläufers in jeden Kolben gegeben. Die Aufarbeitung erfolgte nach der 96 Stunde. Für die [^{13}C]-Acetat-Fütterung wurden drei weitere Fütterungs-Modi gewählt:

Modus 1: Die Fütterung wurde über 24 Stunden im oben genannten Pulse-feeding-Verfahren von der 120. – 144. h durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgte nach der 168. h.

Modus 2: Die Fütterung erfolgte vom 2. bis zum 6. Tag der Fermentation. Es wurden alle 24 h 0.5 mL der markierten Verbindung in jeden Kolben gegeben. Die Aufarbeitung erfolgte am 7. Tag.

Modus 3: [^{13}C]-Acetat wurde 1:1 mit unmarkiertem Acetat gemischt. Die Fütterung erfolgte zu den Bedingungen wie Modus I.

Eine Vergleichsfermentation mit unmarkierten Verbindungen wurde unter den allgemeinen Bedingungen durchgeführt, um die Verträglichkeit der Substanzen zu testen. Eine Zusammenfassung der Fütterungsexperimente ist in Tabelle 12 dargestellt.

Vorläufer	Zugabezeitpunkt (h) Fermentationsdauer (d)	Menge Vorläufer (g)	Konzentration (mol/L)	Ausbeute an 5 (mg/L)
[1-¹³C]Acetat	48, 54, 60, 66, 72 4	1	12	11.8
[1-¹³C]Acetat	120, 126, 132, 138, 144 7	1	12	16.3
[1-¹³C]Acetat	48, 54, 60, 66, 72 4	Gemisch 0.5/0.5	6	5.3
[1-¹³C]Acetat	48, 72, 96, 120, 144 7	1	12	14.2
[1,2-¹³C₂] Acetat	48, 54, 60, 66, 72 4	1	12	12.3
[1-¹³C,¹⁸O] Acetat	48, 54, 60, 66, 72 4	0.5	6	6.3
[3-¹³C] Phenylalanin	48, 54, 60, 66, 72 4	0.165	1.0	4.9
[2,3-¹³C₂] Phenylalanin	48, 54, 60, 66, 72 4	0.25	1.5	5.2
[Methyl-¹³C] L-Methionin	48, 54, 60, 66, 72 4	0.149	1.0	5.3
[D₈] Phenylalanin	48, 54, 60, 66, 72 4	0.165	1.0	5.8

Tabelle 12: Fütterungsexperimente zur Klärung der Biosynthese von Strobilurin A (5)

¹³C-Anreicherungen nach Fütterung der markierten Vorläufer

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

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

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

Alle Einbauraten sind in den Tabellen 15,16,17 im Anhang aufgelistet. Das Kohlenstoffatom, auf das normiert wurde, ist in den Tabellen gekennzeichnet.

1.5. Vorläufer-dirigierte Biosynthese

Erweiterte Aufreinigung: Die Aufreinigung der verschiedenen Gemische an Strobilurin-Derivaten erfolgte zunächst nach der Standardaufarbeitung. Die Isolierung als Reinsubstanz wurde unter Verwendung der semipräparativen HPLC vorgenommen.

Versuche mit Fluor-markierten Vorläufern: Für die Experimente zur vorläufer-dirigierten Biosynthese mit Fluor-Verbindungen wurden im 1 L Maßstab durchgeführt. Die eingesetzten Verbindungen wurden im Arbeitskreis von T.J. Simpson in Bristol synthetisiert und vor deren Einsatz mit NMR vermessen. Die Substanzen waren nicht zu 100 % rein.

Alle Verbindungen wurden in jeweils 25 ml MeOH gelöst. Die Fütterungen liefen über 24 h und alle 6 h wurden in jeden Kolben 0.5 mL der jeweiligen Fluorverbindung gegeben. Analog zu den Acetat-Fütterungen wurden hierbei auch zwei verschiedene Startvarianten gewählt. Nach Variante 1 begann die Fütterung zur 48. h und in der zweiten Variante erfolgte der Start nach der 120. h der Kultivierung. Die Aufarbeitung erfolgte zur 76. h bzw. zur 166. h wie unter B II 1.2 und 1.5 genannt. Eine Zusammenfassung der Experimente mit den verschiedenen Fluorbenzoesäuren und Fluorzimtsäuren sind in der Tabelle 8 (Kapitel A III 2.3) dargestellt. In Tabelle 13 sind alle durchgeführten Experimente angeführt.

Vorläufer	Zugabezeitpunkt (h) Fermentationsdauer (d)	Menge Vorläufer (mg)	Konzentration (mol/L)
2-Fluorbenzoesäure-SNAC	48, 54, 60, 66, 72 4	121	0.5
3-Fluorbenzoesäure-SNAC	48, 54, 60, 66, 72 4	121	0.5
4-Fluorbenzoesäure-SNAC	48, 54, 60, 66, 72 4	121	0.5
2-Fluorzimtsäure-SNAC	48, 54, 60, 66, 72 4	134	0.5
3-Fluorzimtsäure-SNAC	48, 54, 60, 66, 72 4	134	0.5
4-Fluorzimtsäure-SNAC	48, 54, 60, 66, 72 4	134	0.5
2-Fluorbenzoesäure-SNAC	120, 126, 132, 138, 144 7	121	0.5
3-Fluorbenzoesäure-SNAC	120, 126, 132, 138, 144 7	121	0.5
4-Fluorbenzoesäure-SNAC	120, 126, 132, 138, 144 7	121	0.5
2-Fluorzimtsäure-SNAC	120, 126, 132, 138, 144 7	134	0.5
3-Fluorzimtsäure-SNAC	120, 126, 132, 138, 144 7	134	0.5
4-Fluorzimtsäure-SNAC	120, 126, 132, 138, 144 7	134	0.5

Tabelle 13: Fütterungsexperimente mit markierten Vorläufern aus der Synthese im AK Prof. Simpson (Bristol); Die Ausbeuten sind im Kapitel IV 2.3 Tabelle 8 zusammengefasst.

Konzentrationsabhängige Experimente: Nach der AAV 1 wurde die 2-Fluorbenzoesäure in die Thioesterverbindung überführt. Für die Versuchsreihe wurde in Konzentrationen von 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 und 7.0 mmol/L jeweils ein Fütterungsexperiment durchgeführt. Die erhaltenen Mycelextrakte wurden jeweils an Kieselgel mit CH_2Cl_2 und Sephadex[®] LH 20 (MeOH) chromatografiert. Mit Hilfe von semipräparativer HPLC wurden die einzelnen Strobilurin-Mischfraktionen aufgetrennt. In Tabelle 9 (Kapitel A III 3.3) sind die Ausbeuten der einzelnen Strobilurine aus dem jeweiligen Experimenten aufgeführt.

Die Kultivierung für diese Versuchsreihe wurde im 1L Maßstab durchgeführt. Die Kulturen wurden wie unter B II 1.2 beschrieben angesetzt. Fermentiert wurde über vier Tage, und die Fütterungen nach dem unter B II 1.4 genannten Modus I durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter B II 1.2 und 1.5 genannten.

Experiment mit Nicotinsäure: Fermentiert wurde bei 22°C und 120 rpm in vierzig 250 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane, die jeweils mit 100 ml NL M2 befüllt waren. Die Animpfung erfolgte mit 10 ml Vorkultur, welche, wie unter B II 1.2 beschrieben, angesetzt wurde. In einem Intervall von 12 h, vom 2 – 6 Tag der Fermentation wurden pro Tag 3 mmol/L Nicotinsäure zugegeben, welche in 40 mL MeOH täglich gelöst wurde. Am 7 Tag erfolgte die Aufarbeitung wie unter B II 1.2 genannt.

Fütterungsexperimente mit Hydroxybenzoesäure und Halogensalzen:

Fermentiert wurde bei 22°C und 120 rpm jeweils in vierzig 250 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane, die mit 100 ml NL M2 befüllt waren. Die Animpfung erfolgte nach B II 1.2 mit 10 ml Vorkultur. Jeweils 120 g der Salze, KF, KCl, KBr und KI, wurden in 240 mL sterilisiertem demineralisiertem Wasser gelöst und in einem Intervall von 12 h, vom 2 – 9 Tag der Fermentation, in 0,5 mL Portionen/Kolben zugegeben. Im gleichen Intervall wurden pro Tag 3 mmol/L 4-Hydroxy-benzoesäure zugegeben, welche in 40 mL MeOH täglich gelöst wurde. Am 9 Tag erfolgte die Aufarbeitung wie unter B II 1.2 beschrieben.

Folgende Experimente wurden durchgeführt:

Experiment 1: MeOH

Experiment 2: 4-Hydroxybenzoesäure

Experiment 3: 4-Hydroxybenzoesäure + KF

Experiment 4: 4-Hydroxybenzoesäure + KCl

Experiment 5: 4-Hydroxybenzoesäure + KBr

Experiment 6: 4-Hydroxybenzoesäure + KI

Analoge Fütterungsexperimente mit 3-Hydroxy-benzoesäure und den Halogensalzen wurden ebenfalls durchgeführt. Die Isolierung erfolgte wie unter B II 1.2 und 1.5 beschrieben. Es konnten die Strobilurine **5**, **13**, **15**, **24** sowie **23** aus den verschiedenen Experimenten als Reinsubstanz isoliert werden:

1.6. Charakterisierung der isolierten Metabolite

Strobilurin A (5)

$C_{16}H_{18}O_3$ (258,31)

Gelbliches Öl

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau (Anis).

$R_f = 0.84$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5)

EI-MS: $m/z = 258$ (100), 199 (74), 167 (38), 155 (32), 121 (100), 75 (58).

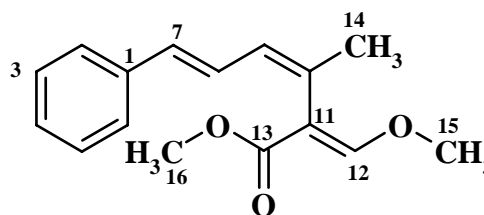
HREI-MS: 258.1256 (gefunden wie berechnet für $C_{16}H_{18}O_3$)

UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 321(6370)(sh), 292(5795), 287(5695); 285(5656) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3432, 2952, 1734, 1628, 1437, 1384, 1244, 1121, 1074, 668$ cm^{-1} .

1H -NMR (600 MHz, CD_3OD): $\delta_H = 1.90$ (s, 3H, CH_3), 3.70 (s, 3H, 15- OCH_3), 3.84 (s, 3H, 16- OCH_3), 6.17 (dq, $J = 10.0, 1.5$ Hz, 1H, 9-H), 6.42 (d, $J = 16$ Hz, 1H, 7-H), 6.60 (dd, $J = 10.0, 16.0$ Hz, 1H, 8-H), 7.10 (tt, $J = 7.0, 2.0$ Hz, 1H, 3-H), 7.25 (td, $J = 7.0, 2.0$ Hz, 2H, 3-H, 5-H), 7.32 (dt, $J = 7.0, 2.0$ Hz, 2H, 2-H, 6-H), 7.42 (s, 1H, 12H) ppm.

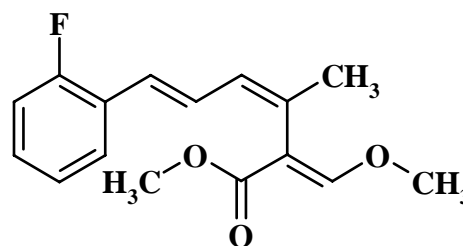
^{13}C -NMR (150.8 MHz, CD_3OD): $\delta_C = 23.8$ (q, C-14), 51.9 (q, C-16), 62.3 (q, C-15), 111.6 (s, C-11), 127.2 (d, C-2, C-6), 127.8 (d, C-8), 128.2 (d, C-4), 129.6 (d, C-3, C-5), 130.9 (d, C-9), 131.9 (d, C-7), 132.4 (s, C-1), 139.2 (s, C-10), 160.9 (d, C-12), 169.5 (s, C-13) ppm.



2-Fluor-strobilurin A (16)**C₁₆H₁₇O₃F** (276.30)

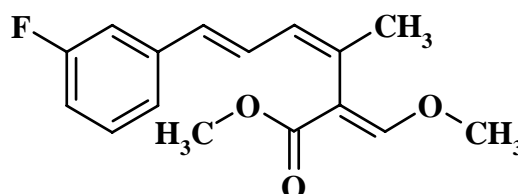
Gelbliches Öl

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau (Anis).**R_f** = 0.80 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); 0.29 (CH₂Cl₂)**EI-MS:** m/z = 276 (68), 217 (72), 139 (48), 75 (100).**HREI-MS:** 276.1162 (gefunden wie berechnet für C₁₆H₁₇O₃F).**UV** (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 305 (8418), 292 (8059), 252 (6955), 227 (6265)**IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3431.9, 2946.8, 2361.8, 2343.1, 1706.9, 1628.5, 1485.6, 1456.5, 1435.9, 1277.0, 1237.5, 1191.8, 1145.4, 1121.4, 1075.8, 1034.1, 969.9, 927.9, 804.5, 755.4, 668.3 cm⁻¹.**¹H-NMR** (600 MHz, CD₃OD): δ_H = 1.90 (s, 3H, CH₃), 3.70 (s, 3H, 15-OCH₃), 3.84 (s, 3H, 16-OCH₃), 6.18 (d, *J* = 11.0, 1.5 Hz, 1H, 9-H), 6.55 (d, *J* = 16 Hz, 1H, 7-H), 6.60 (dd, *J* = 11.0, 16.0 Hz, 1H, 8-H), 7.01 (ddd, *J* = 11.2, 8.0, 1.0 Hz, 1H, 3-H), 7.08 (td, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H, 5-H), 7.17 (dddd, *J* = 8.0, 8.0, 5.5, 2.0 Hz, 1H, 4-H), 7.41 (td, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H, 6-H), 7.51 (s, 12-H) ppm.**¹³C-NMR** (150.8 MHz, CD₃OD): δ_C = 23.8 (q, C-14), 51.9 (q, C-16), 62.3 (q, C-15), 111.4 (s, C-11), 116.4 (d, C-1), 116.7 (d, C-3), 123.8 (d, C-7), 125.41 (d, C-5), 128.7 (d, C-6), 129.6 (d, C-4), 130.6 (d, C-8), 131.1 (d, C-9), 133.6 (q, C-10), 161.0 (s, C-12), 162.5 (d, C-2), 169.4 (q, C-13) ppm.**¹⁹F-NMR** (CD₃OD) δ_F = -120.5 (ddd *J* = 11.2, 7.8, 5.2) ppm.**3-Fluor-strobilurin A (12)****C₁₆H₁₇O₃F** (276.30)

Gelbliches Öl

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau (Anis).**EI-MS:** m/z = 276 (68), 217 (72), 139 (48), 75 (100).**¹H-NMR** (600 MHz, CD₃OD): δ_H = 1.90 (s, 3H, CH₃), 3.70 (s, 3H, 15-OCH₃), 3.84 (s, 3H, 16-OCH₃), 6.20 (dq, *J* = 11.0, 1.5 Hz, 1H, 9-H), 6.44 (d, *J* = 16 Hz, 1H, 7-H), 6.60 (dd, *J* = 11.0, 16.0 Hz, 1H, 8-H), 6.88 (dddd, *J* = 8.5, 8.5, 2.5, < 1.0 Hz, 1H, 4-H),

7.01 (ddd, $J = 10.5, 3.0, 3.0$ Hz, 1H, 2-H), 7.12 (ddd, $J = 8.0, < 1.0, < 1.0$ Hz, 1H, 6-H), 7.26 (ddd, $J = 8.0, 8.0, 6.0$ Hz, 1H, 5-H), 7.51(s, 12-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, CD_3OD): $\delta_{\text{C}} = 23.8$ (q, C-14), 51.9 (q, C-16), 62.3 (q, C-15), 111.3 (s, C-11), 113.2 (d, C-2), 114.6 (d, C-4), 123.1 (d, C-5), 129.3 (d, C-), 130.5 (d, C-), 130.6 (d, C-), 130.6 (d, C-), 131.2 (d, C-), 133.7 (q, C-), 141.8 (s, C-1), 161.0 (d, C-12), 163.7 (d, C-3), 169.4 (q, C-13) ppm.

$^{19}\text{F-NMR}$ (CD_3OD) $\delta_{\text{F}} = -112.3$ (ddd, $J = 10.1, 8.8, 5.8$) ppm.

4-Fluor-Strobilurin A (17)

$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_3\text{F}$ (276.30)

Gelbliches Öl

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau (Anis).

$R_{\text{f}} = 0.80$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); 0.28 (CH_2Cl_2)

EI-MS: $m/z = 276$ (68), 217 (72), 139 (48), 75 (100).

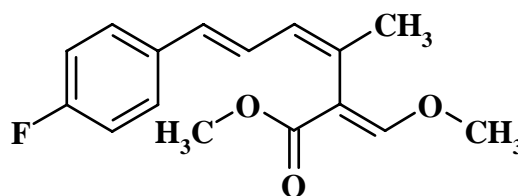
UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 289 (53176), 226 (4158), 218 (4011) (sh), 207(3808) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3443.9, 2926.6, 2852.5, 2778.2, 2360.6, 2342.3, 1706.3, 1627.9, 1506.8, 1235.8, 1119.9, 1075.6, 967.3, 815.5, 772.0, 668.2$ cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): $\delta_{\text{H}} = 1.90$ (s, 3H, CH_3), 3.70 (s, 3H, 15- OCH_3), 3.84 (s, 3H, 16- OCH_3), 6.16 (dq, $J = 11.0, 1.5$ Hz, 1H, 9-H), 6.42 (d, $J = 16$ Hz, 1H, 7-H), 6.52 (dd, $J = 11.0, 16.0$ Hz, 1H, 8-H), 7.01 (ddd, $J = 9.0, 8.5, 2.0$ Hz, 1H, 3-H, 5-H), 7.32 (ddd, $J = 8.0, 5.5, 2.0$ Hz, 1H, 2-H, 6-H), 7.50 (s, 12-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, CD_3OD): $\delta_{\text{C}} = 23.8$ (q, C-14), 51.9 (q, C-16), 62.3 (q, C-15), 111.5 (s, C-11), 116.2 (d, C-3), 116.3 (d, C-5), 127.8 (d, C-6), 128.7 (d, C-), 128.8 (d, C-), 130.5 (d, C-7), 130.8 (d, C-8), 132.5 (d, C-9), 135.6 (q, C-10), 160.9 (s, C-12), 162.6 (d, C-4), 169.4 (q, C-13) ppm.

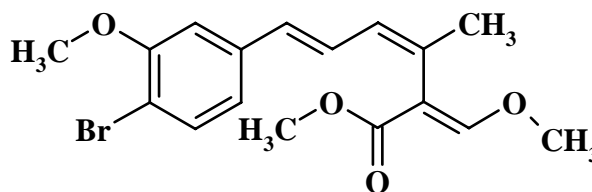
$^{19}\text{F-NMR}$ (CD_3OD) $\delta_{\text{F}} = -113.6$ (tt, $J = 9.0, 5.5$) ppm.



4-Deschlor-4-brom-strobilurin B (24)**C₁₇H₁₉O₄Br** (367.23)

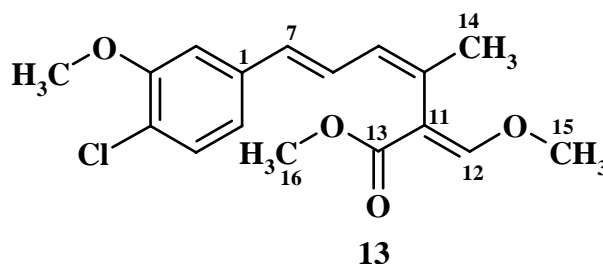
Gelbliches Öl

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau (Anis).**R_f** = 0.80 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); 0.22 (CH₂Cl₂)**EI-MS:** m/z = 368 (32), 366 (36), 252 (16), 250 (18), 231 (36), 229 (39), 75 (100).**UV** (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 332(12184), 303(11120), 299(10973), 221(8110)(sh) nm.**IR** (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3436, 2946, 1726, 1629, 1482(sh), 1464, 1405, 1254, 1120, 1047, 1024 cm⁻¹.**¹H-NMR** (300 MHz, CD₃OD): δ_H = 1.90 (s, 3H, CH₃), 3.70 (s, 3H, 15-OCH₃), 3.84 (s, 3H, 16-OCH₃), 6.17 (dd, *J* = 11.0, 1.5 Hz, 1H, 9-H), 6.42 (d, *J* = 16 Hz, 1H, 7-H), 6.60 (dd, *J* = 11.0, 16.0 Hz, 1H, 8-H), 6.80 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H, 6-H), 6.90 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 2-H), 7.3 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 5-H), 7.51(s, 12-H) ppm.**¹³C-NMR** (75 MHz, CD₃OD): δ_C = 23.9 (q, C-14), 51.9 (q, C-16), 56.5 (q, C-17), 62.3 (q, C-15), 111.0 (s, C-4), 111.0 (d, C-2), 111.4 (q, C-11), 120.3 (d, C-6), 128.8 (d, C-5), 130.7 (q, C-1), 131.0 (d, C-7), 133.2 (d, C-8), 134.2 (d, C-9), 140.2 (q, C-10), 157.4 (s, C-3), 161.0 (d, C-12), 169.4 (q, C-13) ppm.**Strobilurin B (13)****C₁₆H₁₈O₃** (322,31)

Gelbliches Öl

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau (Anis).**R_f** = 0.77 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5)**EI-MS:** m/z = 322 (100), 290 (21), 263 (38), 185 (89), 75 (65).**¹H-NMR** (600 MHz, CD₃OD): δ_H = 1.90 (s, 3H, CH₃), 3.70 (s, 3H, 15-OCH₃), 3.84 (s, 3H, 16-OCH₃), 6.17 (dd, *J* = 11.0, 1.5 Hz, 1H, 9-H), 6.42 (d, *J* = 16 Hz, 1H, 7-H), 6.60 (dd, *J* = 11.0, 16.0 Hz, 1H, 8-H), 6.80 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H, 6-H), 6.90 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, 2-H), 7.20 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, 5-H), 7.51(s, 12-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, CD_3OD): δ_{C} = 23.9 (q, C-14), 52.0 (q, C-16), 56.5 (q, C-17), 62.4 (q, C-15), 111.1 (s, C-2), 111.4 (d, C-11), 119.9 (q, C-6), 120.3 (d, C-4), 128.8 (d, C-5), 130.7 (q, C-1), 131.0 (d, C-7), 133.2 (d, C-8), 134.2 (d, C-9), 140.2 (q, C-10), 157.4 (s, C-3), 161.0 (d, C-12), 169.4 (q, C-13) ppm.

Strobilurin H (15)

$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_4$ (288.33)

Gelbliches Öl

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau (Anis).

R_f = 0.80 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); 0.773 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5)

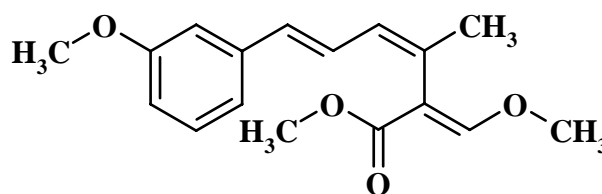
EI-MS: m/z = 288 (100), 256 (42), 229 (54), 197 (70), 172 (76), 151 (88), 75 (72).

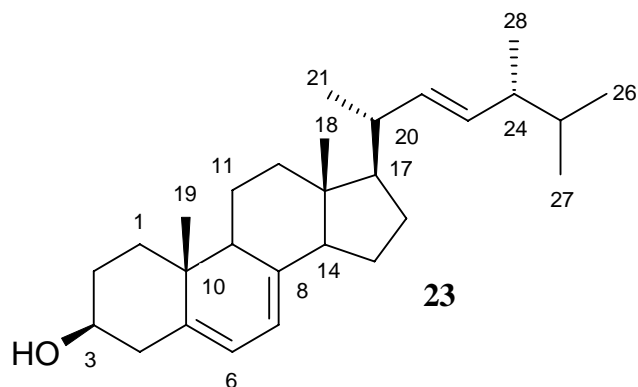
UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 329(9745), 301(8668), 285(8208), 219 (6307)(sh) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3422, 2925, 2854, 1734, 1836, 1458, 1407, 1384, 1257, 1064, 1029 cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD): δ_{H} = 1.90 (s, 3H, CH_3), 3.70 (s, 3H, 15- OCH_3), 3.84 (s, 3H, 16- OCH_3), 6.17 (dq, J = 11.0, 1.0 Hz, 1H, 9-H), 6.41 (d, J = 16 Hz, 1H, 7-H), 6.57 (dd, J = 16.0, 11.0 Hz, 1H, 8-H), 6.74 (ddd, J = 8.0, 2.0, 1.0 Hz, 1H, 6-H), 6.84 (d, J = 2 Hz, 1H, 2-H), 6.91 (dd, J = 8.0, 1.0 Hz, 1H, 4-H), 7.17 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 5-H), 7.51 (s, 12-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.8 MHz, CD_3OD): δ_{C} = 23.8 (q, C-14), 51.9 (q, C-16), 55.5 (q, C-17), 62.3 (q, C-15), 111.5 (s, C-1), 112.6 (q, C-11), 113.7 (d, C-4), 119.6 (d, C-5), 128.1 (d, C-6), 130.5 (q, C-1), 130.8 (d, C-7), 131.83 (d, C-8), 132.6 (d, C-9), 140.6 (q, C-10), 160.9 (s, C-3), 161.3 (d, C-12), 169.5 (q, C-13) ppm.



Provitamin D2 / Ergosterol (23)**C₂₈H₄₄O (396.66)****R_f- Wert:** 0.68 (CHCl₃/ MeOH 9:1)**Anfärbeverhalten:** violett (Anisaldehyd).**EI-MS:** m/z (%) = 396 (100) [M⁺], 363 (52), 337 (16), 271 (6), 253 (10), 211 (6), 143 (6), 105 (24), 81 (14), 69 (30), 55 (16), 43 (10).**HREI-MS:** 396.3392 (gefunden wie berechnet für C₂₈H₄₄O)**¹³C-NMR** (150.8 MHz, CDCl₃): δ = 12.0 (C-18), 16.3 (C-19), 17.6 (C-25), 19.6 (C-27), 20.0 (C-26), 21.1 (C-21), 23.0 (C-11), 28.3 (C-16), 29.7 (C-15), 32.0 (C-2), 33.1 (C-25), 37.0 (C-10), 38.4 (C-1), 39.1 (C-12), 40.4 (C-20), 40.8 (C-4), 42.8 (C-13), 46.2 (C-9), 54.5 (C-14), 55.7 (C-17), 70.5 (C-3), 116.3 (C-7), 119.6 (C-6), 131.9 (C-22), 135.6 (C-23), 139.8 (C-5), 141.4 (C-8) ppm.

III. Arbeiten am Stamm *Oudemansiella mucidia*

1. Allgemeine Arbeiten

1.1. Stammhaltung:

Die Stammhaltung erfolgte auf Petrischalen mit NL M2a (2% Agar). Die Platten wurden nach Ausstreichen bei 25 °C 7 Tage inkubiert und danach bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Nach spätestens 2 Monaten wurden neue Platten ausgestrichen.

1.2. Kultivierung und Standardaufarbeitung

Vorkulturen: Die Kultivierung erfolgte in 250 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, die, jeweils mit 100 mL NL M2a befüllt, mit einem Wattestopfen verschlossen und anschließend sterilisiert wurden. Die Animpfung erfolgte mit 1/8 einer gut bewachsenen Platte. Inkubiert wurde für 7 Tage bei 22 °C und 120 rpm.

Hauptkulturen: Für die Hauptkulturen wurden zehn 250 ml Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen verwendet, die mit 100 ml NL M2a befüllt, mit einem Wattestopfen verschlossen und sterilisiert wurden. Die Animpfung erfolgte mit 10 mL der Vorkulturen.

Aufarbeitung: Das Mycel wurde mittels Filtration vom Kulturfiltrat getrennt. Anschließend wurde das Mycel in 1 L MeOH/Aceton (2:1) aufgenommen. Es folgte eine jeweils 15 minütige Extraktion mit dem UltraTurrax und im Ultraschallbad. Nach erneuter Filtration wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Das Kulturfiltrat wurde zweimal mit 0.5 L Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach Abtrennung der wässrigen Phase wurde das Lösungsmittel im Vakuum eingeeengt. Beide erhaltenen Extrakte wurden anschließend vereinigt.

2. Biosyntheseuntersuchungen

Ermittlung des Produktionsverlaufs: Für die Aufnahme des zeitabhängigen Produktionsverlaufs des Oudemansin A wurden die Vor- und Hauptkulturen, wie unter B III 1.2 beschrieben, angesetzt. Die Fermentation verlief über 10 Tage, wobei alle 24 h, beginnend nach 24 h, 2 Kolben entnommen und unter der in B III 1.2 genannten Methode aufgearbeitet wurde. Alle erhaltenen Proben wurden 15 Minuten lang mit 3 mL Methanol p.a. im Ultraschallbad aufgeschlossen und über Dünnschichtchromatographie der Produktionsbeginn ermittelt.

Kultivierung und Aufarbeitung: Die Vor- und Hauptkulturen für die Fütterungsexperimente sowie die Aufarbeitung erfolgte, wie in Kapitel B III 1.2 beschrieben, in 1L Maßstab. Alle markierten Verbindungen wurden in 25 mL sterilisiertem Wasser gelöst. Der Fütterungsbeginn zur 48 h ergab sich aus dem Fermentationsverlauf. Im Pulse-feeding Verfahren wurden von der Stunde 48 – 72 alle 6 Stunden 0.5 mL des Vorläufers in jeden Kolben gegeben. Die Aufarbeitung erfolgte nach der Stunde 96. In Tabelle Nr. sind alle durchgeführten Versuche aufgelistet

Vorläufer	Zugabezeitpunkt (h) Fermentationsdauer (d)	Menge Vorläufer (g)	Konzentration (mol/L)	Ausbeute an 7 (mg/L)
[1- ¹³ C]Acetat	48, 54, 60, 66, 72 4	1	1.0	2.9
[1,2- ¹³ C ₂] Acetat	48, 54, 60, 66, 72 4	1	1.0	3.1
[3- ¹³ C] Phenylalanin	48, 54, 60, 66, 72 4	0.165	1.0	3.4
[2,3- ¹³ C ₂] Phenylalanin	48, 54, 60, 66, 72 4	0.25	1.5	3.5
[D ₈] Phenylalanin	48, 54, 60, 66, 72 4	0.165	1.0	4.2

Tabelle 14: Fütterungsexperimente zur Klärung der Biosynthese von Oudemansin A (**7**)

Alle Einbauraten sind in der Tabelle 17 im Anhang aufgelistet. Das Kohlenstoffatom, auf das normiert wurde, ist in den Tabellen gekennzeichnet.

3. Vorläufer-dirigierte Biosyntheseuntersuchungen

3.1. Fütterungsexperimente

Fermentiert wurde bei 22°C und 120 rpm. in vierzig 250 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane, die jeweils mit 100 ml NL M2a befüllt waren. Die Animpfung erfolgte mit 10 ml Vorkultur, welche, wie unter B III 2.1 beschrieben, angesetzt wurde. Jeweils 120 g KBr wurde in 240 mL sterilisiertem demineralisiertem Wasser gelöst und vom 2 – 6 Tag der Fermentation in einem Intervall von 12 h, in 0,5 mL Portionen/Kolben zugegeben. Im gleichen Intervall wurden pro Tag 3 mmol/L 4-Hydroxybenzoesäure zugegeben, welche in 40 mL MeOH täglich gelöst wurde. Am 7. d erfolgte die Aufarbeitung nach der unter B III 2.1 genannten Methode. Unter diesen Bedingungen stellte der Stamm die Produktion ein. Das gleiche Bild zeigte sich bei einer Fütterung mit 2-Fluorbenzoesäure.

4. Charakterisierung von Oudemansin A (7)

Oudemansin A (7)

$C_{17}H_{22}O_4$ (290.35)

Gelbliches Öl

UV-löschend (254 nm)

Anfärbeverhalten: blau (Anis).

$R_f = 0.83$ ($CH_2Cl_2/MeOH$ 95:5)

$[\alpha]_D^{20} = -6.82^\circ$ ($c = 1.0$ in Methanol), Lit: $[\alpha]_D^{20} = -17$ ($c = 1.0$ in EtOH)

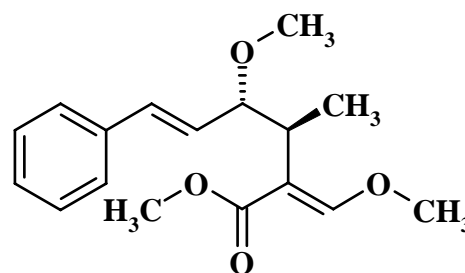
EI-MS: $m/z = 290.3$ (0.7); 199.2 (0.7); 147.2 (100); 115.1 (20); 91.1 (5.6)

UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 282.7 (sh); 291.8, 246(3963) nm.

CD (MeOH): λ_{max} ($[\Theta]$) = 267 (-1494), 257 (1446), 237 (-12021), 233(-12540), 209 (4326), 206 (2766), 203 (152) nm.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3433, 2929, 2852$ (sh), 1706, 1636, 1457, 1436, 1248, 1136(sh), 1119, 1085, 967, 772, 751, 694, 668 cm^{-1} .

1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$): $\delta_H = 1.30$ (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 14- CH_3), 3.07 (dq, $J = 7.0, 9.0$ Hz, 1H, 10-H), 3.38 (s, 3H, 17- OCH_3), 3.70 (s, 3H, 16- OCH_3), 3.83 (s, 3H, 15- OCH_3), 4.00 (dd, $J = 9$ Hz, 1H, 9-H), 5.99 (dd, $J = 9.0, 16.0$ Hz, 1H, 8-H), 6.47(d, $J = 16$ Hz, 1H,7-H), 7.24 (s, 1H, 12-H), 7.28 (tt, $J = 7.0, 1.5$ Hz, 1H, 3-H),



7,36 (td, $J = 7.0, 1.5$ Hz, 2H, 2-H, 4-H), 7.39 (dt, $J = 7.0, 2.0$ Hz, 2H, 1-H, 5-H), 7.50 (s, 12-H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{C}} = 15.7$ (q, C-14), 35.6 (d, C-10), 50.9 (q, C-16), 56.9 (q, C-17), 61.3 (q, C-15), 85.0 (d, C-9), 112.2 (s, C-11), 126.4 (d, C-1,3), 127.3 (d, C-3), 128.4 (d, C-2,5), 129.5 (d, C-8), 132.5 (d, C-7), 136.9 (s, C-6), 159.4 (d, C-12), 168.(s,C-13)ppm

C. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Information zur Politischen Bildung, Heft 158
- 2 L. Benzing, G. Bürkle, H.H. Cramer, R. Gutsch, M. Hanf, G. Haug, S. Hombrecher, D.Redlhammer, W. Waldauer, *Die Pflanzen schützen-den Menschen nützen Eine Geschichte des Pflanzenschutzes*, Industrieverband Pflanzenschutz e.V, Frankfurt a. M. **1987**
- 3 Suzanne Wassmann, *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig, **2002**
- 4 W. Schwab, *Pharmazie in unserer Zeit* **2000**, 2, 107–114
- 5 J. Stetter, F. Lieb, *Angew. Chemie.*, **2000**, 112, 1792–1821
- 6 H. Martin, *Die Wissenschaftliche Grundlage des Pflanzenschutzes*, 5. Aufl., VCH, Weinheim, **1967**
- 7 H. Röchling in *Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel*, Bd. 1 (Hrsg.: R. Wegler), Springer, Berlin, **1970**
- 8 C. Fest, K. J. Schmidt in *Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel*, Bd. 1 (Hrsg.: R. Wegler), Springer, Berlin, **1970**
- 9 W. Krämer in *Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel*, (Hrsg.: K.H. Büchel), Thieme, Stuttgart, **1977**
- 10 R. Wegler, L. Eue in *Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel*, Bd. 5 (Hrsg.: R. Wegler), Springer, Berlin, **1977**
- 11 Industrieverband Agrar e.V., *Jahresbericht 2003/2004*, Frankfurt a. M.
- 12 R.D. Finn, C. G. Jones, *Nat. Prod. Rep.*, **2003**, 20, 382-391
- 13 P. Jeschke, *ChemBioChem*, **2004**, 5, 570–589
- 14 D. W. Bartlett, J. M. Clough, J. R. Godwin, A. A. Hall, M. Hamer, B. Parr Dobrzanski, *Pest Manag. Sci.*, **2002**, 58, 649–662
- 15 Biologische Bundesanstalt für Land- und Forswirtschaft, *Presseinformation* vom 31.Juli **2002**
- 16 E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, M. Schäfer-Korting, *Mutschler Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 8 Auflage, **2001**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
- 17 Gesetz zum Schutz der Kulturpflanzen (Pflanzenschutzgesetz- PflSchG) in der Fassung vom 14 Mai 1998 (BGB1. I S. 971); zuletzt geändert durch Artikel 3 des Gesetzes vom 19 August 2004 (BGB1. II S. 1154)

-
- 18 J.Stetter, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **1993**, *17*, 346-370
- 19 E. Beyer, F. Chumley, *Pesticide Outlook* **2000**, *1*, 8 -14
- 20 Sven Meyer, *Dissertation*, Universität Göttingen, **2003**
- 21 Jean-Louis Reymond, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5695-5697
- 22 A. T. Merritt, S. W. Gerritz, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, *7*, 305-307
- 23 H. P. Fiedler, *Nat. Prod. Lett.*, **1993**, *2*, 119 - 128
- 24 M. Arnold, *Dissertation*, Universität Göttingen, **2002**
- 25 W. Ihn, S. Heinze, U. Gräfe, *Biospektrum* **1997**, *3*, 39 - 42
- 26 G. Kiddle, R.N. Bennett, N.P. Botting, N.E. Davidson, A.A.B. Robertson, R.M. Wallsgrove, *Phytochemical Analysis* **2001**, *12*, 226 - 242
- 27 Vortrag von Phillipp Krastel, Technology Development in Natural Product Research, 25. Tübinger-Göttinger Gespräche **2004**
- 28 A. Maelicke, *Nachrichten aus der Chemie* **2000**, *48*, 793-795
- 29 R. Orlando, *J. Vac. Surg.* **2001**, *33*, 1312-1313
- 30 Maike Holzenkämpfer, *Dissertation*, Universität Göttingen **2001**
- 31 B. Shen, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2003**, *7*, 285-295
- 32 J. Staunton, B. Wilkinson, *Current Opinion in Chemical Biology*, **2001**, *7*, 159-164
- 33 B.S. Moore, C. Hertweck, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 70-99
- 34 J. Garcia-Bernardo, L. Xiang, H. Hong, B.S. Moore, P.F. Leadlay, *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 1129-1131
- 35 G.W. Gribble, *Chemosphere* **2003**, *52*, 289-297
- 36 K. Monde, H.Satoh, M. Nakamura, M. Tamura, M. Takasugi, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 913-921
- 37 P.D. Shaw, L.P. Hager, *J. Biological Chemistry* **1959**, *234*, 2565-2569
- 38 C.D. Murphy, *J. Applied Microbiology* **2003**, *94*, 539-548
- 39 P.E. Hammer, D.S. Hill, S.T. Lam, K.H. van Pee, J.M. Lignon, *Applied and Environmental Microbiology*, **1997**, *63*, 2147-2154
- 40 S. Kirner, P.E. Hammer, D.S. Hill, A. Altmann, I. Fischer, L.J. Weislo, M. Lanahan, K.H. van Pee, J.M. Ligon, *J. Bacteriology* **1998**, *180*, 1939-1943

-
- 41 S. Unversucht, K.H. van Pee, *Chemosphere* **2003**, 52, 299-312
- 42 H.J. Böhm, D. Banner, S. Bendels, M. Kansy, B. Kuhn, K. Müller, U. Obst-Sander, M. Stahl, *ChemBioChem* **2004**, 5, 637-643
- 43 S. Schulz, J. Fuhlendorff, J. L. M. Steidel, J. Collatz, J. T. Franz, *ChemBioChem*, **2004**, 5, 1500 – 1507
- 44 J. Ebel, A. Mithöfer, Early events in the elicitation of plant defence, *Planta* **1998**, 206, 335-348
- 45 Z. Nimchuk, T. Eulgem, B.F. Holt III, J.L. Dangel, *Annu. Rev. Genet.*, **2003**, 37, 579-609
- 46 F. Schröder, *Angew. Chem.* **1998**, 110 (9), 1271-1274
- 47 J. Görlach, S. Volrath, G. Knaut-Beiter, G. Hengy, U. Beckhove, K.H. Kogel, M.Oostendorp, T. Staub, E. Ward, H. Kessmann, J. Ryals, *The Plant Cell* **1998**, 8, 629-643
- 48 V. Musilek, Czech. Pat. CS 13649, *Chem. Abstr.*, **1969**, 70, 18900y
- 49 H. Sauter, W. Steglich, T. Anke, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 1416-1438
- 50 G. Schramm, W. Steglich, T. Anke, *Chem. Ber.* **1978**, 111, 2779-2784
- 51 T. Anke, W. Steglich, *J. Antibiot.* **1977**, 806-810
- 52 P. Sedmara, V. Musilek, F. Nerud, *J. Antibiot.* **1981**, 34, 1069-1072
- 53 T. Anke, G. Schramm, B. Schwalge, B. Steffan, W. Steglich, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1616-1625
- 54 G. Von Jagow, G.W. Gribble, B.L. Trumpower, *Biochemistry* **1986**, 25, 775
- 55 Chapman and Hall, *Dictionary of Natural Products on CD-ROM* **2004**, Version 13:1
- 56 T. Anke, W. Steglich, in *Drug Discovery from Nature*, Hrsg.: S. Grabley, R. Thiericke, Springer, Heidelberg, **1999**, 321-334
- 57 T. Anke, H.J. Hecht, G. Schramm, W. Steglich, *J. Antibiot.* **1979**, 1112
- 58 K. Gerth, H. Irschik, H. Reichenbach, W. Trowitsch, *J. Antibiot.* **1980**, 33, 1474-1479
- 59 W. F. Becker, G. Von Jagow, T. Anke and W. Steglich, *FEBS Letters* **1981**, 132(2) 329-333
- 60 J. M. Clough, *Nat. Prod. Rep.* **1993**, 10, 565-574
- 61 T.E. Wiggins, *Biochem. Soc. Trans.* **1994**, 221

-
- 62 M. Sutter, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 5417
- 63 G. Bertram, A. Scherer, W. Steglich, T. Anke, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 7955
- 64 D. W. Bartett, J. M. Clough, C.R.A. Godfrey, J.R. Godwin, A.A. Hall, S.P. Heaney, S.J. Maund, *Pesticide Outlook* **2001**, 12, 143-148.
- 65 H.B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A.Zeeck, *ChemBioChem* **2002**, 3, 619-627
- 66 S. Grabley, R. Thiericke, A. Zeeck, in *Drug Discovery from Nature*, Hrsg.: S. Grabley, R. Thiericke, Springer, Heidelberg, **1999**, 119-128
- 67 Merk, *Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie*, Darmstadt, **1980**
- 68 P.A.S. Lowden, G.A. Böhm, S. Metcalfe, J. Staunton, P.F. Leadlay, *ChemBioChem* **2004**, 5, 535-538
- 69 M. Brünning, *Dissertation*, Universität Göttingen **1999**
- 70 Luckner M., *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals*, Fischer Verlag, Jena und Berlin, **1990**
- 71 D.A. Hoopwood, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 2465-2497
- 72 D. Konz, M.A. Marahiel, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 39-48
- 73 T. Schwecke, J.F. Aparicio, O. Molnar, A. König, L.E. Khaw, S.F. Haydock, M. Iliynk, P. Caffrey, J. Cortes, J.B. Lester, G.A. Böhm, J. Staunton, P.F. Leadlay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 7839-7843
- 74 B. Shen, *Current Opinion in Chemical Biology* **2003**, 7, 285-295
- 75 J. Staunton, K.J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 380-416
- 76 R.J. Cox, F. Glod, D. Hurley, C.M. Lazarus, T.P. Nicholson, B.A.M. Rudd, T.J. Simpson, B. Wilkinson, Y. Zhang, *Chem. Commun.* **2004**, 2260-2261
- 77 F. Nerud, P. Sedmaera, Z. Zouchova, V. Musilek, V. Miloslav, *Collection Czechoslovak. Chem. Com.* **1981**, 47, 1020-1025
- 78 Anna Mampe Soares-Sello, *PhD*, Bristol **1997**
- 79 J.M. Risley, R.L. Van Etten, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 4609-4614
- 80 J.M. Risley, R.L. Van Etten, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 6699-6702
- 81 Gerhard Michal (Hsrg.), *Biochemical Pathways*, **1999**
- 82 C. Hertweck, B. Moore, *Tetrahedron* **2000**, 56, 9115-9120
- 83 S. Grond, *Dissertation*, Universität Göttingen **1997**

-
- 84 Z. Zouchova, M. Wurst, F. Nerud, V. Musilek, *Folia Microbiol.* **1982**, 27, 446-450
- 85 S. Unversucht, K.H. van Pee, *Chemosphere* **2003**, 52, 299-312
- 86 P. Chandra, L.C. Vining, *Canadian Journal of Microbiology* **1968**, 14, 573-578
- 87 M. Sancelme, S. Fabre, M. Prudhomme, *Journal Antibiotics (Tokyo)* **1994**, 47, 792-798
- 88 T. Anke, H.J. Hecht, G.Schramm, W. Steglich, *J. Antibiot.*, **1979**, 32, 1112-1117
- 89 T. Gulder, G. Brinkmann, 25. *Tübinger-Göttinger-Gespräche*, **2004**
- 90 H.O. Kalinowski, S. Berger, S.Braun, *¹³C-NMR-Spektroskopie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York, **1984**

D. ANHANG

C-Atom	^{13}C -NMR δ_{C} (ppm)	Früh (2 -3 Tag)	Spät (5 – 6 Tag)	Früh 1:1	Lang (2 -6 Tag)
1	132.43	1.15	---	- 1.43	- 0.71
2	127.16	- 0.09	- 0.53	- 0.72	- 0.15
3	129.59	- 0.07	- 0.27	- 0.62	- 0.11
4	128.21	Normiert	Normiert	Normiert	Normiert
5	129.59	- 0.07	- 0.27	- 0.62	- 0.11
6	127.16	- 0.09	- 0.53	- 0.72	- 0.15
7	131.89	0.81	- 0.57	- 0.65	- 0.19
8	127.83	0.99	- 0.42	- 1.28	- 0.54
9	130.9	23.53	3.59	8.96	26.7
10	139.19	1.71	---	- 1.26	- 0.48
11	111.6	45.07	1.51	6.30	12.69
12	160.9	0.29	0.17	- 0.92	- 0.50
13	169.5	31.05	1.26	7.71	10.18
14	23.8	0.02	0.53	- 0.87	- 0.35
15	62.3	0.95	0.29	1.69	1.09
16	51.9	1.15	- 0.02	1.06	0.76

Tabelle 15: Spezifische Einbauraten [%] der Fütterungsexperimente mit $[1-^{13}\text{C}]$ Acetat an *Strobilurus tenacellus* zu verschiedenen Zeiten der Fermentation (vermessen in CD_3OD).

C-Atom	^{13}C -NMR δ_{C} (in ppm)	[3- ^{13}C]Phenylalanin	[2,3- $^{13}\text{C}_2$]Phenylalanin	[^{13}C -Methyl] Methionin
1	132.43	- 0.71	- 1.09	- 0.64
2	127.16	- 0.51	- 0.89	- 0.28
3	129.59	- 0.52	- 0.60	- 0.37
4	128.21	- 0.40	- 0.52	- 0.13
5	129.59	- 0.52	- 0.60	- 0.37
6	127.16	- 0.51	- 0.89	- 0.28
7	131.89	13.13	13.75	- 0.30
8	127.83	- 0.62	- 0.96	- 0.55
9	130.9	Normiert	Normiert	Normiert
10	139.19	- 0.70	- 1.19	- 0.54
11	111.6	- 0.65	- 1.42	- 0.77
12	160.9	- 0.26	- 0.18	- 0.23
13	169.5	- 0.61	- 1.28	- 0.66
14	23.8	- 0.41	- 0.51	17.75
15	62.3	0.57	1.38	42.66
16	51.9	0.44	0.86	42.98

Tabelle 16: Spezifische Einbauraten [%] der Fütterungsexperimente mit ^{13}C markiertem Phenylalanin und Methionin an *Strobilurus tenacellus* (vermessen in CD_3OD).

C-Atom	^{13}C -NMR δ_{C} (in ppm)	$[1-^{13}\text{C}]$ Acetat	$[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat	$[3-^{13}\text{C}]$ Phenylalanin	$[2,3-^{13}\text{C}_2]$ Phenylalanin
1	126.42	- 0.24	Nein	- 0.14	0.05
2	128.46	- 0.06	Nein	- 0.17	0.00
3	127.37	- 0.32	Nein	0.04	0.12
4	128.46	- 0.06	Nein	- 0.17	0.00
5	126.42	- 0.24	Nein	- 0.14	0.05
6	136.98	- 0.35	Nein	- 0.20	- 1.36
7	132.51	- 0.32	Nein	18.59	10.18
8	129.54	- 0.25	Ja	- 0.16	0.52
9	85.03	15.64	Ja	- 0.16	- 0.07
10	35.60	- 0.36	Ja	- 0.19	- 0.11
11	112.23	20.08	Ja	0.07	0.10
12	159.47	- 0.55	Ja	0.12	0.32
13	168.19	13.86	Ja	- 0.10	- 0.12
14	15.70	Normiert	Nein	Normiert	Normiert
15	61.31	- 0.23	Nein	- 0.02	0.13
16	50.94	- 0.36	Nein	0.03	0.00
17	56.53	- 0.35	Nein	- 0.18	- 0.03

Tabelle 17: Spezifische Einbauraten [%] der Fütterungsexperimente an *Oudemansiella mucidia* (vermessen in CD_3OD).

Lebenslauf

Am 9. September 1971 wurde ich als drittes Kind von Inge Thormann, geb. Riecken und Bodo Thormann in Lüneburg geboren.

Von September 1978 bis Juli 1982 besuchte ich die Grundschule Lüne und bis Juni 1984 die Orientierungsstufe Bardowick. Ab August 1984 war ich Schüler der Christiani Schule, die ich im Mai 1989 mit dem Realschulabschluß verließ. Von August 1989 bis Juni 1990 besuchte ich die BBS III in Lüneburg mit dem Schwerpunkt Naturwissenschaften. Von August 1990 an besuchte ich den doppelqualifizierenden Bildungsgang BIM an der Staatlichen Gewerbeschule G13 in Hamburg-Bergedorf in Zusammenarbeit mit der Gesamtschule HH-Bergedorf, den ich im Juni 1994 mit der Allgemeinen Hochschulreife und der abgeschlossenen Ausbildung zum CTA verließ.

Zum Wintersemester 1994/1995 begann ich mit dem Studium für das Lehramt an Gymnasien mit den Fächern Chemie, Biologie, Pädagogik und Politik an der Georg-August Universität in Göttingen, wo ich im April 1998 die Zwischenprüfung bestand. In der Zeit von Januar 2000 bis Juni 2000 fertigte ich im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Zeeck meine Staatsexamensarbeit mit dem Titel „Isolierung und spektroskopische Charakterisierung antifungisch wirksamer Naturstoffe aus einem Streptomycesstamm“ an. Im September 2000 folgten die Examensklausuren in Chemie und Biologie. Die abschließenden mündlichen Prüfungen zur Erlangung des Ersten Staatsexamens für das Lehramt an Gymnasien absolvierte ich im Dezember 2000.

Seit Februar 2001 arbeite ich unter der Anleitung von Prof. Dr. A. Zeeck an der vorliegenden Dissertation.

Danksagung

Für die Überlassung der beiden Basidiomyceten Stämme danke ich Herrn Prof. T. Anke von der Universität Kaiserslautern. Herrn Prof. T. Simpson FRS von der University of Bristol danke ich für die Überlassung des Skriptes, „Biosynthetic studies of Strobilurins“ von A.M. Soares-Sello, das unter seiner Leitung angefertigt wurde, sowie für die in seinem Arbeitskreis synthetisierten Fluor-Vorläufer und die anregenden Gespräche.

Mein besonderer Dank gilt Jutta Gerber-Nolte für das Arbeiten im Dunkeln mit kleinen Mengen und vielen Messungen und Tests in letzter Minute. Nicht zu vergessen die Arbeitsgespräche mit Kaffee auf dem Flur, sowie die netten Gespräche zwischendurch. Ebenso gilt mein Dank H.J. Langer für die vielen Versuch eine Fermentation im Fermenter zu erreichen.

Frau G. Udvarnoki und Herrn Dr. H. Frauendorff danke ich für die Aufnahme der Massespektren. Herrn F. Hambloch danke ich für die GC-EI-MS Messung. Für die HPLC-EI-MS Experimente danke ich K. Ströch.

Für die Aufnahme der NMR-Spektren Danke ich Carola Zolke, Martin Weitemeyer, Christiane Siebert und den NMR-Operatoren aus der Abteilung: Diana Wolff, Oliver Schlörke, Inken Plitzko, Sven Meyer, Tim Schuhmann und Frank Surup.

Ein ganz herzliches Dankeschön an Inken Plitzko, Diana Wolff, Oliver Schlörke, Sven Meyer, Karsten Ströch und meinem Vater für das konstruktive und sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen Mitgliedern der Abteilung danke ich für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Atmosphäre, den Kaffeepausen mit viel Kuchen und dem ein oder anderen Feierabendschoppen sowie die gemeinsam verbrachten Abende, ohne über die Arbeit zu reden.

An dieser Stelle auch einen Dank an Tina, Sven und Chris für die schönen gemeinsamen Studienjahre, Jörg für die netten Abende in Göttingen und Mario für die erholsamen Tage in Baden Baden.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben. Darüber hinaus meiner Mutter und meiner Schwester Tanja für die liebevolle Aufmunterung und Unterstützung und meiner Schwester Sabina.