

**Modellsynthesen und Strukturaufklärung von Polyketiden
sowie Arbeiten zur Biosynthese von Mimosin**

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

Vorgelegt von
Falko Degenhardt
aus Kassel

Göttingen 2000

D 7

Referent: Prof. Dr. J. Rohr

Korreferent: Prof. Dr. A. de Meijere

Tag der mündlichen Prüfung: 30.10.2000

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische
Chemie der Universität Göttingen von Juli 1997 bis
August 2000 unter Anleitung von Prof. Dr. Jürgen Rohr
durchgeführt

Herrn Prof. Dr. Jürgen Rohr danke
ich für die Überlassung der
hochinteressanten Themen sowie
für viele Anregungen und Diskussionen

A. THEORETISCHER TEIL	1
1. ALLGEMEINE EINFÜHRUNG	1
1.1 EINLEITUNG	1
1.2 AUFGABENSTELLUNG	5
2. POLYKETIDE.....	7
2.1 EINFÜHRUNG	7
2.2 KOMBINATORISCHE BIOSYNTHESE.....	11
2.3 POLYKETIDSYNTHESEN	17
2.4 SYNTHESSTRATEGIE	20
2.5 DARSTELLUNG VON 3-HYDROXYHOMOPHTHALAT (12).....	22
2.6 KETTENVERLÄNGERUNG AN HOMOPHTHALSÄUREESTER (12)	27
2.7 KETTENVERLÄNGERUNGEN AN 1,8-DIHYDROXY-2-(METHOXYCARBONYL)-3-NAPHTHYL ACETAT (13).....	29
2.7.1 Darstellung des Naphthalenderivates (13).....	29
2.7.2 Kettenverlängerungen zu (22) und (23).....	30
2.8 DISKUSSION UND AUSBLICK	32
3. MAKROPOLYENE BZW. POLYEN-MAKROLIDE.....	36
3.1 EINFÜHRUNG	36
3.2 DIE BESONDERHEIT DER MAKROPOLYENE.....	42
3.3 STREPTOMYCES Sp106	47
3.3.1 Fermentation und Isolierung	47
3.4 STRUKTURAUFKLÄRUNG	49
3.4.1 Literaturrecherche	49
3.5 STRUKTURAUFKLÄRUNG VON SUBSTANZ 4 (33) BZW. RIMOCIDIN	50
3.6 DERIVATISIERUNG VON RIMOCIDIN.....	51
3.6.1 Acetylierung der Aminogruppe	51
3.6.2 Amidierung der Carbonsäuregruppe an Position 14	52
3.7 STRUKTURAUFKLÄRUNG VON RIMOCIDIN-DERIVAT (37)	53
3.7.1 Mycosamin-Derivat (38).....	53
3.8 CHARAKTERISIERUNG DER STRUKTUREN VON SUBSTANZ 2 (32)	57
3.8.1 Aufklärung des Zuckers: Mycosamin(35).....	57
3.8.2 Teilstruktur A vom Aglykon	59
3.8.3 Teilstruktur B.....	60
3.8.4 Teilstruktur C.....	62
3.8.5 Nebenprodukte Substanz 1 (39) und Substanz 3	63
3.8.6 Test auf Aktivität gegen Hefepilze	63
3.9 DISKUSSION UND AUSBLICK	65
4. MIMOSIN	66
4.1 EINFÜHRUNG	66
4.2 DETAILS ZU DER PFLANZENART <i>LEUCAENA LEUCOCEPHALA</i>	67
4.2.1 Geschichte	68
4.2.2 Verwendung.....	68
4.2.3 Nährstoffgehalt von <i>Leucaena leucocephala</i>	68
4.2.4 Verwendung als Futtermittel für Tiere	69
4.2.5 Problem mit Pflanzenschädlingen.....	69
4.2.6 Toxizität von Mimosin (40) und 3,4-Dihydropyridin (41)	69
4.3 PHARMAKOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN	71
4.3.1 Mimosin (40) als Tyrosin Antagonist	71
4.3.2 Mimosin (40) als potentiell Antikrebsmittel.....	72
4.3.3 Auswirkungen von Mimosin (40) auf HIV-1 Viren.....	72
4.4 SYNTHESE VON MIMOSIN (40)	73
4.4.1 Verwendung von Mimosin (40) in der Peptidchemie.....	73
4.5 ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON MIMOSIN (40) UND DIHYDROXYPYRIDIN (41) AUS <i>L. LEUCOCEPHALA</i>	74
4.5.1 Bekannte Methoden.....	74

Inhaltsverzeichnis

4.5.2 Isolierung von Mimosin (40).....	74
4.6 SPEKTROSKOPISCHE DATEN.....	76
4.6.1 Mimosin (40).....	76
4.6.2 3,4-Dihydroxypyridin (41).....	77
4.7 STAND DER BISHERIGEN FORSCHUNGEN ZUR BIOSYNTHESE VON MIMOSIN (40).....	78
4.7.1 Studien mit [2- ¹⁴ C]-DL-Lysin-monochlorid (42).....	78
4.7.2 Fütterungsversuche mit [3- ¹⁴ C]-Asparaginsäure (45).....	80
4.7.3 Bekannte Biosynthesen von Lysin (42).....	81
4.7.4 Cystein Synthase katalysiert Mimosinbildung.....	83
4.8 ZUSAMMENFASSUNG DER LITERATURDATEN.....	84
4.9 NEUE BIOSYNTHETISCHE STUDIEN.....	86
4.9.1 Biosynthetische Studien mit markiertem Lysin (42).....	86
4.10 WIE ÜBERFÜHRT MAN DIE MARKIERTEN SUBSTANZEN IN DIE PFLANZE?.....	88
4.10.1 I.D. Spenser's Methode.....	88
4.10.2 J.W. Hylin's Methode.....	89
4.10.3 Fütterung an einem abgeschnittenen Zweig.....	90
4.11 FÜTTERUNGSEXPERIMENTE.....	91
4.11.1 Vorversuche.....	91
4.11.2 Versuche zur Steigerung der Mimosinproduktion.....	92
4.11.3 Radioaktive Fütterungsversuche mit ¹⁴ C-L-Lysin (42).....	94
4.11.4 Versuchsbedingungen.....	94
4.11.5 Allgemeine Meßprozedur.....	95
4.11.6 Daten zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität.....	96
4.11.7 Fütterungsversuche.....	96
4.12 FÜTTERUNG MIT [2- ¹³ C]-DL-LYSIN * 2HCL (42).....	98
4.12.1 Begründung.....	100
4.13 RADIOAKTIVE FÜTTERUNG MIT GERINGER LYSIN-KONZENTRATION.....	101
4.14 RADIOAKTIVE FÜTTERUNGEN NACH DER METHODE VON J.W. HYLIN.....	101
4.15 ENTWICKLUNG EINES SYSTEMS FÜR SPEZIELLE FÜTTERUNGSEXPERIMENTE UND SPÄTERE GENETISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	103
4.15.1 Kultivierung von Pflanzenzellen (Kallus).....	103
4.15.2 Testen verschiedener Regulatoren.....	107
4.15.3 Beobachtungen der Untersuchungen.....	109
4.16 DISKUSSION UND AUSBLICK.....	110
5. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	113
1. POLYKETIDSYNTHESE.....	113
2. MAKROPOLYENE.....	113
3. BIOSYNTHESE VON MIMOSIN (40).....	114
B. EXPERIMENTELLER TEIL.....	115
1. ALLGEMEINE METHODEN.....	115
2. POLYKETIDSYNTHESEN.....	122
2.1 DARSTELLUNG VON 3-TRIMETHYLSILOXYBUT-2-ENOAT (17)+(17').....	122
2.2 DARSTELLUNG VON (E)-1,3-BIS(TRIMETHYLSILOXY)-1-METHOXYBUTA-1,3-DIEN (15).....	123
2.3 DARSTELLUNG VON DIMETHYL 3-HYDROXYHOMOPHTHALAT (12).....	124
2.4 DARSTELLUNG VON SUBSTANZ (20).....	128
2.5 DARSTELLUNG VON METHYL 1,8-DIHYDROXY-2-(METHOXYCARBONYL)-3-NAPHTHYL-ACETAT.....	130
2.6 DARSTELLUNG DER VERBINDUNG (22).....	131
2.7 DARSTELLUNG DER SUBSTANZ (23).....	133
3. STREPTOMYCES SP 106.....	135
3.1 KULTIVIERUNG DES STAMMS.....	135
3.2 RIMOCIDIN (33).....	136
3.3 DERIVATISIERUNG DER BEIDEN MAKROPOLYENE.....	137
3.3.1 Acetylierung der Aminogruppe am Zucker.....	137
3.3.2 Amidierung der Carbonsäuregruppe zum Derivat (37).....	138
3.4 RIMOCIDIN-DERIVAT (37).....	139

Inhaltsverzeichnis

3.5 SUBSTANZ 2 (32)	142
3.6 TEST AUF FUNGIZIDE WIRKUNG	145
4. MIMOSIN (40).....	146
4.1 ALLGEMEINE ISOLIERUNG VON MIMOSIN (40) UND 3,4-DIHYDROXYPYRIDIN (41)	146
4.2 MIMOSIN (40)	147
4.3 3,4-DIHYDROXYPYRIDIN (41)	148
4.4 EINBAUVERSUCH MIT [U- ¹⁴ C-L-LYSIN].....	149
4.5 EINBAUEXPERIMENT MIT [2- ¹³ C]-DL-LYSIN*2HCL.....	150
4.6 ABBAU VON MIMOSIN (40) NACH ADAMS	150
4.7 EINBAUEXPERIMENT VON RADIOAKTIVEM LYSIN MIT ABBAU VON MIMOSIN ZU 3,4-DIHYDROXYPYRIDIN	151
4.8 EINBAUEXPERIMENT NACH HYLIN	151
C. LITERATUR.....	152

A. Theoretischer Teil

1. Allgemeine Einführung

1.1 Einleitung

Wir befinden uns am Beginn eines neuen Jahrtausends, in dem ein Wandel der Wissenschaft stattfindet, der besonders durch die Informationstechnologie stark gefördert wird.

Die Verfügbarkeit von Informationen aus verschiedenen klassischen Wissenschaftsgebieten wie der organischen Synthese, Biochemie, Molekularbiologie, Genetik und der Verfahrenstechnik unter Verwendung von Bakterien, Pilzen, Zell- und Gewebekulturen ergibt neue aufstrebende Wissenschaftsfelder wie die Biotechnologie.

Das breite Spektrum der Anwendungsmöglichkeiten und das wirtschaftliche Potential der Biotechnologie reicht von der Medizin und der Pharmazie über die Chemie und den Pflanzenschutz bis hin zum Umweltschutz und der Gewinnung neuer Energieträger aus nachwachsenden Rohstoffen.

Enzyme werden beispielsweise immer öfter in chemischen Prozessen eingesetzt. Ihre hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität bei milden Reaktionsbedingungen in Kombination mit einer stetig steigenden kommerziellen Verfügbarkeit zu akzeptablen Preisen macht diese Biokatalysatoren zu einer attraktiven Alternative zu chemischen Katalysatoren und kann desweiteren zur Herstellung neuer Substanzen dienen^[1].

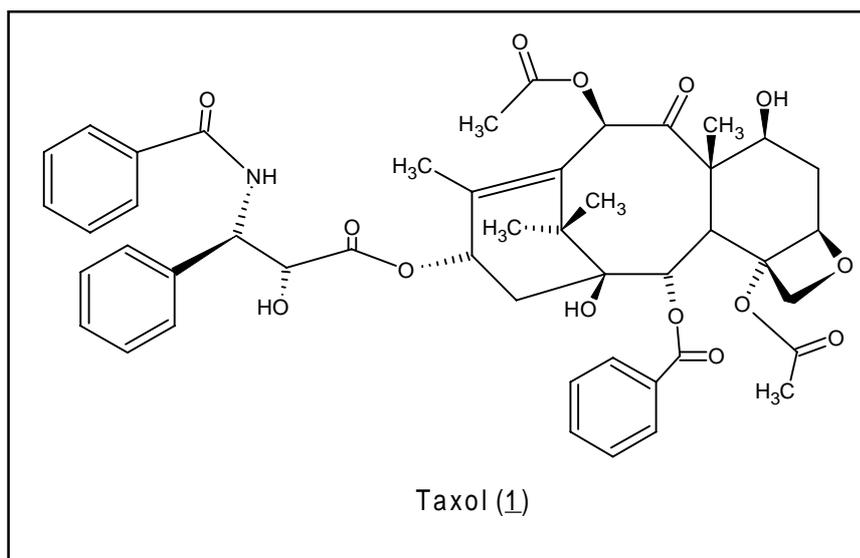
In der Pflanzenbiotechnologie werden heute schon Nutzpflanzen hergestellt, welche eine Resistenz gegen Pilze oder Insekten aufweisen. Die dadurch verbesserten Erträge und Einsparungen bei Pflanzenschutzmitteln sind enorm.

Der am schnellsten wachsende Teil der Biotechnologie ist der Medizin/Pharmabereich. Hier bieten die Molekularbiologie und Genetik die Möglichkeit durch Veränderung der Gene von Bakterien, Pilzen und Pflanzen neue Substanzen herzustellen, welche besonders für die Pharmaindustrie von Interesse sind. Man bezeichnet dieses Prinzip als kombinatorische Biosynthese. Sie gründet sich auf der Neukombination der Biosynthesegene und führt zu völlig neuen „unnatürlichen“ Naturstoffen.

Eine Studie des National Cancer Institute (NCI) belegt die Bedeutung von Naturstoffen für die Arzneimittelentwicklung, wobei ganze Therapiebereiche ohne die Anregung aus der Naturstoffforschung völlig brach liegen würden^[2].

Ein erfolgversprechendes Beispiel für die Suche nach Wirkstoffen ist das Zytostatikum Taxol (**1**) aus der Rinde einer pazifischen Eibenart (*taxus brevifolia*). Diese Entdeckung von (**1**) hat die Wirkstoffsuche in Pflanzen immer stärker in den Vordergrund gerückt. Im Pflanzenbereich läßt dabei vor allem die große Artenvielfalt des Meeres, insbesondere die der Algen auf ein großes, noch weitgehend unausgeschöpftes Potential für neue Wirkstoffe bzw. Leitstrukturen hoffen^[3].

Abb. 1: Taxol (1**)**



Der klinische Bedarf an Taxol (**1**) wird mittlerweile durch Semisynthese ausgehend von einer Taxol-Vorstufe abgedeckt, die man aus Nadeln einer europäischen Eibenart erhält. Mittlerweile konnte Taxol (**1**) auch durch Totalsynthesen hergestellt werden, doch diese sind im Vergleich zu den Partialsynthesen oder auch zu der Isolierung aus natürlichen Quellen aufwendiger und teurer^[4-6].

Am Anfang der Untersuchung eines Naturstoffes steht fast immer die Frage nach dessen chemischer Struktur und der Biogenese, d.h. die Suche nach den Grundbausteinen, aus denen der Naturstoff aufgebaut ist. Sie ist die Voraussetzung für eine weitergehende Erforschung der beim Aufbau ablaufenden Biosynthesemechanismen und der an den Reaktionen beteiligten Enzymen.

Die Untersuchung sowohl der Biogenese als auch der Biosynthese findet zumeist anhand von Einbauexperimenten mit hypothetischen Vorläufern der Naturstoffe statt, die entweder mit radioaktiven (beispielsweise ^{14}C , ^{32}P oder ^3H) oder stabilen (z.B. ^{13}C , ^{18}O , ^{15}N oder ^2H) Isotopen angereichert sind.

Beide Markierungsmethoden haben ihre Vor- und Nachteile. Während die Markierungen mit stabilen Isotopen eine ungefährliche Handhabung erlaubt, wird die Verwendung radioaktiver Isotope durch die hierbei notwendigen Sicherheitsvorkehrungen erschwert. Die Markierung mit radioaktiven Isotopen besitzt den Vorteil, daß aufgrund der hohen Nachweisempfindlichkeit der Strahlung auch noch bei sehr geringen Substanzmengen bzw. Einbauraten eine Detektion möglich ist. Um Informationen über den Einbauort zu erhalten, sind aber oftmals Abbaureaktionen notwendig, die sich insbesondere bei geringen Substanzmengen als schwierig erweisen.

Die bei den stabilen Isotopen vorteilhafte Detektion mit Hilfe der NMR-Spektroskopie erfordert bedingt durch die zum Teil schlechten Einbauraten und die relative Unempfindlichkeit dieser Messmethode die Verwendung größerer Mengen an Vorläufern.

Wird eine isotopenmarkierte Verbindung nicht in den zu untersuchenden Naturstoff eingebaut, muß überprüft werden, ob sie die Zellwand überhaupt passieren und an den Stoffwechselforgängen teilnehmen kann. Ist dies nicht der Fall, müssen bei einer Fütterung die Zellwände durch chemische oder mechanische Einflüsse passierbar gemacht werden. Es kann sogar die Entwicklung eines zell-

freien Systems notwendig werden. Um Fragen bezüglich des Reaktionsmechanismus von Enzymen zu klären, können Synthesen von direkten Vorläufersubstanzen durchgeführt oder Enzymreaktionen imitiert werden.

1.2 Aufgabenstellung

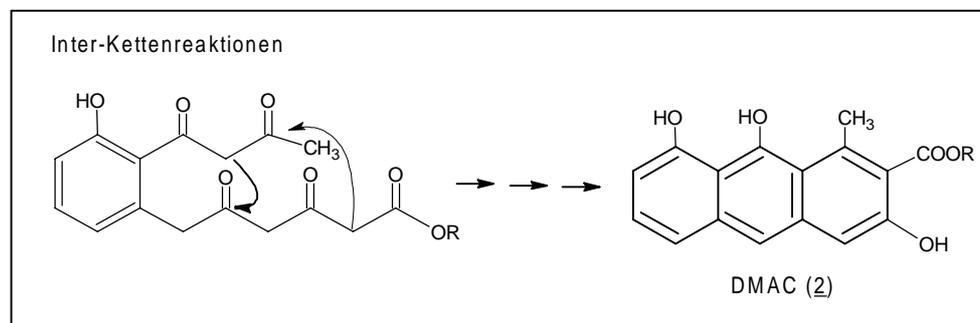
Die Arbeit zu dem Thema „Polyketide“ gliedert sich in zwei Abschnitte.

1. Abschnitt

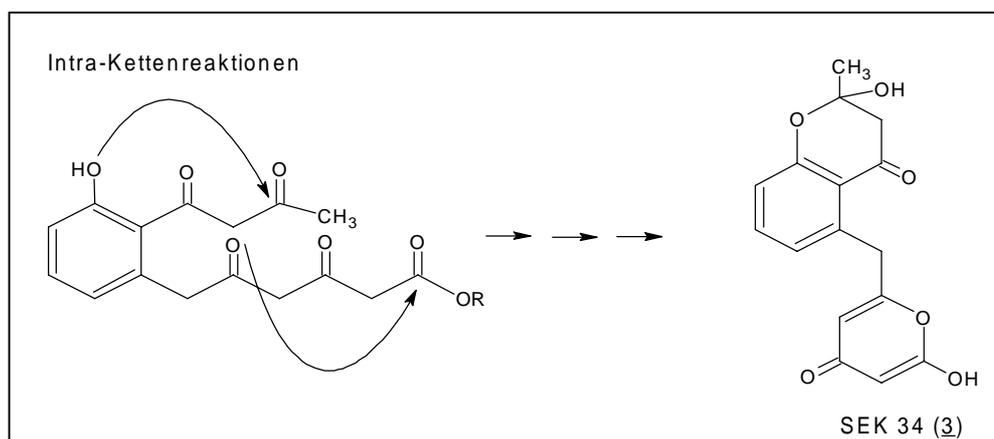
Im ersten Kapitel sollen die noch nicht geklärten Cyclisierungsvorgänge bei Typ-2-Polyketidsynthase (PKS) mit Hilfe von Modellsynthesen näher untersucht werden. Es ist bekannt, daß die erste Cyclisierung durch die „minimale PKS“ katalysiert wird. Der Mechanismus der darauffolgenden Ringschlüsse konnte bis heute noch nicht vollständig geklärt werden.

Man unterscheidet zwischen zwei Formen der Cyclisierung: Inter- und Intra-Kettenreaktion.

Bei der Inter-Kettenreaktion finden durch Aldolkondensationen Ringschlüsse zwischen den Ketten statt,



während die Intra-Kettenreaktion innerhalb der Seitenkette durch z.B. Lactonisierung zustande kommt.



Bei der Inter-Kettenreaktion geht man von einer enzymgesteuerten Reaktion aus. Der Grund dafür ist die zumeist beobachtete hohe Regiospezifität.

Dagegen wird von Intra-Kettenreaktionen angenommen, daß sie spontan ablaufen, da sie zumeist dann auftreten, wenn keine für Cyclisierungen verantwortliche Gene im Produzenten vorhanden sind.

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der spanischen Arbeitsgruppe von Professor F. Malpartida sollen im 2. Kapitel die Produkte eines im Target-Screening gegen Pilze auffällig geworden Bakterienstammes *Streptomyces sp. 106* isoliert, charakterisiert und ihre Struktur aufgeklärt werden.

Hierzu wurden uns die Zellkulturen übergeben, aus denen die auffällig gewordenen Substanzen isoliert werden sollten.

Meine Aufgabe bestand nun in der Isolation der Naturstoffe und deren Struktur-
aufklärung.

2. Abschnitt

Die Mimose *Leucaena leucocephala* ist eine vielseitig verwendbare Pflanzenart, die in den unterschiedlichsten Bereichen ihre Anwendungen findet, wie z.B. in der Masttierhaltung.

Eine auffällige Eigenschaft dieser Pflanze ist die Produktion der zytostatisch wirkenden Aminosäure L-Mimosin (**40**), wobei insbesondere der Biosyntheseweg interessant ist. Dieser sollte durch weitere Untersuchungen mittels Fütterungsexperimenten genauer erforscht werden, um so auf Möglichkeiten der Beeinflussung schliessen zu können. Dabei soll zum einen die Produktion von Mimosin (**40**) gestoppt werden, um so der Pflanze eine bessere Verträglichkeit als Futtermittel zu geben. Zum anderen wäre es möglich, die Biosynthese dahingehend zu verändern, daß Derivate von zytostatischem Mimosin (**40**) für medizinische Zwecke gebildet werden .

2. Polyketide

2.1 Einführung

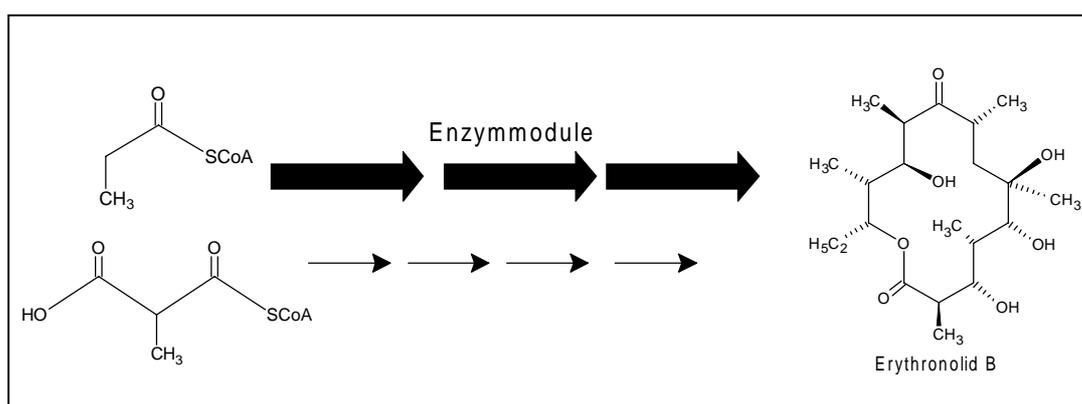
Die Gruppe der Polyketide gehört zu der größten und wichtigsten Verbindungsklasse innerhalb der Naturstoffe. Beeindruckend ist der Biosyntheseweg, der durch Polymerisation von Essig-, Malon- oder Propansäure zu Naturstoffen von hoher struktureller Komplexität und pharmazeutischer Wirksamkeit führt. Der Begriff Polyketide bei Naturstoffen lässt somit auf Verbindungen schließen, deren Grundgerüst aus mehreren Keto- bzw. Hydroxygruppen, getrennt durch Methylengruppen, besteht. Eine Vielzahl von Organismen wie z.B. Pflanzen, Pilze oder Bakterien sind in der Lage diese Art von Substanzen zu bilden. Die dabei isolierten Substanzen weisen eine therapeutische Vielseitigkeit auf, wobei das Spektrum von Antibiotika (z.B. Erythromycin), Antikrebsmitteln (z.B. Lovastatin), Immunsuppressiva (z.B. Rapamycin) bis zu Fungiziden (z.B. Amphothericin B) reicht. Die Entwicklung zu dem heute anerkannten Biosyntheseweg begann um die Jahrhundertwende mit den Theorien von Collie^[7] und wurde in den vierziger Jahren von Robinson^[8] weiterentwickelt. Aber erst der im Jahr 1953 von Birch und Donovan^[9] formulierte Biosyntheseweg führte zu einer breiten Akzeptanz. Demnach verläuft der Biosyntheseweg der Polyketide und der Fettsäuren nach einem ähnlichen Schema ab, bei dem durch mehrfach nacheinander stattfindende Claisenkondensationen von CoA-Thioestern Polyketidgerüste bzw. die Fettsäure aufgebaut werden. Als Startereinheit fungiert bei der Biosynthese häufig Essigsäure (als Acetyl-CoA), während Malonyl-CoA den Baustein für die Kettenverlängerung darstellt. Auch Propionat (C₃-Einheit) oder Butyrat (C₄-Einheit) bzw. Methyl- oder Ethylmalonat können als Starter für die Kettenverlängerung verwendet werden, wodurch Kettenverzweigungen entstehen.

Der Unterschied zur Fettsäurebiosynthese^[10] liegt bei den Polyketiden in einem nicht vollständig durchlaufenen Reaktionszyklus, welcher verantwortlich für die Ausbildung von Keto- oder Hydroxygruppen, Doppelbindungen oder Methylengruppen und die variable Gestaltung der Stereochemie entstehender Chiralitätszentren ist^[11-13].

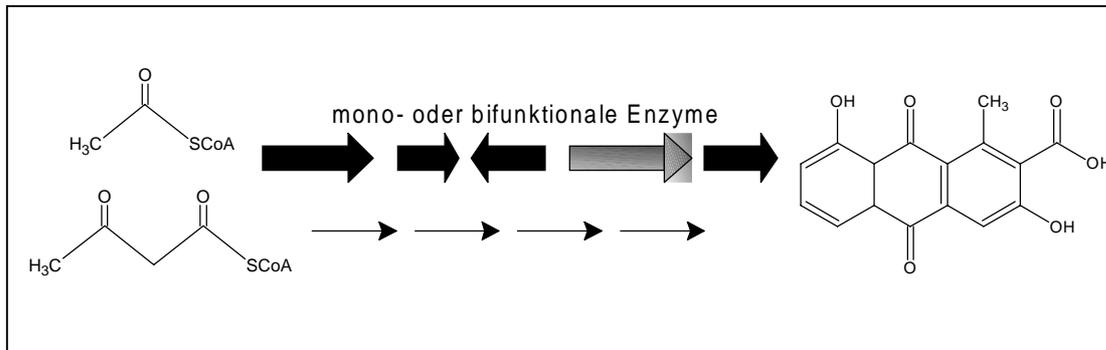
Ebenso wie bei den Fettsäuren unterscheidet man die Polyketidsynthesen (PKS) in zwei Typen: Typ-1-PKS katalysieren die Biosynthese von Polyethern und Makroliden (**siehe Kap. 3**), während Typ-2-PKS die Synthese von polyzyklischen aromatischen Verbindungen wie z.B. Angucyclinen, Anthracyclinen oder Tetracyclinen katalysieren^[12].

Dabei bestehen Typ-1-PKS aus großen, modular aufgebauten Multienzymkomplexen (**siehe Abb. 2**). Die in diesem Komplex enthaltenen Enzymmodule bestimmen zum einen den Aufbau der Kette durch Acyltransferase und β -Ketosynthase und je nach Genprogramm die jeweiligen Enzyme wie Keto-Reduktase (KR), Dehydratase (DH) und Enoyl-Reduktase (ER).

Abb. 2: Beispiel für Typ-1-PKS

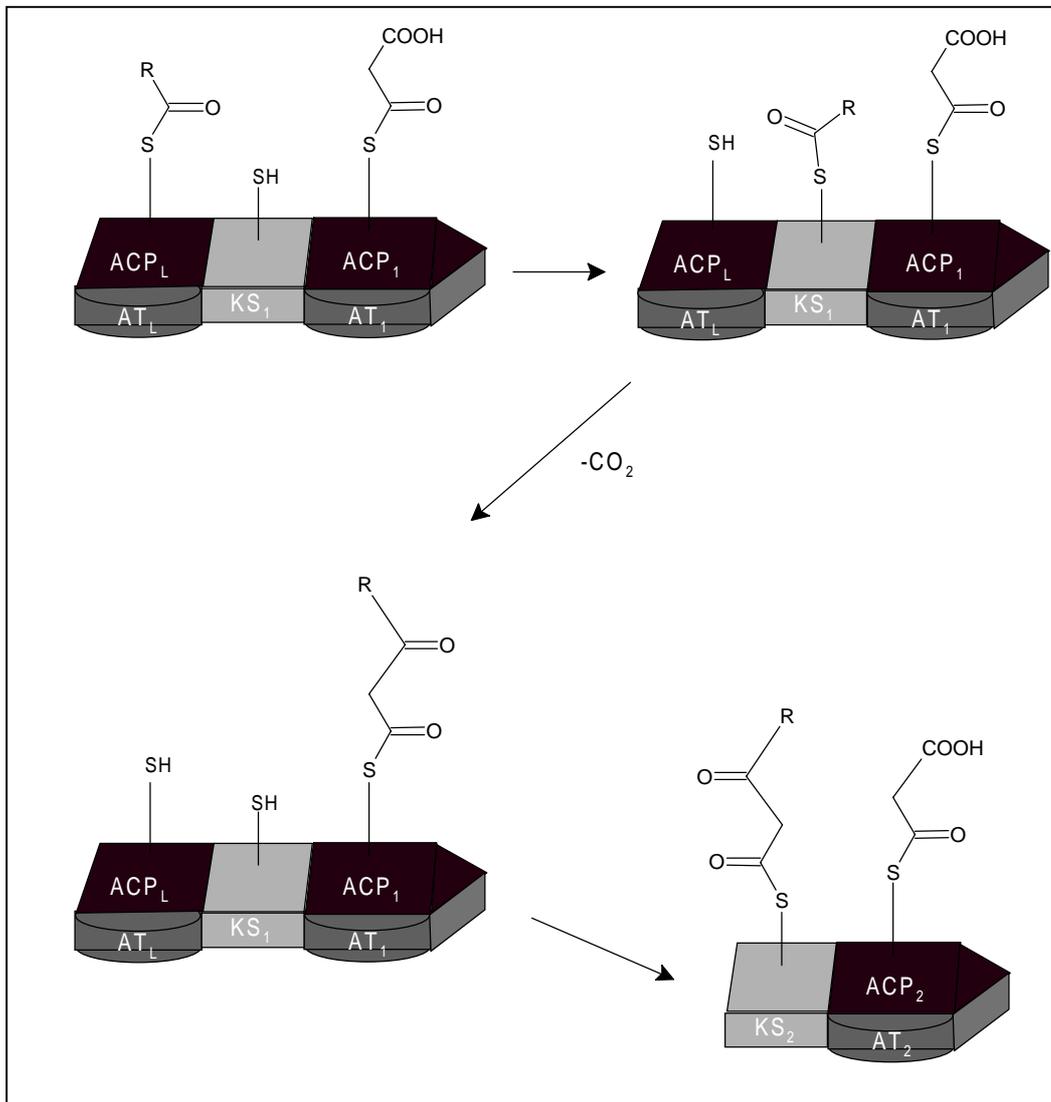


Typ-2-PKS bestehen dagegen aus nur einem einzelnen Satz monofunktionalen oder sogar bifunktionalen Enzyme (**siehe Abb. 3**). Zunächst wird die gesamte Polyketidkette durch aufeinanderfolgende Claisenkondensationen aufgebaut bis die gewünschte Kettenlänge erreicht ist. Durch die starke CH-Acidität der entstandenen Methylengruppen werden so nach geeigneter Faltung des Vorläufers intramolekulare Aldolkondensationen ermöglicht, die schließlich zu den stabilem aromatischen Sechsringen führen. Daneben gibt es aber auch Ringschlüsse (z.B. Hemiketalbildung oder Lactonisierung), bei denen man vermutet, daß sie unkatalysiert zum thermodynamisch stabilen Produkt führen. Nachdem das Grundgerüst aufgebaut worden ist, folgen die post PKS Modifikationen, wie z.B. Oxidationen, Reduktionen, Alkylierungen und Glykosylierungen.

Abb. 3: Beispiel für Typ-2-PKS

Die für den Aufbau des Grundgerüsts zuständigen Gene sind heute größtenteils charakterisiert und sollen deshalb hier nur kurz aufgeführt und erklärt werden. Man bezeichnet diesen Teil der Gene als „minimale PKS“. Sie enthält eine β -Keto-Synthase (KS), mit deren Hilfe die Claisenkondensation stattfindet, eine damit gekoppelten Acyltransferase (AT), die die Startereinheit zur Ketosynthese transportiert, einem Kettenlängenfaktor, der die Kettenlänge bestimmt und einem Acylcarrierprotein (ACP), an das die Polyketidkette gebunden ist. **(Siehe Abb. 4)** Unter die post-PKS-Gene fallen Ketoreduktasen (KR), die eine Carbonylgruppe zur Hydroxygruppe reduzieren. Die Aromatasen (ARO) und Cyclasen (CYC) sind verantwortlich für die spezifischen Ringformationen, die größtenteils dem Reaktionstyp einer intramolekularen Aldolkondensation gleichen^[14].

Abb. 4: Minimale Polyketidsynthese



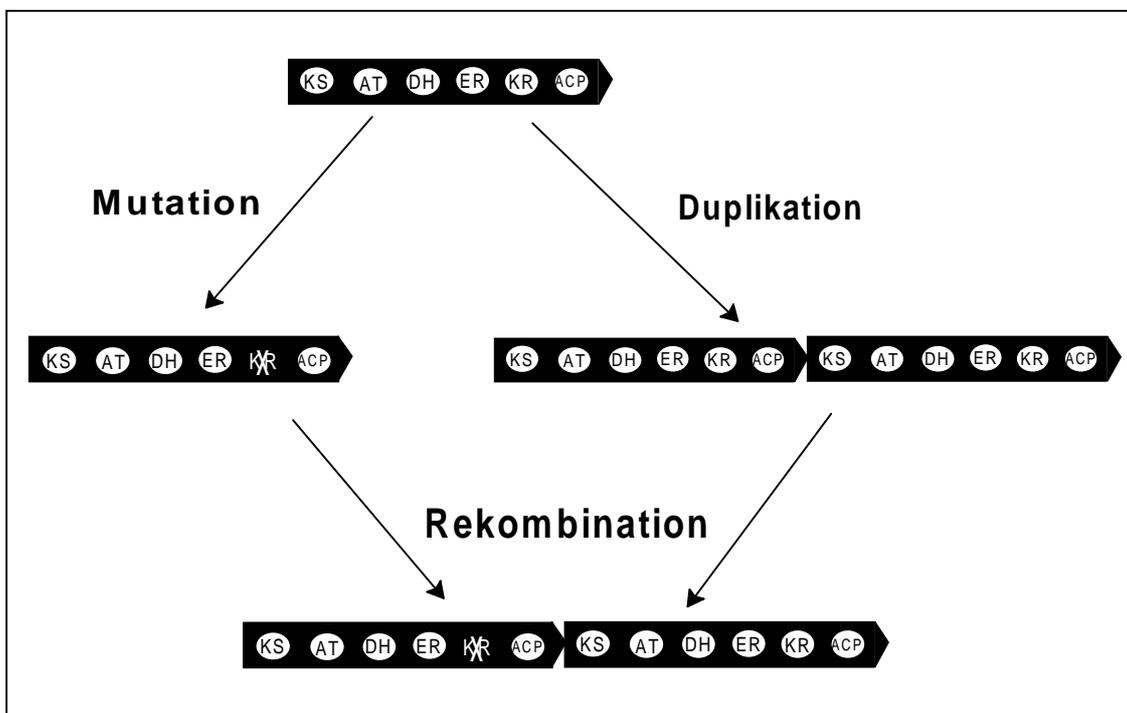
2.2 Kombinatorische Biosynthese

Mutationen und systematischer Austausch von Typ-2-PKS und auch Typ-1-PKS Genen sind die Grundsteine, die uns in heutiger Zeit einen Einblick in die Funktionen und Wirkungsweisen von Genen geben und ausschlaggebend für den neuen Wissenschaftszweig der kombinatorischen Biosynthese sind.

Hierbei kann durch Rekombination einzelner Gene eine Vielzahl von sogenannten „unnatürlichen“ Naturstoffen gebildet werden, die durch organische Synthesen nicht so einfach zugänglich wären. Diese gentechnisch hervorgebrachte Evolution kann durch die im Schema (siehe **Abb. 5**) dargestellten Prozesse erreicht werden.

Desweiteren wird durch diese Vielzahl von Produkten die Suche nach neuen Wirkstoffen für die Medizin erleichtert.

Abb. 5: Wichtige gentechnische Prozesse



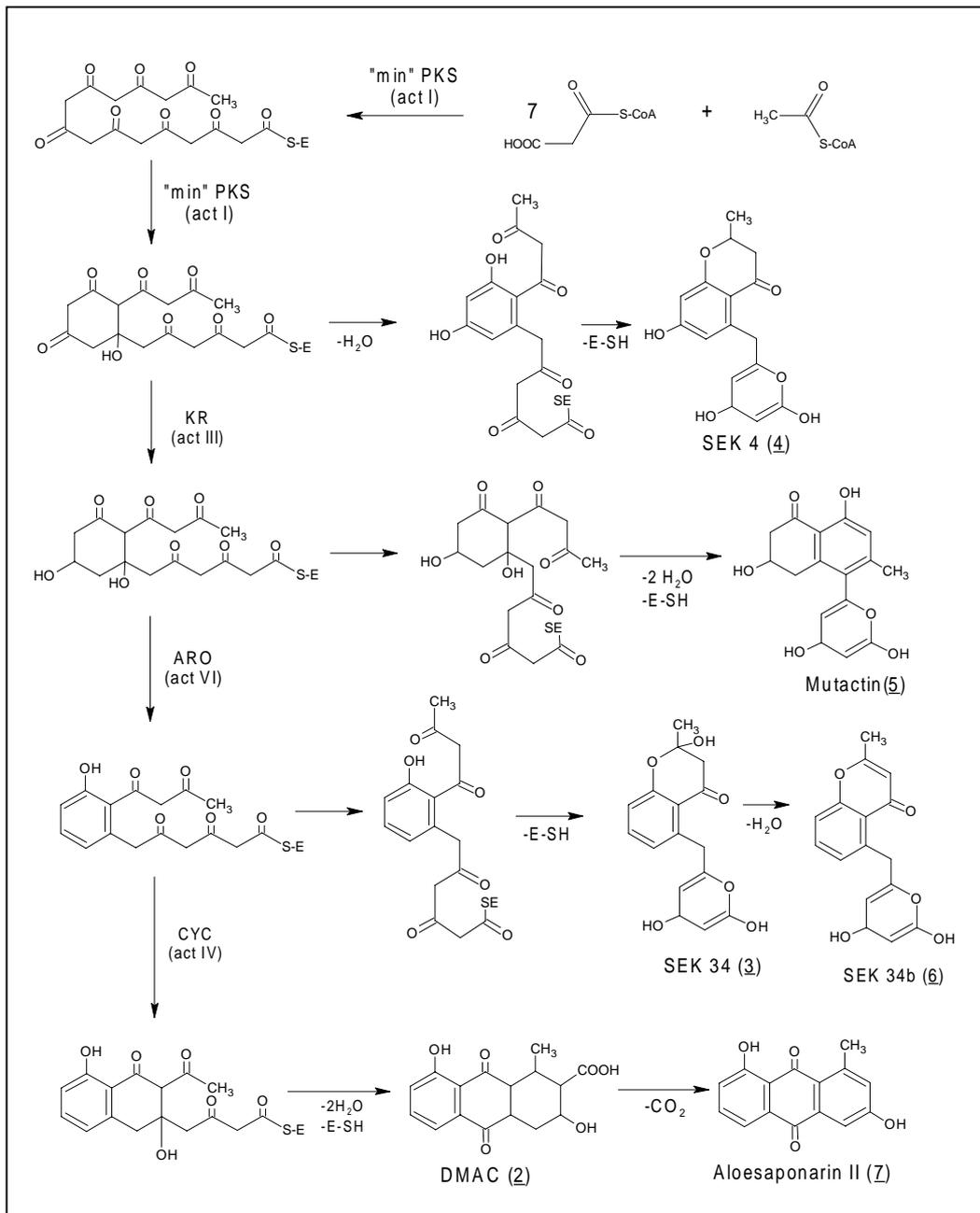
Dies alles wäre aber nicht möglich ohne die Entwicklung von aktiven zellfreien Enzymsystemen, kinetischen Studien, Strukturaufklärungen, Katalysemechanismen und durch die Sequenzierung der einzelnen Genabschnitte.

Die hier beschriebenen Erkenntnisse beruhen zu einem großen Teil auf den Arbeiten von D.A. Hopwood, B. Shen, C. Khosla und R. Hutchinson^[14-16].

Als Grundlage ihrer Arbeiten diente der Bakterienstamm *Streptomyces coelicolor*, der das antibiotische Oktaketid Actinorhodin produziert. Aus dem Wildstamm konnte durch das Entfernen der Actinorhodin-Biosynthesegene der Stamm *Streptomyces coelicolor* CH999 gebildet werden, der als Genakzeptor fungieren konnte. Die Biosynthesegenkassetten konnten in die Plasmide eingefügt werden, welche als Gendonoren fungierten. Somit war mit dem Stamm *S. coelicolor* CH999 ein flexibles Wirts/Vektor-System geboren, mit dem man durch gezielten Einbau von Biosynthesegenen Hybridnaturstoffe produzieren konnte.

Es konnte folgendes Schema (**siehe Abb. 6**) für die Arbeiten mit Actinorhodin-Biosynthesegenen aufgestellt werden^[13].

Abb. 6: SEK-Biosynthese

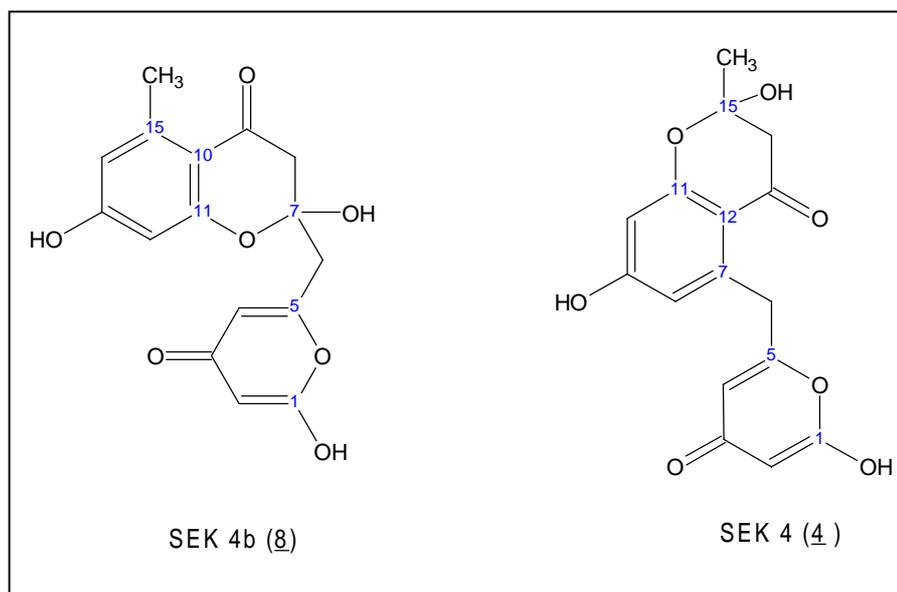


Bei genauerer Betrachtung der Produkte, kann man erkennen das SEK 4 (**4**) und SEK 34 (**3**) exakt dasselbe Cyclisierungsmuster aufweisen, während beim Mutactin (**5**) der zweite Ringschluss nicht durch eine Hemiketalbildung, sondern durch eine Aldolkondensation zwischen der Methylene- und der Carbonylgruppe zustande kommt. Vermutlich ist durch die nicht erfolgte Aromatisierung des ersten Ringes der Enolcharakter der an Position 11 liegenden Carbonylgruppe nicht ausgeprägt genug, um zu einer Hemiketalisierung zu führen. Das Interessante ist,

daß die act „min“ PKS in Anwesenheit einer Ketoreduktase ausschließlich die Synthese von Mutactin (**5**) katalysiert, und dabei keine Nebenprodukte gefunden werden können. Die Aldolkondensation zwischen der Methylengruppe (Pos. 6) und der Ketogruppe (Pos.15), die zum Aufbau des zweiten Rings führt, läuft vollkommen selektiv ab, obwohl keine Enzyme daran beteiligt sein sollen. Eigentlich wäre auch eine Aldolkondensation zwischen den Positionen 4 und 13 möglich wie ebenfalls eine Cyclisierung die zum DMAC (**2**) führen könnte. Das dennoch ausschließlich Mutactin (**5**) zu finden ist läßt einerseits die Möglichkeit einer Cyclase zu, welche bis dato noch nicht charakterisiert worden ist oder es verweist andererseits auf eine vorhergehende Lactonisierung, die zu dem Pyronring führen könnte und somit nur noch die 6/15 Cyclisierung zulassen würde. Insgesamt beobachtet man drei verschiedene spontane Cyclisierungen: die Hemiketalbildung, die 4-Pyronbildung und die 6/15-Aldolkondensation. Aufgrund dieser Aspekte lassen sich den Reaktionen Prioritäten zuordnen, wobei offenbar Intra-Cyclisierungen eine höhere Bildungstendenz als die Inter-Cyclisierungen aufweisen.

Ein noch nicht genannter Aspekt betrifft die Regioselektivität des ersten Ringschlusses.

Alle Hybridnaturstoffe in dem oben gezeigten Schema weisen am ersten Ring eine Cyclisierung zwischen der 7-Carbonyl- und 12-Methylengruppe auf, die durch Aldoladdition zustande kommt. Da diese Cyclisierung bereits bei SEK 4 (**4**) auftritt, wurde angenommen, daß die „min PKS“ nicht nur die Synthese des offenkettigen Polyketids katalysiert, sondern auch die regioselektive erste Cyclisierung. Im Widerspruch dazu steht jedoch das Auffinden von SEK 4b (**8**) (**siehe Abb. 7**), dessen Synthese ebenfalls nur durch die act „min“ PKS katalysiert wird. Es handelt sich dabei aber nicht wie beim SEK 34b (**6**) um das dehydratisierte Produkt, sondern um ein Produkt, das durch die zur 7/12-Aldolkondensation konkurrierende 10/15-Aldolkondensation als einleitende Cyclisierung gebildet wird. Die nachfolgenden Ringschlüsse kommen wie beim SEK 4 (**4**) durch Lactonisierung zwischen der C-1- und C-5 Position und einer Hemiketalbildung, mit der durch vorherige Aromatisierung entstandenen Hydroxygruppe an Position 11, zustande. Für die Bildung des stabilen sechsgliedrigen Heterocyclus steht hier nicht die 15-Carbonyl-, sondern einzig die 7-Carbonylgruppe zur Verfügung.

Abb. 7: Darstellung der Strukturen SEK4 (4) und SEK4b (8)

Es wird nun vermutet, daß durch zeitliche Kontrolle des Kettenablösevorgangs das zuerst synthetisierte Methylende des offenkettigen Polyketids auch zuerst von dem Enzym gelöst wird und dabei bereits eine spontane Cyclisierung zwischen den Positionen C-15 und C-10 stattfindet. Das Carboxylende ist in diesem Fall dann noch an das Enzym gebunden^[15].

Wie wichtig die Erforschung von Cyclisierungsreaktionen ist, zeigt sich bei der Bildung längerer Polyketidketten, wie den Dodecaketiden.

Die *whiE* (Sporenpigment) minimale PKS ist in der Lage eine Vielzahl von unterschiedlichen Polyketiden zu produzieren. Die Polyketide unterscheiden sich in der Kettenlänge und in der Cyclisierungsart^[17].

Man konnte bei den isolierten Dodecaketiden vier verschiedene Cyclisierungsarten des ersten Ringes beobachten, die ohne eine Cyclase d.h. spontan verlaufen. Diese regiospezifischen Cyclisierungen erfolgen zwischen C7/C12, C8/C13, C10/C15 und C13/C15. Es konnte aber kein Produkt mit einer normalerweise auftretenden C9/C14 Cyclisierung gefunden werden. Dieser Ringschluss wird durch eine Cyclase katalysiert.

Die verstärkt auftretende C7/C12 Cyclisierung des ersten Ringschlusses bei SEK 4 (4), und TW93a-e (siehe Abb. 8) läßt die Vermutung zu, daß die Regiospezifität dieser Cyclisierung vor anderen Ringschlusskombinationen favorisiert wird. Diese Cyclisierungsart findet vermutlich mittels indirekter Kontrolle der minimalen PKS

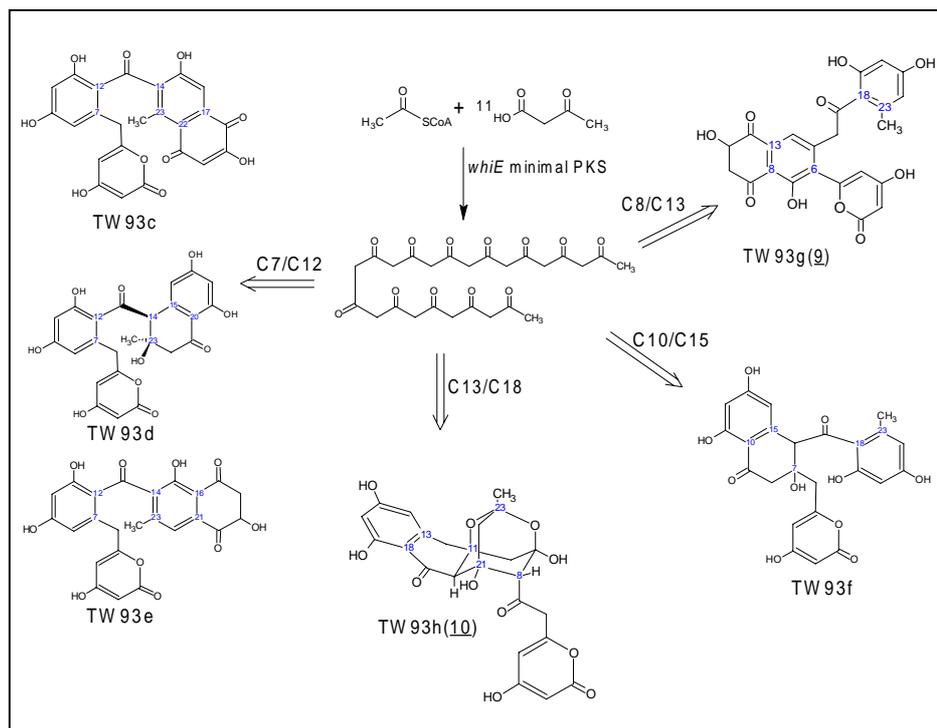
statt, indem durch Verknüpfung der Carboxylgruppe mit dem ACP (Acylcarrierprotein) die strukturelle Mobilität der linearen Polyketidkette eingeschränkt wird.

Durch den dabei energetisch günstigsten Übergangszustand kommt es zu einer spontanen Aldolkondensation zwischen C7/C12.

Alle Produkte weisen den 4-Hydroxy-2-pyrone-Ring auf, welcher bei den „unnatürlichen“ Polyketiden oft zu finden ist. Der energetische Zustand muß für diese Art von Ringschluss sehr günstig sein, während man Hemiketalverknüpfungen wie in SEK4 (**4**), SEK4b (**8**) oder SEK34 (**3**) in keinem dieser Produkte finden kann. Obwohl die Bildung von Hemiketalen in einigen dieser Verbindungen sehr leicht möglich wäre.

Zu einer in der Natur unüblichen Cyclisierung kommt es bei der Bildung von dem Produkt TW93h (**10**), woraus ein Dioxoadamantanring resultiert.

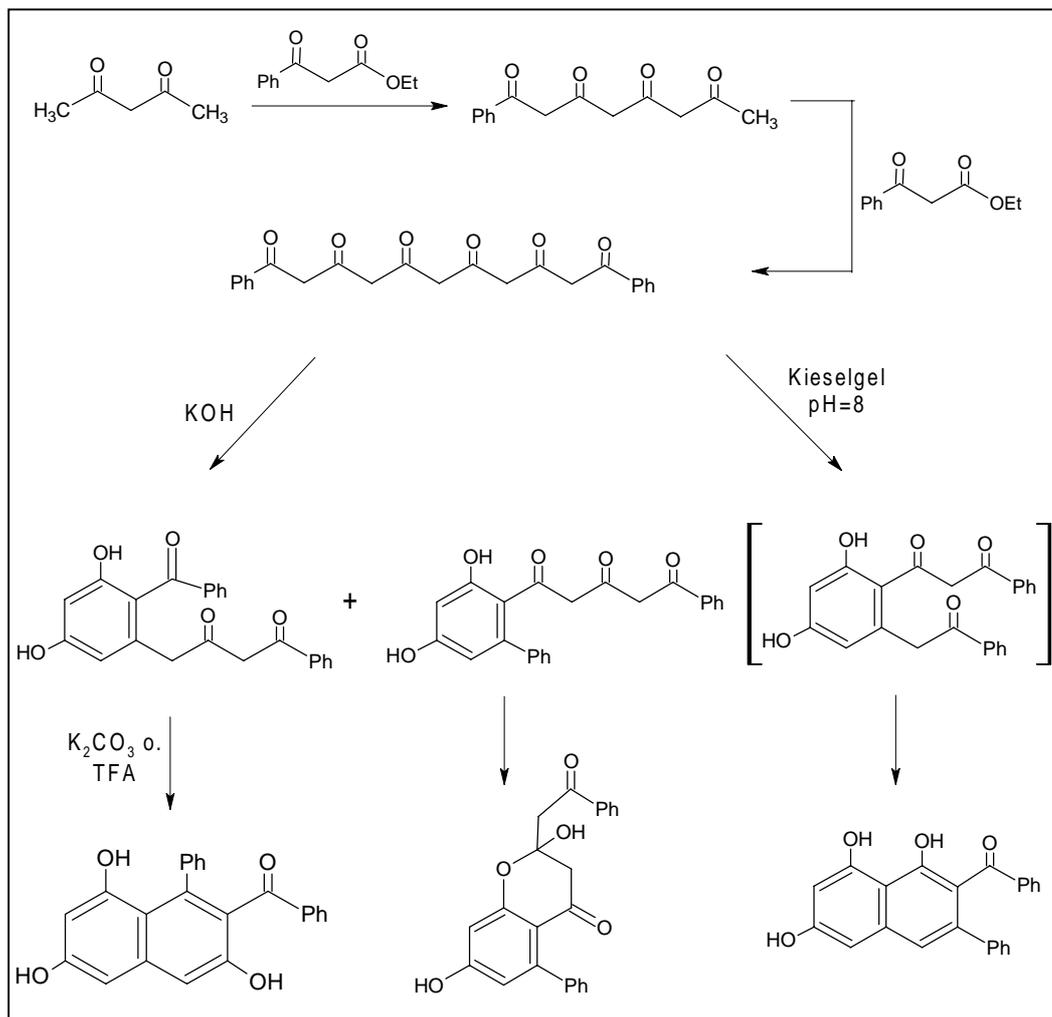
Abb. 8: Isolierte Dodecaketide von *whiE* minimal PKS



2.3 Polyketidsynthesen

Das Interesse an der Synthese von Polyketidketten stammt aus der Zeit, als die Theorie der Biosynthese gerade in der Entwicklung war. Anfang des 20. Jahrhunderts war man auf die Eigenschaften von Keten-diethylacetalen aufmerksam geworden, welche unter bestimmten Umständen zur Polymerisation neigen und somit Polyketidketten ergeben. In einer Veröffentlichung von P.R. Johnson^[18] konnte gezeigt werden, daß mit Cadmium als Katalysator und Keten-diethylacetal eine Kettenverlängerung auf der Basis „head to tail“ wie in der Biosynthese zustande kommt. Das allgemeine Problem, daß bei dieser Art der Synthese auftaucht, ist die Kontrolle über die Kettenverlängerung. Ansonsten wäre das System ideal zum Aufbau und Beobachtung von Polyketidketten geeignet. Neuere Arbeiten haben gezeigt, daß es in der Polymerchemie möglich ist, typische Polyketidprodukte wie Trihydroxynaphthalene oder Tetrahydroxyanthracene in den Gemischen zu finden^[19, 20].

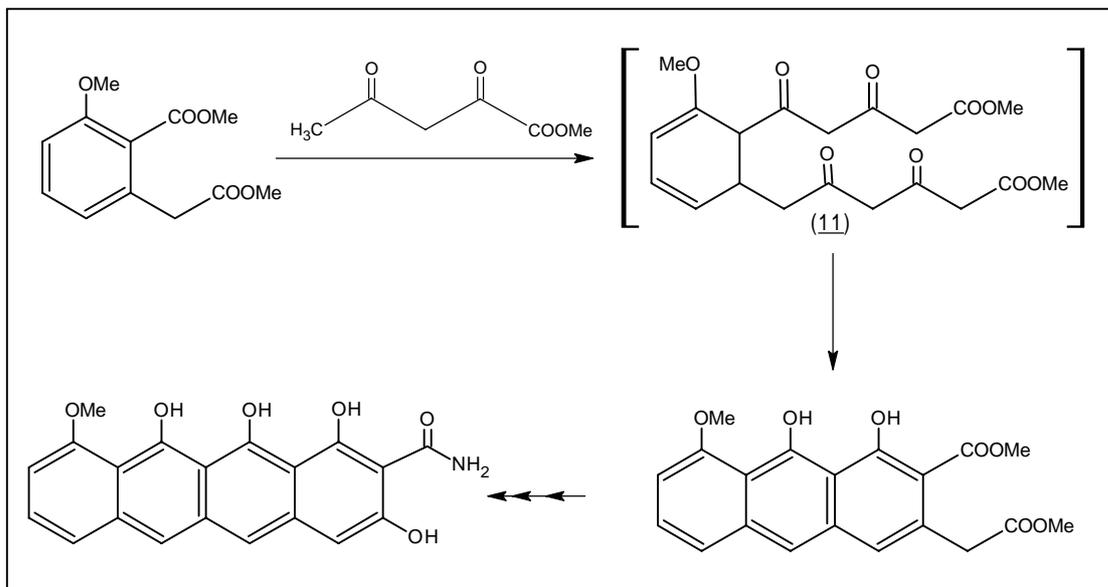
Ein anderer Reaktionstyp, der zum synthetischen Aufbau von Polyketidketten dient, ist die Claisenkondensation. Eine Vielzahl von β -Tetra- und β -Pentacarbonyl Verbindungen wurden durch schrittweise Acetylierung des nächst kleineren Moleküls synthetisiert^[21]. Schlechte Ausbeuten und Trennungsprobleme führten aber dann zur Verwendung von β -Keto-Estern wie Methylacetoacetat^[22], wodurch längere Ketten im Zuge einer Reaktion erhalten werden konnten. An diesen offenkettigen Hexaketiden konnte T.M.Harris Cyclisierungsstudien vornehmen^[21]. Dabei wurden die in der **Abbildung 9** dargestellten Verbindungen isoliert.

Abb. 9: Cyclisierungsstudien von T.M.Harris

Theoretisch sollte bei diesen Hexaketiden eine größere Zahl an Cyclisierungen erfolgen können, doch es konnten nur drei Cyclisierungsprodukte gefunden werden. Auffällig an dieser Tatsache ist, daß durch Veränderung des pH-Wertes eine Regiokontrolle für Aldolkondensationen gegeben ist^[21, 23].

Eine von T.M.Harris entwickelte Synthesestrategie soll kurz erwähnt werden, da sie den Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit durchgeführten Synthesen bildet. Für die Totalsynthese von Pretetramiden verwendete T.M.Harris 3-Methoxy-homophthalsäureester als Linker für die Kettenverlängerungen^[24] (**siehe Abb. 10**). Interessanterweise bildete das Intermediat (**11**) keinen Pyronring, sondern cyclisiert durch Inter-Ketten-Aldolkondensationen zum Anthracenderivat. T.M.Harris^[25] führte diese Erkenntnis auf sterische Effekte beim Angriff auf die aromatische Carbonylgruppe zurück. Dies ist bedingt durch die Schutzgruppe am Linker, die die Möglichkeit zur Hemiketalisierung für die obere Kette verhindert.

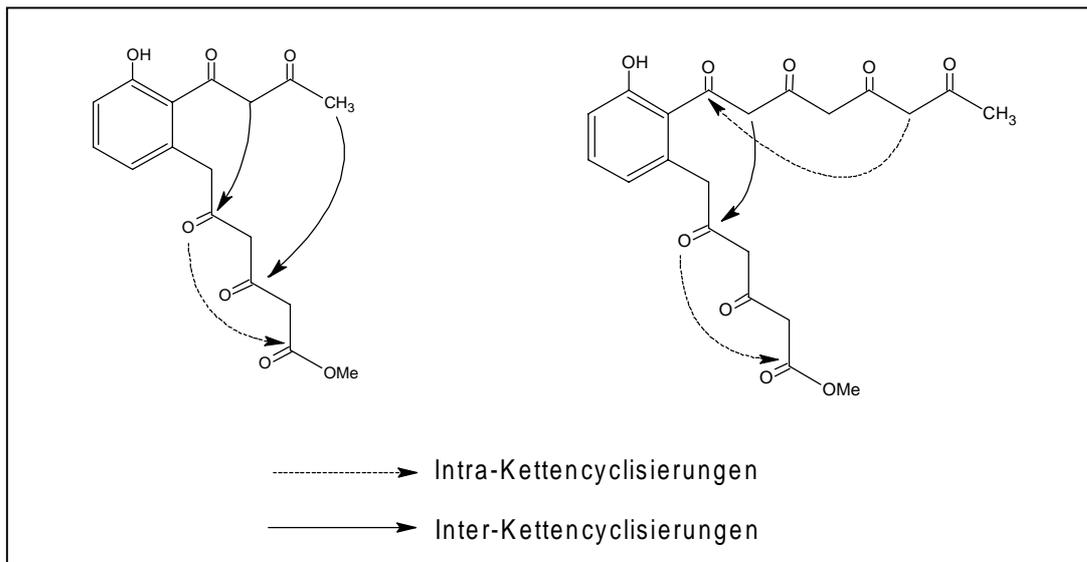
Abb. 10: Darstellung von Pretetramiden nach Harris



2.4 Synthesestrategie

Wie schon in der Aufgabenstellung beschrieben, ist unser Ziel, von synthetisch hergestellten Polyketide die Inter- und Intra-Kettencyclisierungen zu untersuchen:

Abb. 11: Darstellung von Intra- und Inter-Kettencyclisierungen

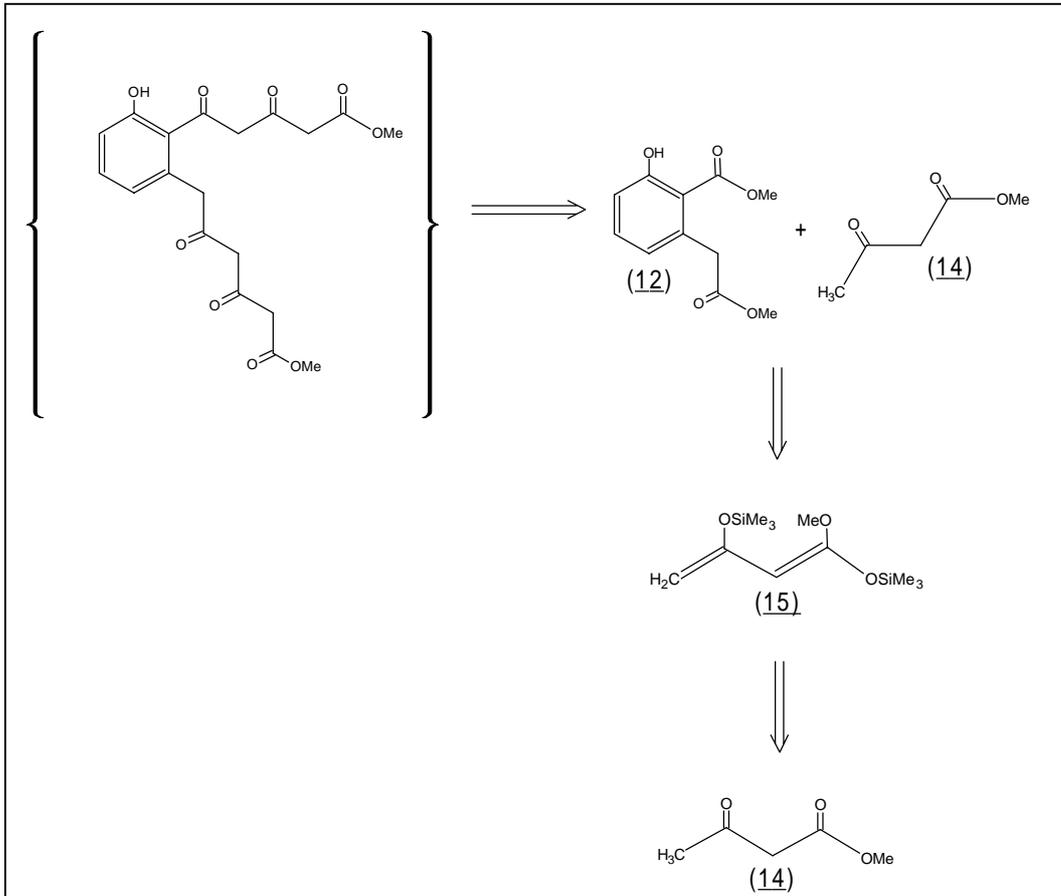


Bei der Bildung der Ketten ist darauf zu achten, daß keine Symmetrie zwischen den beiden Seitenketten herrscht, da es sich ansonsten nicht mehr um die biosynthetischen Zwischenprodukte handeln würde.

Folgende Synthesestrategien (**siehe Abb. 12**) wurden erarbeitet:

Als Linker für die Polyketidketten sollte 3-Hydroxy-homophthalsäuredimethylester (**12**) sowie Methyl-1,8-dihydroxy-2-(methoxycarbonyl)-3-naphthyl-acetat (**13**) verwendet werden.

Abb.12: Synthesestrategie



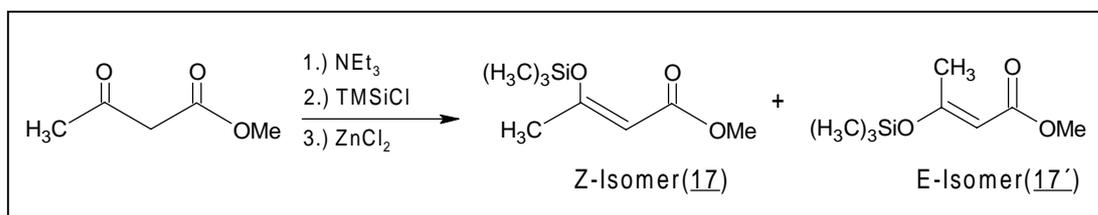
Dabei soll das kommerziell erhältliche Methylacetoacetat (**14**) an das vorher synthetisierte 3-Hydroxyhomophthalat (**12**) angelagert werden und nach Erhalten des Zwischenproduktes durch pH-Kontrolle die Cyclisierungsprodukte isoliert und charakterisiert werden.

Für die Darstellung von 3-Hydroxyhomophthalat (**12**) eignet sich am besten die von T.H.Chan and P. Brownbride^[26, 27] beschriebene Synthese, welche sich durch Kondensation von 1,3-bis-(trimethylsiloxy)-1-methoxy-1,3-butadien (**15**) auszeichnet. Andere in der Literatur beschriebene Synthesen führen meist zu dem geschützten 3-Methoxyhomophthalat^[28-30]. Es ist zwar synthetisch möglich die Methoxygruppe zu entfernen, doch führt dieser zusätzliche Reaktionsschritt zu einer verringerten Ausbeute. Dies ist für die Darstellung von Ausgangsprodukten nicht sinnvoll weshalb der im Folgenden beschriebene Syntheseweg gewählt wurde.

2.5 Darstellung von 3-Hydroxyhomophthalat (**12**)

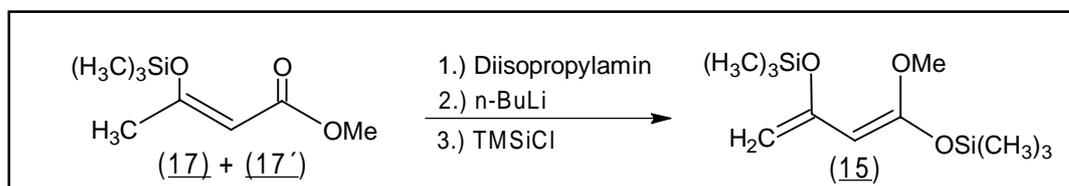
Als Ausgangspunkt verwendete man das kommerziell erhältliche Methylacetoacetat (**14**), was nach einer Methode von S.J. Danishefsky^[31] in das 3-trimethylsiloxy-but-2-enoat (**17**) überführt wird. Dabei zeigte das ¹H-NMR Spektrum eine Mischung von E- und Z-Isomeren im Verhältnis von 7:1. Vermutlich wurde durch einen größeren Überschuß an Zinkchlorid das Isomeren-Verhältnis von dem in der Literatur beschriebenen 5:1 nach 7:1 verschoben.

Abb. 13: Darstellung von monosilyliertem Acetessigsäuremethylester (**17**)

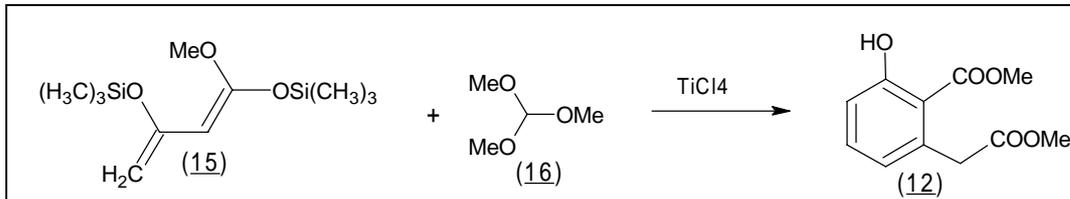


Das Umsetzen des Gemisches von (**17**) und (**17'**) mit Lithiumdiisopropylamin (LDA) und Trimethylsilylchlorid ergab ausschließlich das E-Isomere von 1,3-bis(trimethylsiloxy)-1-methoxybuta-1,3-dien (**15**) in sehr guter Ausbeute (>95%)^[26, 32, 33]. Somit konnte man das disilylierte Produkt direkt ohne weitere Aufreinigung für die Darstellung von 3-Hydroxyhomophthalat (**12**) einsetzen.

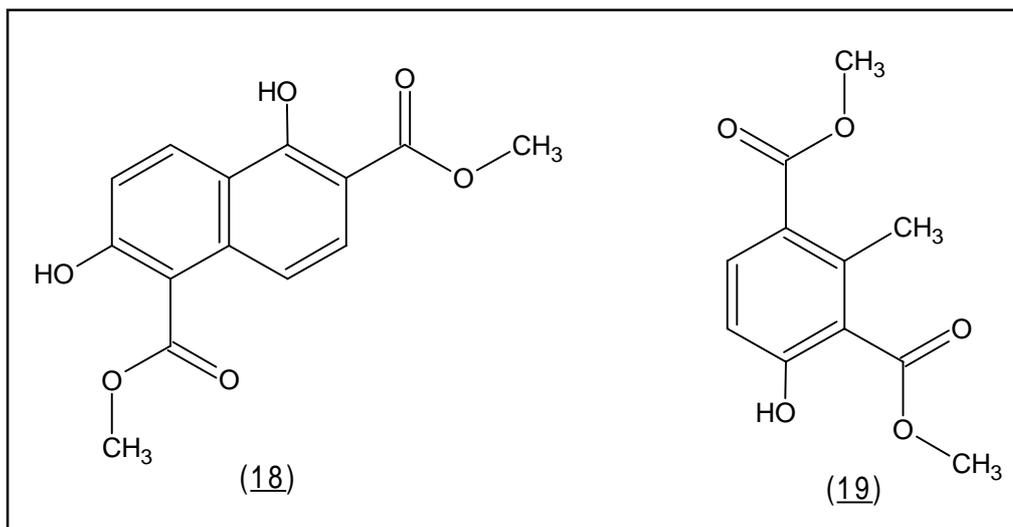
Abb. 14: Darstellung von disilyliertem Acetessigsäuremethylester



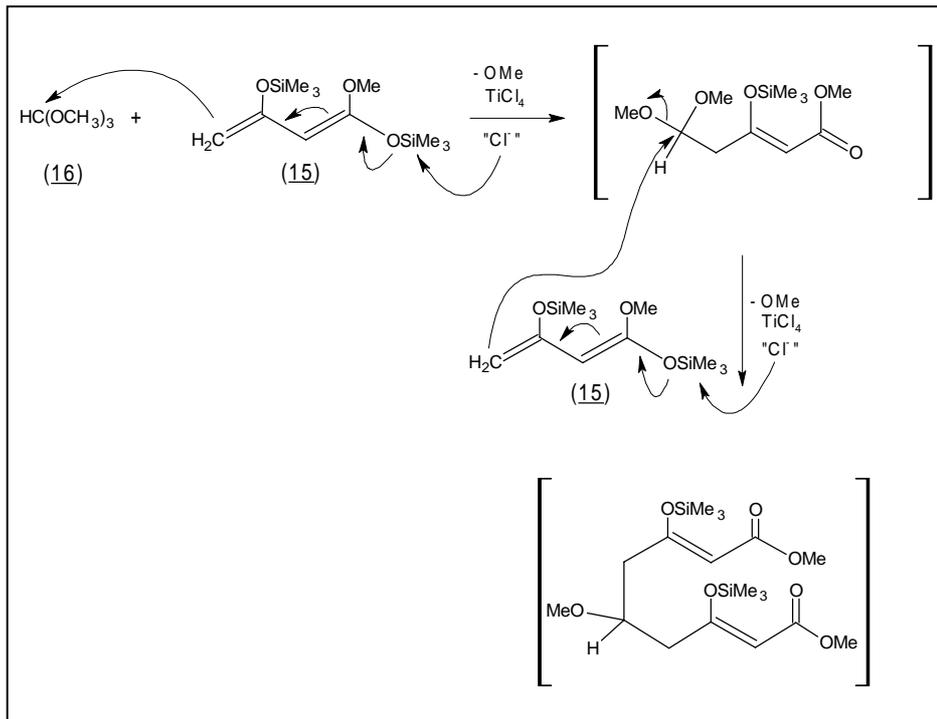
Die Umsetzung von (**15**) zu 3-Hydroxyhomophthalat (**12**) muß innerhalb von 1-2 Tagen vorgenommen werden, da das disilylierte Produkt (**15**) sehr reaktiv ist und sogar im Gefrierschrank nach einiger Zeit Zersetzungen bzw. Polymerisationen aufweist.

Abb. 15: Darstellung von 3-Hydroxyhomophthalat (12)

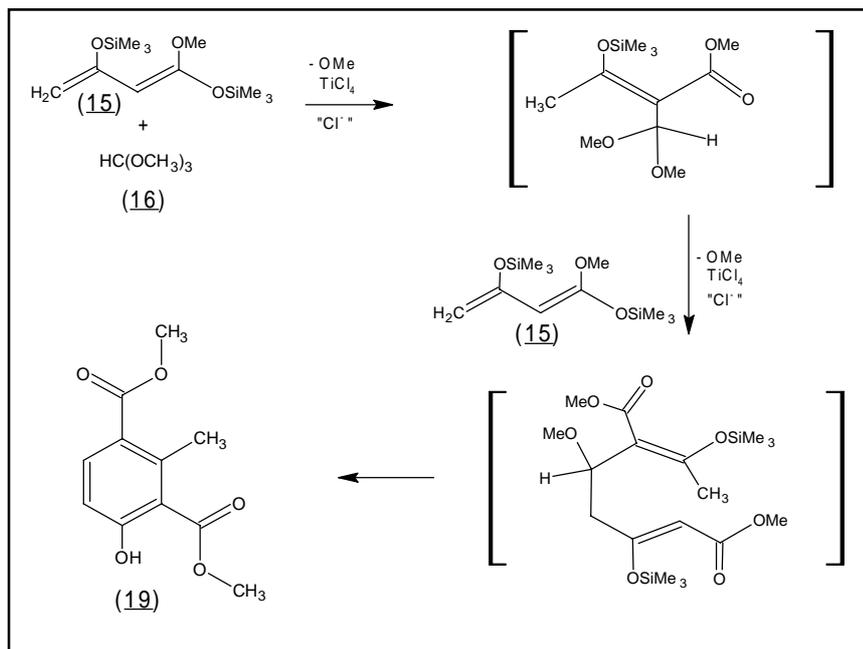
Im nächsten Syntheseschritt, der Bildung des Homophthalates (12), mußte beachtet werden, daß die Zugabe des disilylierten Produktes (15), zu einer auf -78° Celsius abgekühlten Lösung bestehend aus Titan-tetrachlorid in p.a. Dichlormethan (CH₂Cl₂) sehr langsam (45 min) erfolgt. Bei schneller Zugabe kam es zu einer verstärkten Bildung von Nebenprodukten, wie (18) und (19) (siehe Abb. 16).

Abb. 16: Nebenprodukte bei der Darstellung von (12)

Anhand der Reaktionsmechanismen über die gezeigten Zwischenprodukte soll dies verdeutlicht werden. Im ersten Schema (siehe Abb. 17) sieht man den Reaktionsmechanismus, welcher zu dem gewünschten 3-Hydroxy-homophthalsäure-dimethylester (12) führt.

Abb. 17: Reaktionsmechanismus für die Darstellung von Homophthalat (12)

Als Konkurrenzreaktion steht der folgende Reaktionsmechanismus (**siehe Abb. 18**), der durch Reaktion der mittelständigen Doppelbindung anstelle der Reaktion der endständigen Doppelbindung mit dem Orthoester (16) zu dem nichtgewünschten Phenol-Derivat (19) führt.

Abb. 18: Mechanismus für Nebenprodukt (19)

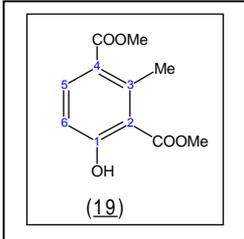
Das Problem, welches durch die Nebenprodukte verursacht wurde, war die Aufreinigung, da sich insbesondere das Phenolderivat (**19**) schwer von 3-Hydroxyhomophthalat (**12**) trennen ließ. Das Naphthalenderivat bereitete weniger Schwierigkeiten, da es sich leicht durch Kieselgelsäulenchromatographie abtrennen ließ und sich nur bildete, wenn das Reaktionsgemisch länger als sieben Stunden gerührt wurde. Vermutlich ist die Bildung auf ein nicht cyclisiertes Zwischenprodukt zurückzuführen, das bei längerer Reaktion mit einem weiteren disilylierten Molekül reagiert und durch Abspaltung der Estergruppe zum Naphthalenring aromatisiert.

Die Struktur aller Produkte wurden mittels $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektroskopie aufgeklärt.

Auf das Hauptprodukt soll nicht näher eingegangen werden, da ein Vergleich mit Literaturwerten eine eindeutige Übereinstimmung ergab.

Die Struktur des Phenolderivat (**19**) konnte durch die charakteristische ortho-Kopplung der aromatischen Protonen zum Dublett mit der Kopplungskonstante von $J = 8 \text{ Hz}$ und durch Berechnungen der ^{13}C -Verschiebungen mit Hilfe des Inkrement-Systems, die bei einfachen Aromaten weitgehend gültig sind, ermittelt werden (**siehe Tabelle 1**). Zum andern gaben auch die oben gezeigten mechanistischen Überlegungen Aufschluss über die Struktur.

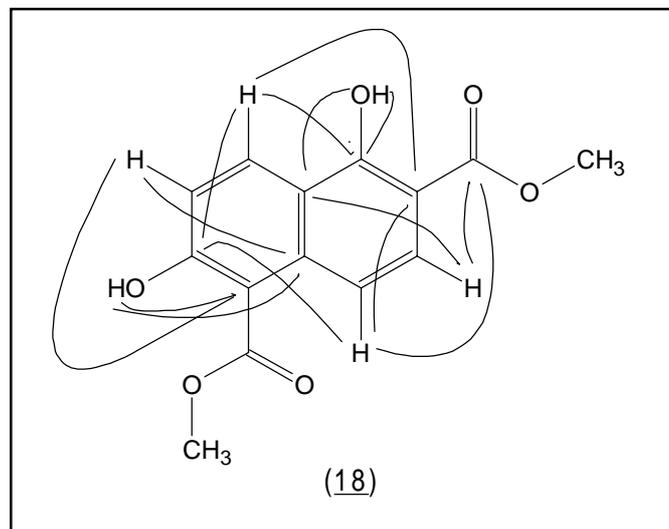
Tabelle 1: Gemessene und berechnete ^{13}C -Daten von Verbindung (**19**)

Nr.	gemessene Daten		Berechnet
1	163.9	 <p>(19)</p>	160.5
2	114.5		118.5
3	143.6		141.4
4	123.9		123.5
5	135.9		136.2
6	115.2		112.8

Etwas aufwendiger war die Strukturaufklärung des Naphthalenderivats (**18**). Man konnte anhand des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums erkennen, daß es sich um einen Naphthalenring handelte, wobei jeder Ring zwei Protonen besitzt. Auch die Stellung der Protonen zueinander konnte durch die Kopplungskonstante von $J = 8 \text{ Hz}$ (ortho-Position) bestimmt werden.

Doch die genaue Zuordnung konnte erst durch HMBC-Spektren aufgeklärt werden.

Abb. 19: HMBC-Spektrum von Substanz (18**)**

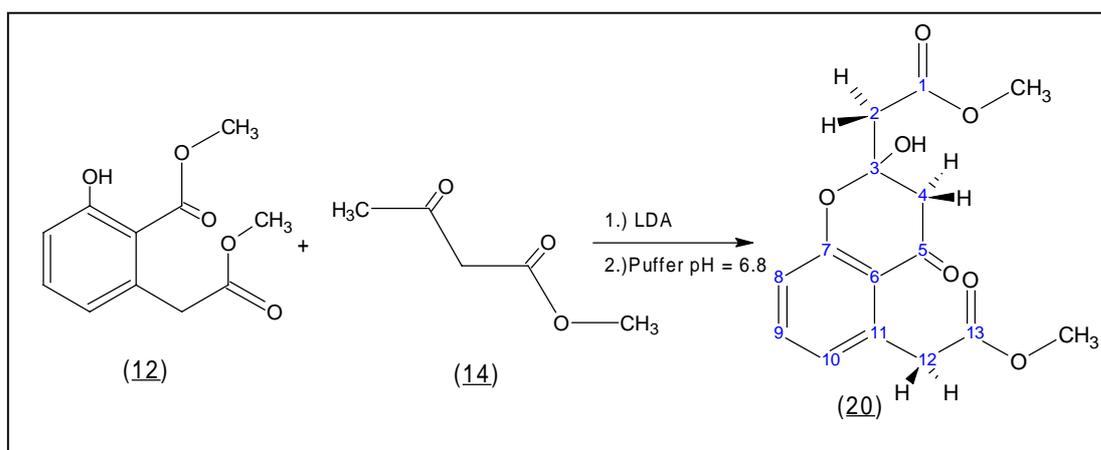


2.6 Kettenverlängerung an Homophthalsäureester (12)

Die Kettenverlängerung mittels Claisen-Kondensation stellt den kritischen Schritt der Synthese dar.

Ein Grund dafür ist die gleichzeitige Verknüpfung der aktiven Dicarbanionen mit den Estergruppen. Die doppelte Kettenverlängerung wurde zwar schon erfolgreich in den Synthesen von T. M. Harris^[22] und M. Yamaguchi^[34-36] beschrieben, doch wurde hier immer das als Methoxy-Gruppe geschützte Homophthalat verwendet. Mehrere Reaktionsbedingungen wurden durch Überschuss an Base und Methylacetoacetat (14) getestet. Es kam aber nur zu einer Kettenverlängerung an der oberen (Pos. 5) Estergruppe.

Abb. 20: Bildung des Hemiketals (20)



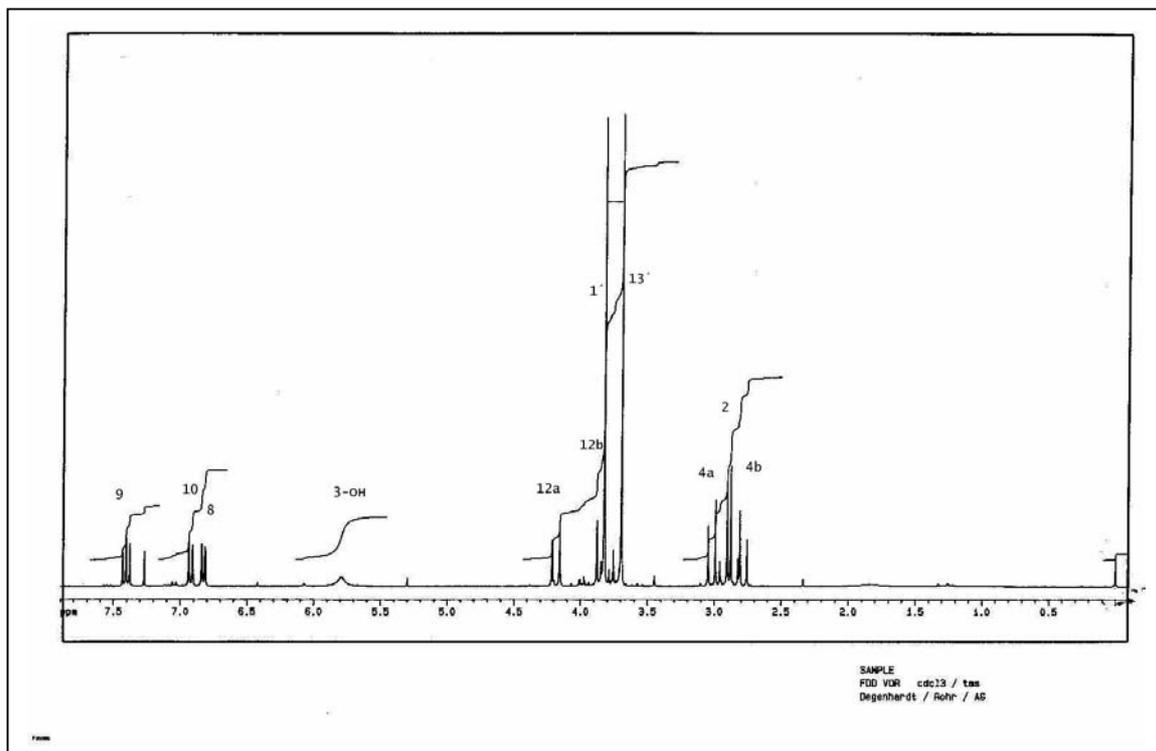
Unter neutralen Bedingungen kam es sofort zur Bildung eines Hemiketals (20) d.h. einer Intra-Kettenreaktion. Eine Inter-Kettenreaktion oder die Bildung eines weiteren Pyronringes, wie man ihn bei einer Vielzahl von biosynthetischen Polyketiden findet, konnte nicht beobachtet werden. Man kann daraus Schlussfolgern, daß die Bildungstendenz eines Hemiketals die eines Pyrons deutlich überwiegt.

Die oben gezeigte Struktur konnte anhand von ¹H-NMR und ¹³C-NMR-Daten aufgeklärt werden. Die Verschiebung des an Pos. 3 befindlichen C-Atoms war ausschlaggebend für die Aufklärung der oben dargestellten Struktur.

Das APT-Spektrum wies auf ein quartäres C-Atom hin, das zu tiefem Feld verschoben war und bei $\delta = 99.47$ lag. Dieser Bereich ist charakteristisch für anomere C-Atome in Halbacetalen und Hemiketalen. Da bei dieser Synthese das Vorhandensein von Zuckern ausgeschlossen werden kann, deutete alles auf die Bildung eines Hemiketals hin. Die weiteren Positionen konnten anhand von Spektrenvergleichen mit dem Edukt (Homophthalat (**12**)) zugeordnet werden.

Die Methylengruppe an Pos. 12 zeigte eine Aufspaltung des Signals in ein Dublett mit einer Kopplungskonstanten von $J=15$ Hz. Vermutlich wurde durch die Ketogruppe an Pos. 5 die freie Drehbarkeit der Estergruppe gehindert, so daß die Protonen als diastereotop Signale erscheinen.

Abb. 21: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Substanz (**20**)



2.7 Kettenverlängerungen an 1,8-dihydroxy-2-(methoxycarbonyl)-3-naphthyl acetat (**13**)

Es gab zwei Gründe, weshalb man für die Kettenverlängerung auch das Naphthalenderivat (**13**) verwendete.

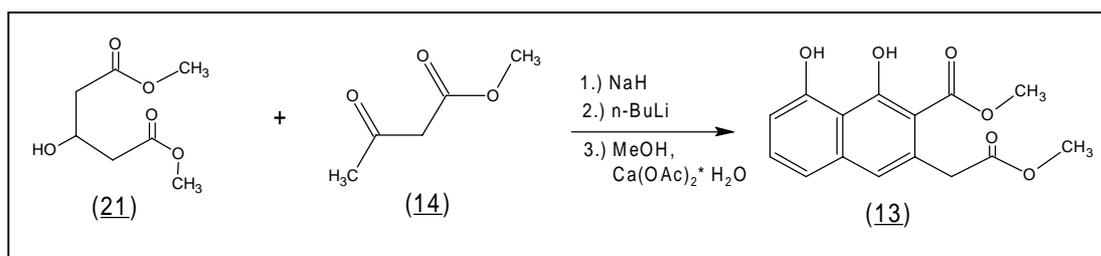
1.) Durch seine Fluoreszenz bei 366 nm konnte man die Reaktion im Dünnschichtchromatogram leichter verfolgen. Bei den Reaktionen mit 3-Hydroxyhomophthalat (**12**) hatte man erhebliche Schwierigkeiten, bei der großen Produktvielfalt die interessanten Produkte ausfindig zu machen.

2.) Es sollte überprüft werden, ob durch das Vorhandensein eines zweiten Ringes die Intra-Cyclisierungen weiterhin die favorisierten Cyclisierungen sind, oder ob auch Inter-Cyclisierungen zum Anthracyclin oder Angucyclin möglich sind.

2.7.1 Darstellung des Naphthalenderivates (**13**)

Für die Darstellung von Methyl 1,8-dihydroxy-2-(methoxycarbonyl)-3-naphthylacetat (**13**) wurde die Synthesevorschrift von M. Yamaguchi^[34, 35] verwendet. Dabei wurde das Basengemisch aus n-BuLi und NaH verwendet. Laut Vorschrift ist das Basengemisch reaktiver als LDA und führt somit zu höheren Ausbeuten. Als Cyclisierungskatalysator wurde $\text{Ca}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ verwendet.

Abb.22: Darstellung des Naphthalenderivats (**13**)

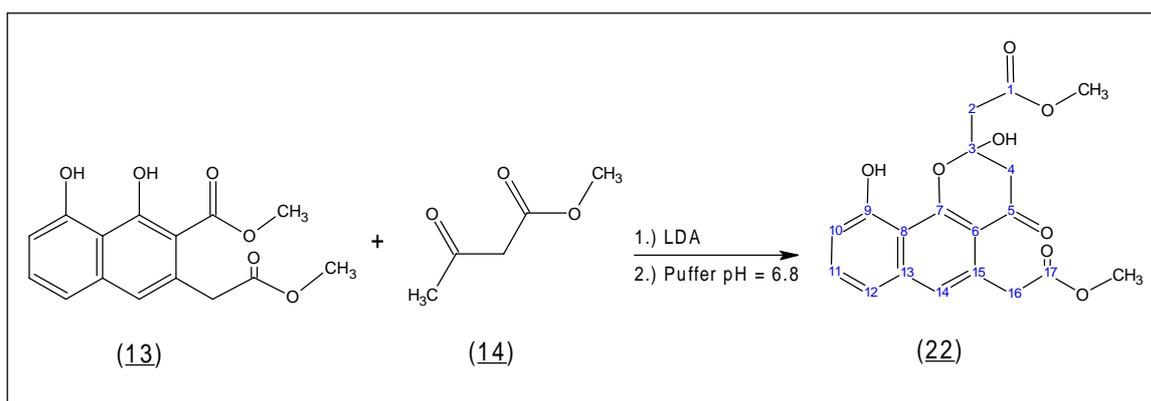


Bei der Reaktion gab es keine Schwierigkeiten, und man erhielt das Produkt in guter Ausbeute. Die Strukturaufklärung fand mittels Vergleich mit den in der Literatur vorhandenen Spektrendaten statt und bedarf keiner weiteren Ausführung.

2.7.2 Kettenverlängerungen zu **(22)** und **(23)**

Für die Kettenverlängerung wurde zunächst die gleiche Base, LDA, wie bei dem 3-Hydroxyhomophthalat **(12)** verwendet. Das einzige, was verändert wurde, war die Konzentration an Base, da das Naphthalenderivat eine zweite ungeschützte Hydroxygruppe aufweist. Ansonsten wurden die gleichen Bedingungen gewählt.

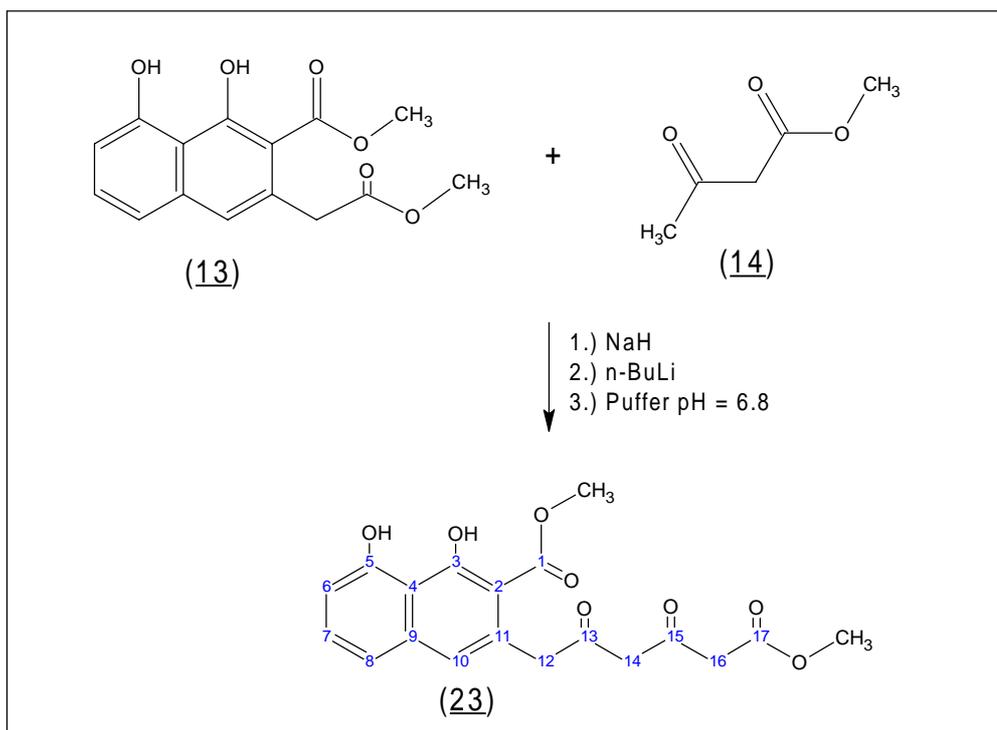
Abb. 23: Bildung eines Hemiketals



Doch konnte auch hier nur die Hemiketalcyclisierung beobachtet werden. Eine doppelte Kettenverlängerung konnte nicht beobachtet werden. Die Struktur wurde durch $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren aufgeklärt.

Zum einen ist das Verschwinden des Signals der Hydroxygruppe an Pos. 7 bei $\delta=14.2$ ein Anzeichen für die gezeigte Hemiketalcyclisierung und zum anderen konnte wiederum das ^{13}C -Signal an der Pos. 3 bei $\delta =102$ gefunden werden. Nach einem Vergleich der für Substanz **(22)** erhaltenen Spektren mit denen von Substanz **(20)**, gab es keinen Zweifel über das Vorhandensein einer Hemiketalcyclisierung.

Abb. 24: Darstellung der Substanz (23)



Da man vermutete, daß LDA eine zu schwache Base für die doppelte Kettenverlängerung darstellt, verwendete man eine Basenkombination. Als Base wurde nun eine Mischung aus Natriumhydrid und n-BuLi verwendet. Diese Mischung ist reaktiver und verhindert die oftmals beobachtete Reaktion der Estergruppe mit Diisopropylamin bei der Verwendung von LDA. Beim Einsatz dieser Basenkombination kam es zu einer Kettenverlängerung an der unteren (Pos. 13) Estergruppe, welche als offene Kette unter neutralen Bedingungen vorlag. Es kam zu keiner Intra-Cyclisierung, welche zu einem Pyronring führen würde. Auch eine Inter-Cyclisierung konnte nicht beobachtet werden. Erst bei einer Erhöhung des pH-Wertes auf pH=9-10 mit NaOH kam es zu Reaktionen. Die Strukturen der dabei möglicherweise entstandenen Cyclisierungsprodukte konnten aufgrund der geringen Ausbeuten nicht charakterisiert werden. Bestimmen konnte man die Struktur der offenkettigen Substanz (23) mit Hilfe eines H,H-COSY-Spektrums. Die Kopplung des an Position C-12 befindlichen Protons mit dem Proton an Position C-14 (tautomere Struktur) gab den Beweis für die Anordnung. Desweiteren kam es zu einer Verschiebung des ursprünglichen Carbonsäureestersignals von Pos. 13 von $\delta=3.67$ nach $\delta=3.23$.

2.8 Diskussion und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Verbindungen (**20**), (**22**) und (**23**) synthetisiert werden. Es fällt auf, daß bei allen identifizierten Verbindungen jeweils nur eine Kettenverlängerung stattgefunden hat, während T. M. Harris^[24] und M. Yamaguchi^[34] bei der vergleichbaren Reaktion mit Methylacetoacetat als Seitenkettenbaustein jeweils eine zweifache Kettenverknüpfung beobachteten.

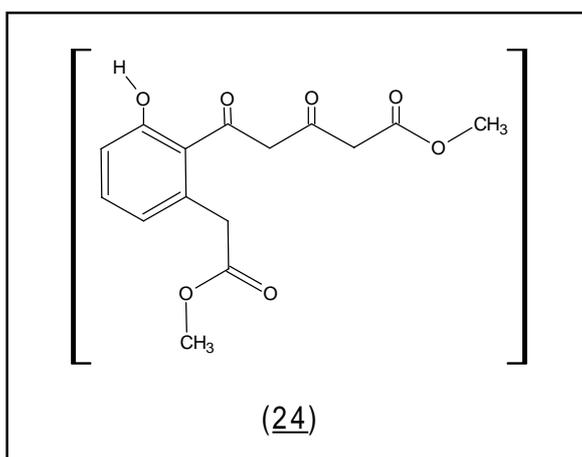
Mit der Nucleophilie des Methylacetoacetats (**14**) oder sterischen Hinderungen kann dies nicht begründet werden, da es sich um denselben Seitenkettenbaustein handelt.

Also kann die Erklärung für dieses Phänomen nur in der fehlenden Schutzgruppe für die Hydroxygruppe an dem Aromaten liegen.

Vermutlich wurde durch die aromatische Hydroxygruppe ein Teil der Base deaktiviert und es kam nur zu einer Kettenverlängerung. Da man aber mit Überschuß an Base arbeitet, hätte dies eigentlich keine Auswirkungen haben sollen. Der genaue Grund für das Ausbleiben einer zweifachen Kettenverlängerung konnte bis jetzt noch nicht gefunden werden.

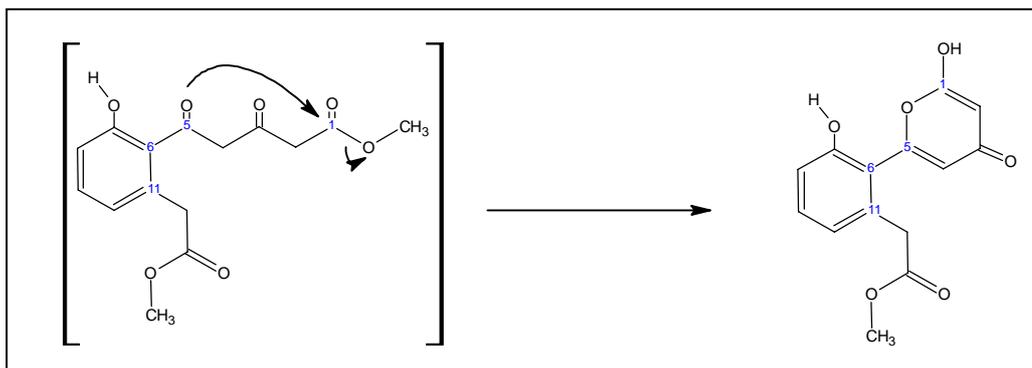
Findet die erste Claisen-Kondensation mit LDA, die zur Verknüpfung der Seitenkette mit dem Homophthalat führt, an der aromatischen Estergruppe statt, so bildet sich ein nicht isolierbares Intermediat (**24**), welches sofort den Ringschluß zu einem Hemiketal bildet (siehe **Abb. 20** und **Abb. 23**).

Abb. 25: Intermediat der oberer Kettenverlängerung



Das Intermediat hätte auch die Möglichkeit, wie im Fall von TW93g^[17] (**9**), durch Angriff eines freien Elektronenpaares des 9-Carbonyl-O-Atoms an die Estergruppe einen Pyronring auszubilden. Ein entsprechendes Cyclisierungsprodukt konnte nicht gefunden werden.

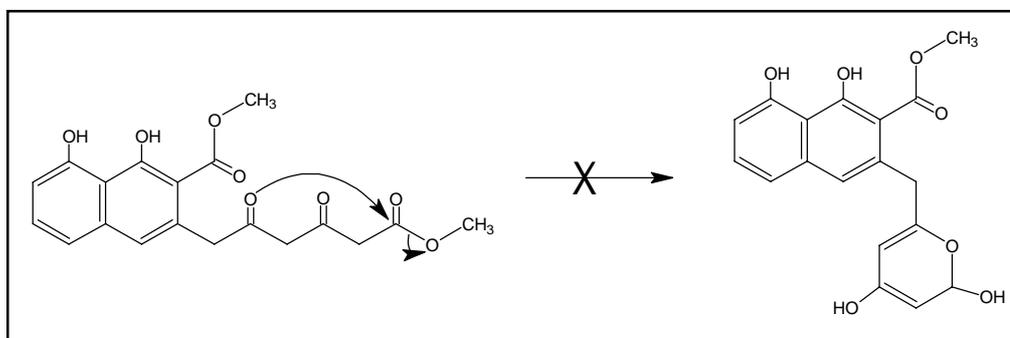
Abb. 26: Pyronbildung wie in TW93g (9**)**



Bei der Verwendung von NaH/n-BuLi als Base kam es zu einer Kettenverlängerung an der aliphatischen Estergruppe.

Das Hauptprodukt, welches isoliert werden konnte, wies die offene Polyketidkette auf. Es kam zu keiner Inter- oder Intracyclisierung. Eigentlich hätte man einen Ringschluß, welcher zu einem Pyronring führt, erwartet. Erst nach Zugabe von NaOH kam es zu einer weiteren Reaktion, welche aber zu keinem definierten Produkt führte.

Abb. 27: Erwarteter Ringschluß zu einem Pyronring



Dabei muß allerdings beachtet werden, daß hier mit den Methylestern gearbeitet wurde, die eine etwas geringere Reaktivität aufweisen als die in den lebenden Organismen vorkommenden Thioester.

Eine interessante Veröffentlichung von Hopwood et al.^[37] befasst sich mit der Synthese von Thioestern (**25**) und dem darauffolgenden Einsetzen der Produkte als Fütterungssubstrate (**siehe Abb. 28**) an *Streptomyces. coelicolor* A3. Diese Substanzen sollten zum Überprüfen einer Reduktase dienen, die einen entscheidenden Cyclisierungsschritt bei der Biosynthese von Actinorhodin (**26**) (**siehe Abb. 29**) einleitet.

Abb. 28: Synthese und Fütterungsergebnis eines Modellthioesters

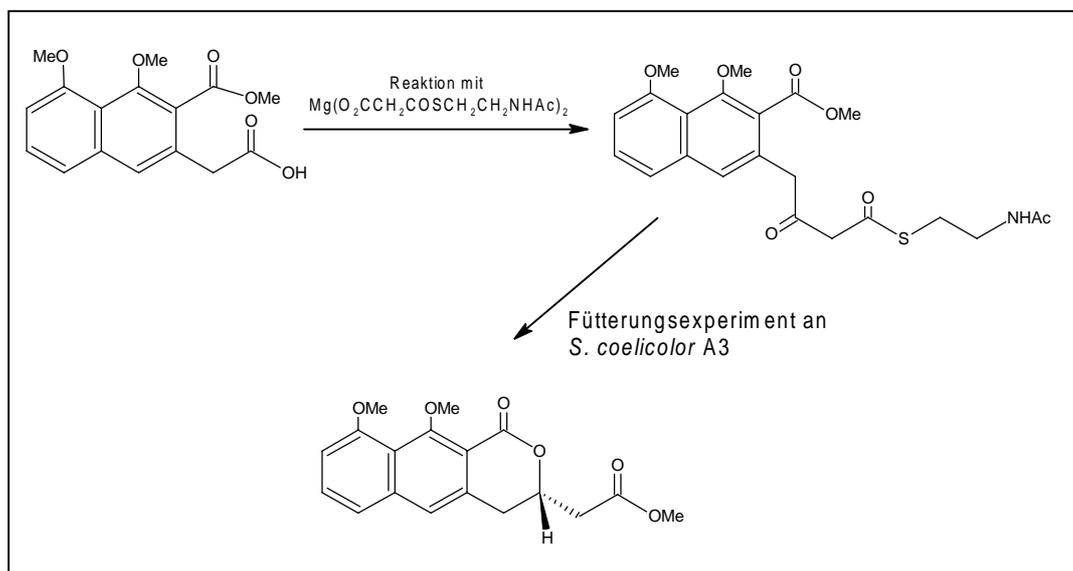
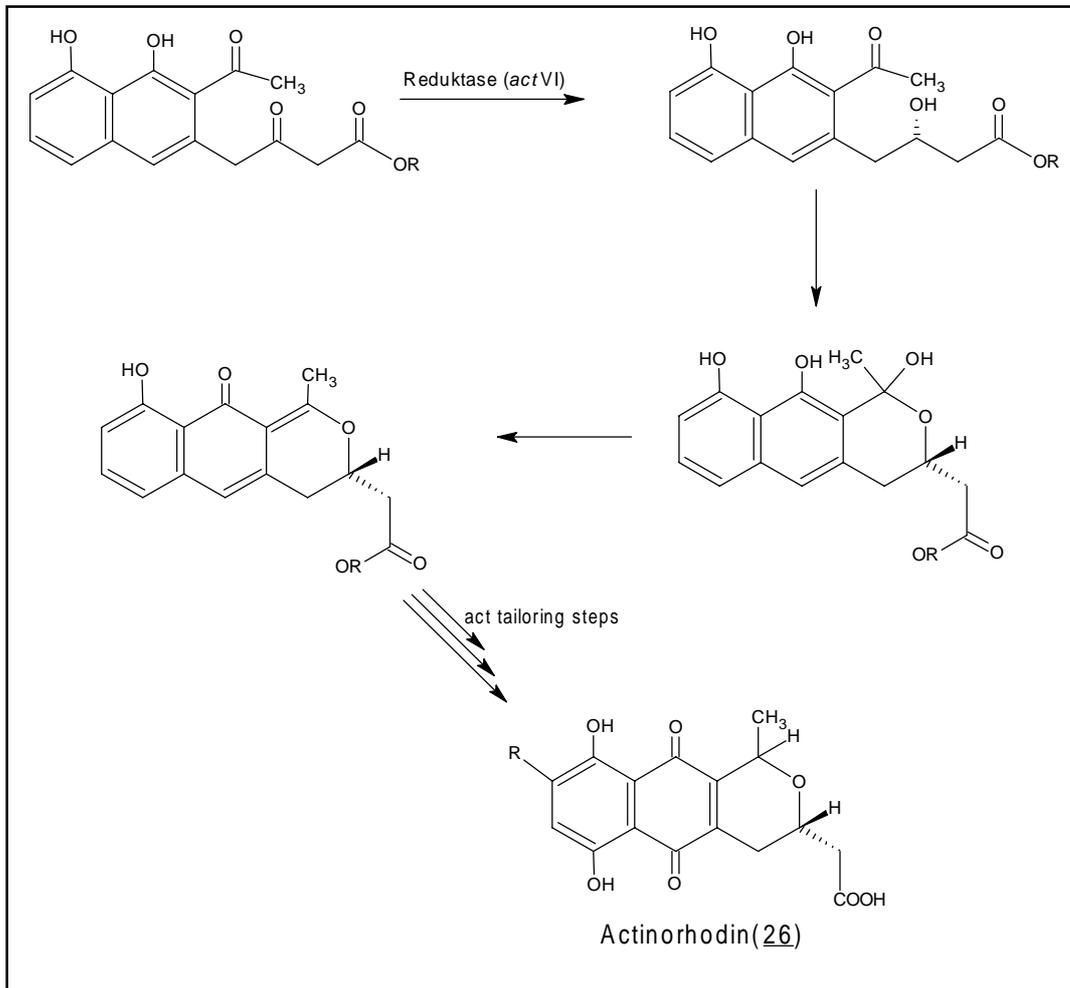


Abb. 29: Reduktions- und Cyclisierungsschritte in der Actinorhodinbiosynthese



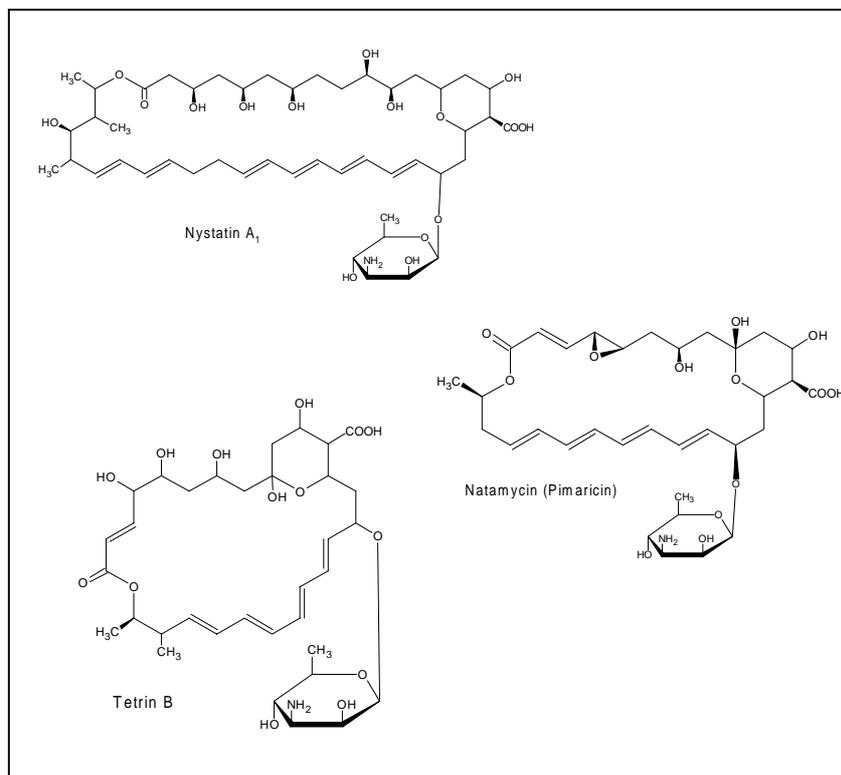
Diese interessante Reaktion mit Thioestern könnte als Ausgangspunkt für unsere weitere Reaktionen zur Beobachtung von Cyclisierungen verwendet werden. Durch Austauschen der Methylestergruppe gegen N-Acetylcysteamin bei den von uns dargestellten Modellmoleküle (**20**), (**22**) und (**23**) könnten derartige Thioesters gebildet werden. Besonders bei dem offenkettigen Molekül (**23**) könnte gezeigt werden, ob das Thioestermolekül unter spontaner Cylisierung einen Pyronring ergibt, oder die Cyclisierung erst im Organismus stattfindet.

3. Makropolyene bzw. Polyen-Makrolide

3.1 Einführung

In der Literatur werden Makrolide allgemein als Naturstoffe mit einem Lacton-Ring, der mehr als 10 Atome im Ring aufweist, klassifiziert. Die überwiegend von Streptomyceten produzierten Polyen-Makrolide enthalten einen 20-38 gliedrigen Lactonring, der auf der einen Seite eine unterschiedliche Anzahl konjugierter Doppelbindungen und auf der anderen Seite eine Poly-(1-hydroxy-1,2-ethandiyl)-Kette aufweist (**siehe Abb. 30**). Sie sind häufig mit einem Aminozucker (z.B. D-Mycosamin) glykosyliert. Die Polyen-Makrolide zeigen als amphiphile Substanzen molekulare Wechselwirkungen mit der Zellmembran eukaryotischer Zellen auf. Desweiteren sind sie bei nicht zu vernachlässigender (Nieren-)Toxizität durchweg antifungisch wirksam und werden zudem klinisch gegen Pilz- und Hefeinfektionen eingesetzt (z.B. Amphothericin B (**27**), Nystatin, Filipin)^[38].

Abb. 30: Strukturbeispiele von Makropolyenen

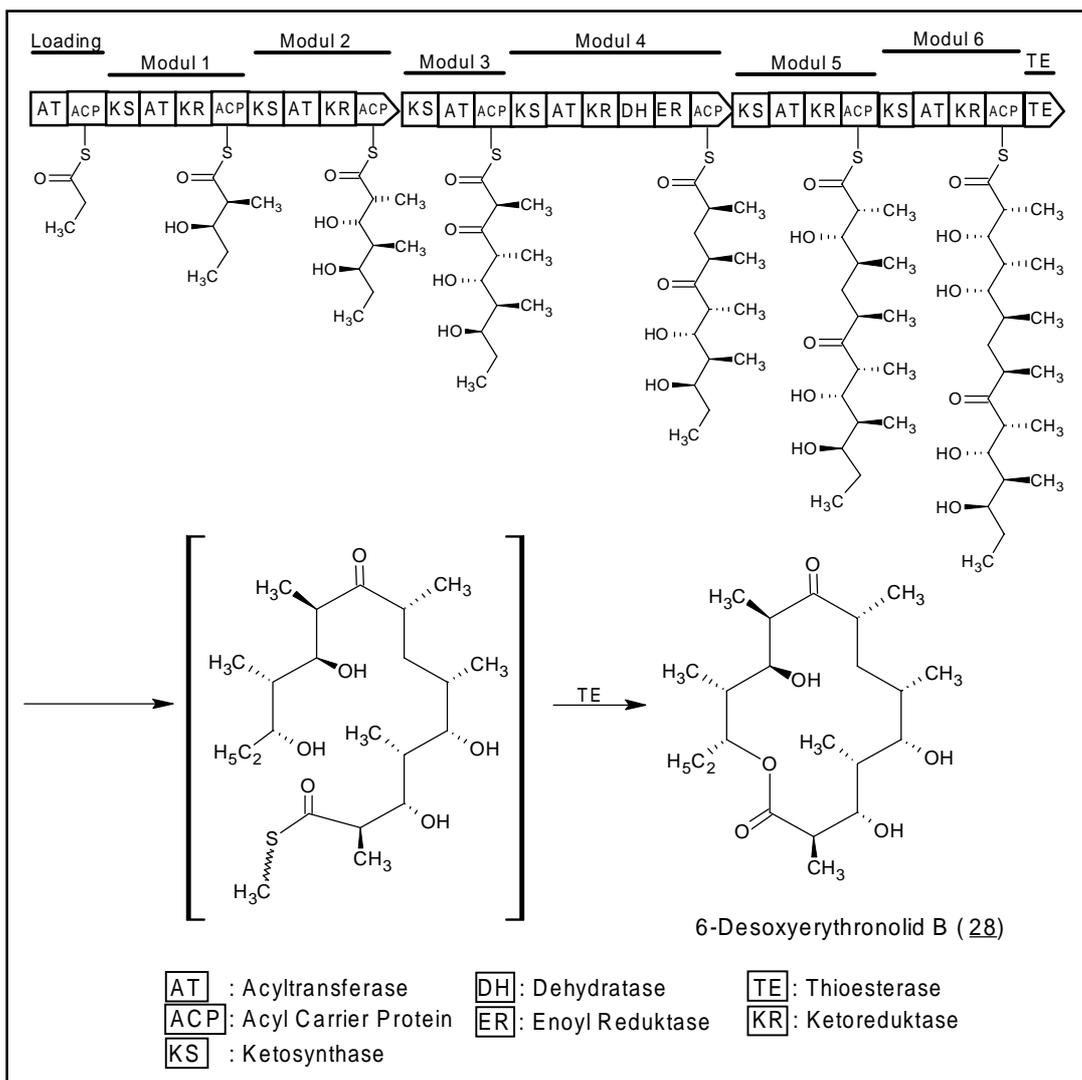


Ihre Biosynthese findet durch die Typ-1-Polyketidsynthese statt. Wie schon in der Einleitung erwähnt, besteht die Typ-1-PKS aus einem oder mehreren multifunktionalen, modular angeordneten Polypeptiden, in denen jedes Enzym im Verlauf der Biosynthese nur für genau einen Schritt verwendet wird.

Für die Grundlagenforschung wurde die Biosynthese des Vorstufenprodukts 6-Desoxyerythronolid B (**28**) des antibakteriell wirkenden Erythromycin verwendet (**siehe Abb. 31**).

Das 6-Desoxyerythronolid B (**28**) (DEBS)-PKS weist dabei drei Multienzym-Polypeptidketten auf, die sechs Enzymgruppen (Module) enthalten^[39].

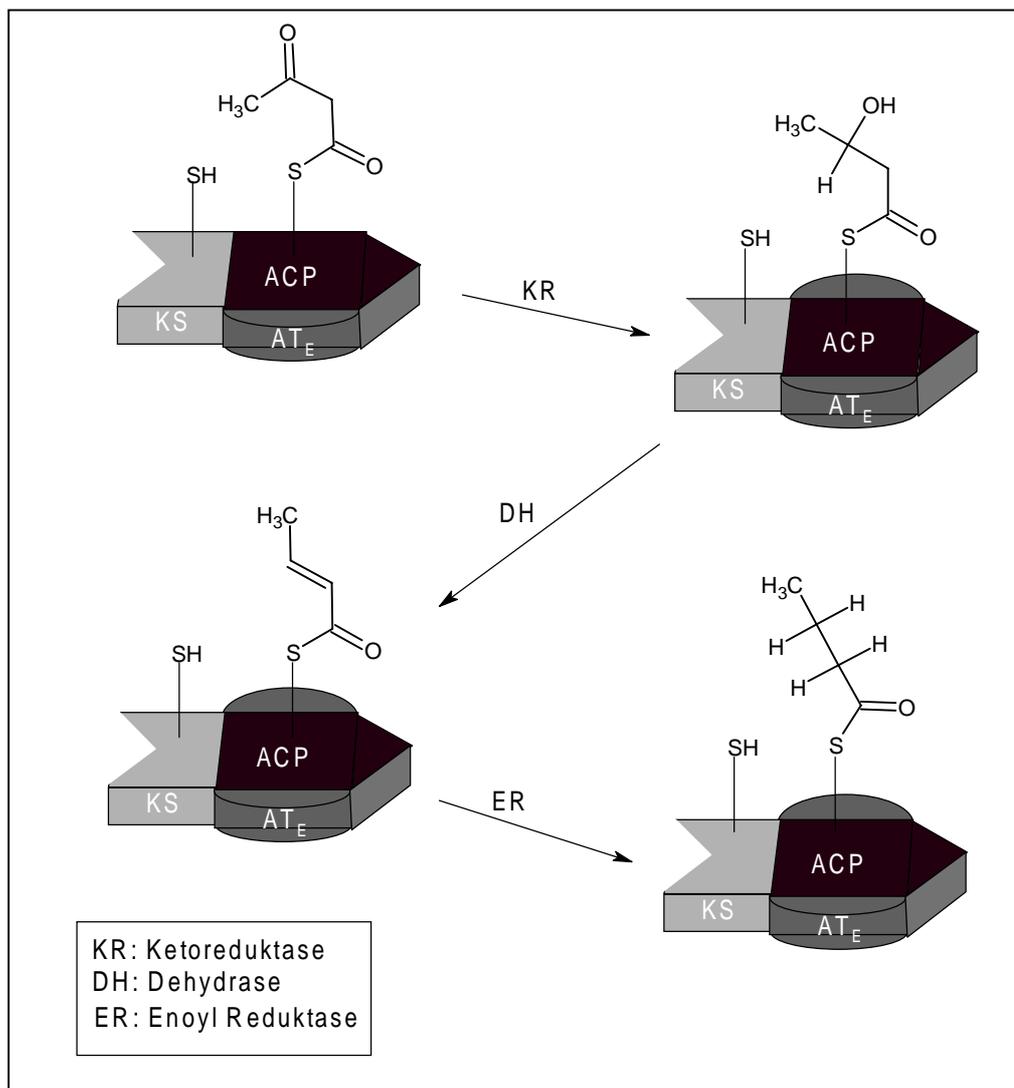
Abb. 31: Typ-1-PKS am Beispiel der 6-Desoxyerythronolid B (28**) Synthase (DEBS)**



Jedes Modul kann die Kette um einen Baustein erweitern. Dieses beinhaltet das Vorhandensein einer Ketosynthase (KS), einer Acyltransferase (AT) und einem Acylcarrierproteins (ACP) (**siehe auch Abb. 4**). Die Spezifität der Acyltransferase entscheidet, ob für die Kettenverlängerung Malonyl- oder α -Alkylmalonyl-CoA verwendet wird. Nachdem die Kette um eine Einheit verlängert worden ist, folgen die reduktiven Schritte. Dabei wird festgelegt, ob die β -Ketogruppe weiterhin als Ketogruppe vorliegt oder zur Hydroxyl-, Methenyl- oder Methylengruppe reduziert wird^[12, 40] (**siehe Abb. 32**).

Die dabei wirkenden Enzyme und deren Wirkungsweise soll durch das unten gezeigte Schema verdeutlicht werden.

Abb. 32: Reduktive Schritte bei der PKS-1-Synthase



Wie bei der in **Kap. 2.2** beschriebenen „Kombinatorischen Biosynthese“ mit der Typ-2-PKS, ist es ebenso mit der Typ-1-PKS möglich, eine Strukturvielfalt herzustellen, die in der Chemie ihresgleichen sucht. In den letzten Jahren konnte jedes Gen, welches für den Aufbau von Polyketiden verantwortlich ist, identifiziert und seine Funktion aufgeklärt werden.

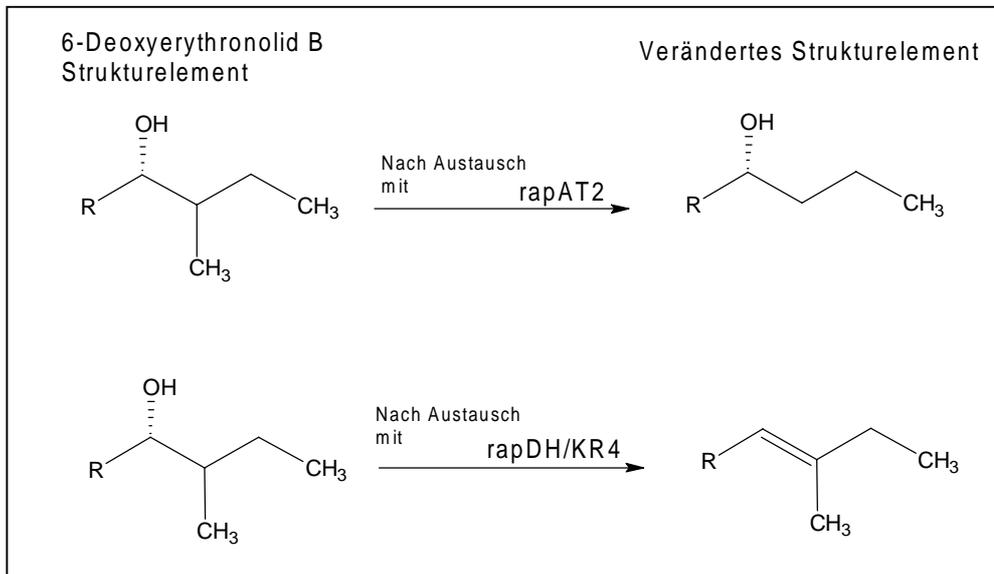
Durch gezielte Veränderungen dieser Gene konnte in jüngster Zeit eine Sammlung von über 50 verschiedenen Grundgerüststrukturen des 6-Deoxyerythronolid B hergestellt werden.

Zwei unterschiedliche Strategien wurden für die Herstellung dieser Substanzbibliotheken verwendet, die hier kurz vorgestellt werden sollen.

Eine Arbeit von R. McDaniel^[14] verfolgt die systematische Modifikation der 6-Desoxyerythronolid B (**28**) Synthese. Man verwendet ein einzelnes Plasmid, welches die drei Multienzym-Polypeptidketten *eryAI*, *ery AII*, *ery AIII* enthält. Die Modifikationen erreicht man durch Austauschen der Acyltransferase bzw. β -Kohlenstoff Domänen von 6-Desoxyerythronolid B gegen die von Rapamycin (z.B. rapAT2). Die Rapamycindomänen haben eine alternative Substratspezifität und Reduktions- bzw. Dehydratationsaktivität an den β -Kohlenstoffatomen. (**siehe Abb. 33**)

Die veränderte 6-Deoxyerythronolid B Synthase mit einfacher, doppelter oder dreifacher katalytischer Domänensubstitution kann zu den Erythromycin-Makroliden mit einfacher, zweifacher oder dreifacher Modifikation führen.

Ein Vorteil dieser Strategie ist, daß die einzelnen Mutanten auf ihre Produktivität überprüft werden können. Doch durch das separate Behandeln jeder einzelnen Kombination erweist sich diese Methode als sehr platz- und zeitaufwendig.

Abb. 33: Beispiele für die Substitution mit Rapamycin Genen

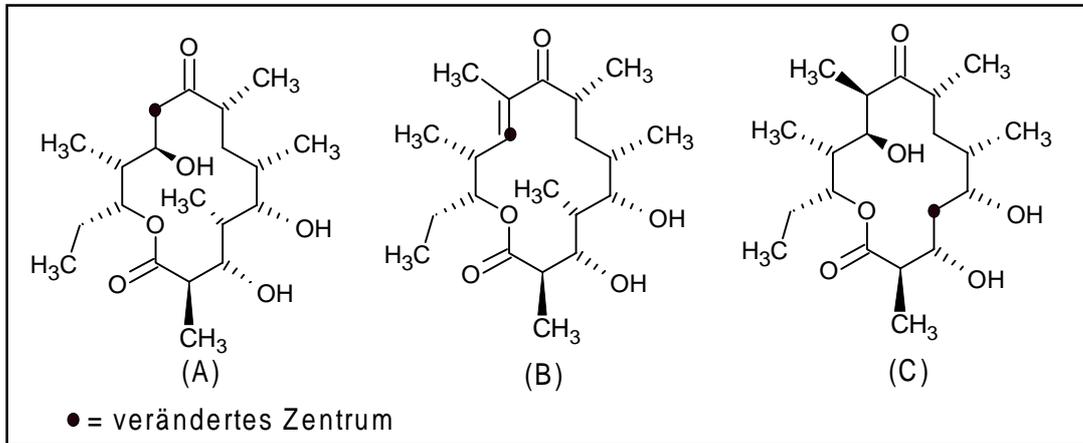
Eine Methode von C. R. Hutchinson^[41] verwendet einzelne Mutanten (Substitution von DEBS-Genen gegen Rapamycin-Gene), welche für ihre Produktivität bekannt sind und kombiniert diese in 3 verschiedene Plasmide für die Herstellung neuer Substanzen.

Um diese Kombination herstellen zu können, war es notwendig, Mutanten der individuellen ORF's (offenen Leserahmen, englisch: Open Reading Frame) in separate Plasmide zu exprimieren. Die Plasmide wurden anschließend in einen geeigneten Host coexprimiert, um die Produktion von Polyketiden zu stimulieren.

Diese Methode kann theoretisch X Mutanten von ORF1, Y Mutanten von ORF 2 und Z Mutanten von ORF 3 zusammen mit dem Wild-Typ enthalten. Es würde somit eine kombinatorische Bibliothek von $(X+1) * (y+1) * (z+1)$ Mutanten plus die Wild-Typ-PKS entstehen. In der Praxis ist aber nur ein Bruchteil der PKS in der Lage, neue Produkte in ausreichenden Mengen zu produzieren.

Die in von R. Hutchinson et al.^[41] isolierten Produkte deckten sich teilweise mit denen von R. McDaniel^[42], doch konnte der Arbeitsaufwand stark verkürzt werden.

Abb.34: Beispiele für isolierte Produkte (A) = Modul 2 (rapAT2)
(B) = Modul 2 (rapDH/KR4)
(C) = Modul 5 (rapAT2)



3.2 Die Besonderheit der Makropolyene

Die Besonderheit der Makropolyene ist ihre antifungische Wirksamkeit. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da laut mehrerer Berichte aus Krankenhäusern und Forschung ein erheblicher Anstieg von Mikroorganismen, die Resistenz gegen die heutigen Medikamente aufweisen, beobachtet werden kann^[43]. Im Gegensatz zu der bakteriellen Resistenz wurde die fungische Resistenz erst in den letzten Jahren verstärkt untersucht. Der Grund dafür liegt in der ebenfalls ansteigenden pathogenen Wirkung der Pilze. Dies ist sowohl durch Medikamente bedingt, welche immer mehr das Immunsystem beeinflussen bzw. schwächen, als auch durch die Immunschwächekrankheit AIDS. Diese beiden Punkte sind Anlaß für die intensive Suche nach neuen und effektiveren Fungiziden^[44, 45].

Das erste antifungisch wirkende Medikament war Amphotericin B (**27**), was bekannt für seine nephrotoxischen Nebenwirkungen ist. In den 80er und 90er Jahren wurden Medikamente der Substanzklassen Imidazole und Triazole eingeführt, welche eine sichere und effektive Methode zur Behandlung von lokalen und systematischen Pilzinfektionen darstellten. Die Gruppe der Triazole, insbesondere das Fluconazol (**29**) wurde im medizinischen Bereich intensiv eingesetzt. In den Vereinigten Staaten wurde dieses Medikament an ca. 16 Millionen Patienten, wovon 300.000 HIV-Patienten waren, seit der Einführung verabreicht. Die weitgestreute Verwendung dieses Medikaments hat unweigerlich zu einer ansteigenden Resistenz bei Pilzen geführt.

Da man die Resistenz bei Bakterien schon eingehend untersucht hat, könnte man annehmen, daß sich die Erfahrungen auch auf Pilze übertragen lassen. Leider erwies sich dieses als Trugschluß, da sich die Physiologie von Bakterien und Pilzen sehr voneinander unterscheidet. Pilze sind größtenteils diploider Natur und haben eine längere Reproduktionsdauer. Auch die Angriffspunkte unterscheiden sich erheblich. Zum Beispiel inhibieren antibakteriell wirkende Substanzen wichtige Schritte in der Biosynthese von Peptidoglycan, einem Stoff der für den Aufbau der Zellwand in Bakterien zuständig ist. Im Kontrast dazu inhibieren antifungisch wirkende Substanzen die Ergosterol-Biosynthese (**siehe Abb. 36**), eine wichtige Substanz der Zellmembran in Pilzen.

Einer der wichtigsten Unterschiede zwischen Bakterien und Pilzen liegt in der Verfügbarkeit von standardisierten Bakterienstämmen und Plasmiden, die eine Untersuchung der Resistenzmechanismen erlauben. Bei Pilzen sind solche Standardsysteme nicht vorhanden und somit kann man nur klinische Zellstämme verwenden, was eine Aufklärung der Resistenzmechanismen sehr schwierig bzw. manchmal unmöglich macht^[46].

Der Wirkungsmechanismus der drei klinisch verwendeten Hauptsubstanzklassen von den Wirkstoffen Azole, Polyene und Allylamine (**siehe Abb. 35 und Abb. 30**), beruht auf der Ergosterol Inhibierung oder der direkten Interaktion mit Ergosterol. Ergosterol stellt einen wichtigen Stoff für die Zellmembran von Pilzen dar, da es als Bioregulator von Membranflüssigkeit und für die Unversehrtheit der Zellmembran zuständig ist. Diese wichtigen Aufgaben machen es für die antifungischen Wirkstoffe zu einem bevorzugten Angriffsziel^[46].

Dabei beeinflussen die Gruppen der Azole und die der Allylamine bestimmte Syntheseschritte in der Biosynthese des Ergosterols.

Abb. 35: Beispiele von Azol- und Allylamin-Verbindungen

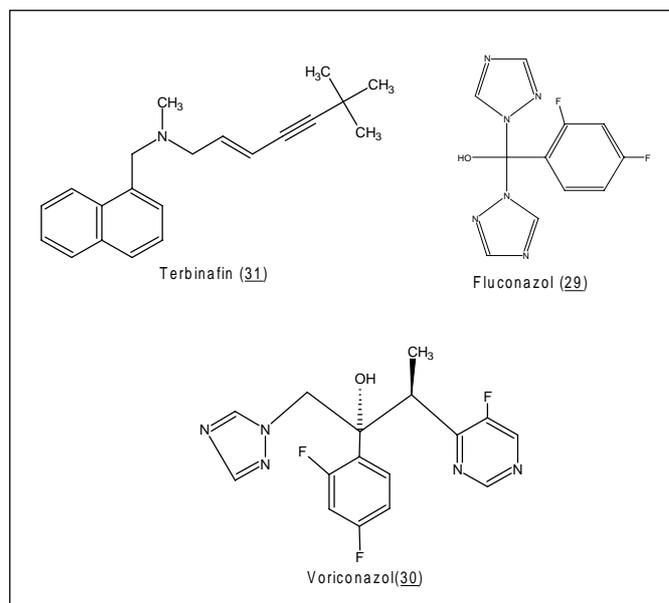
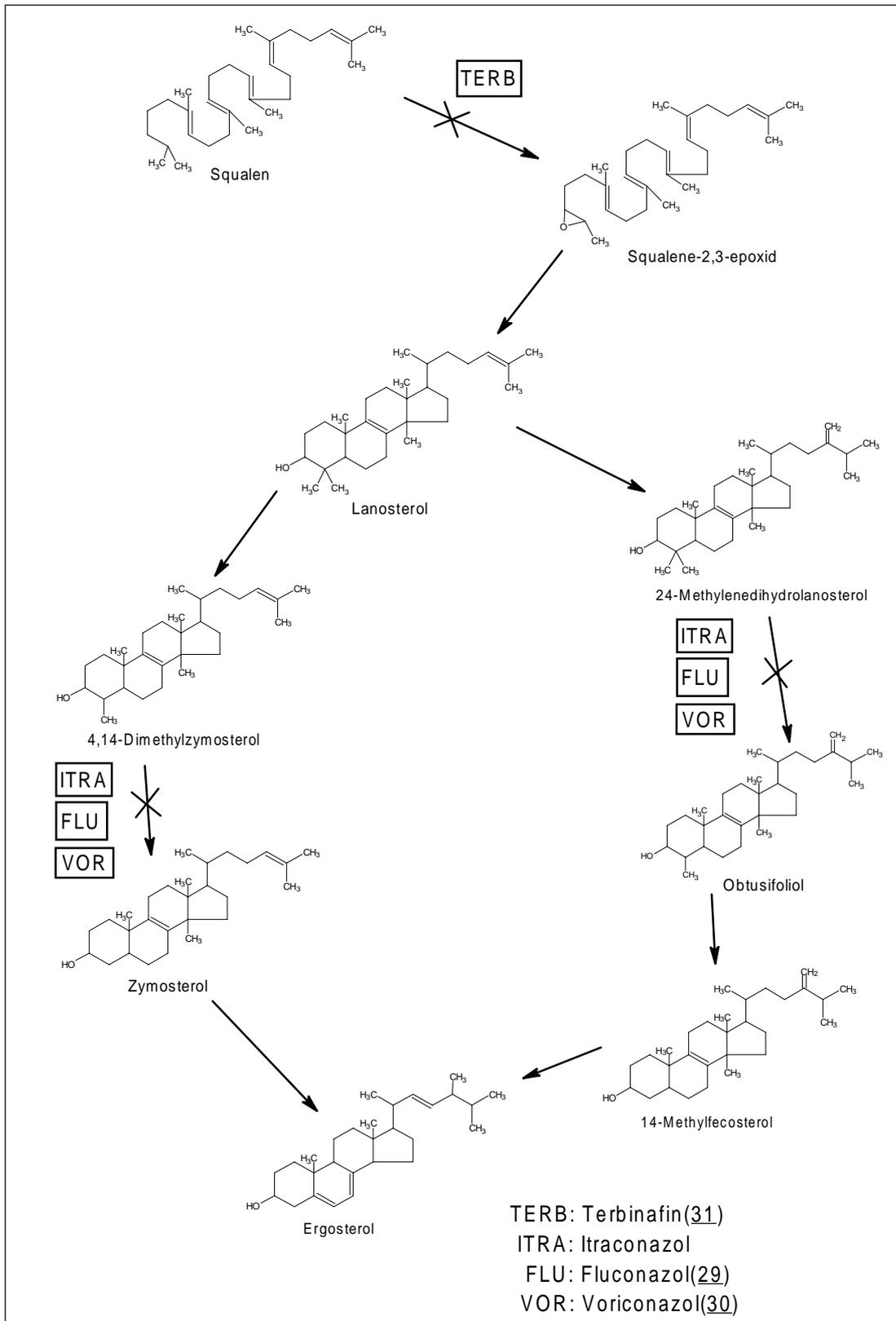


Abb. 36: Wirkungsweise der Allylamine und Azole

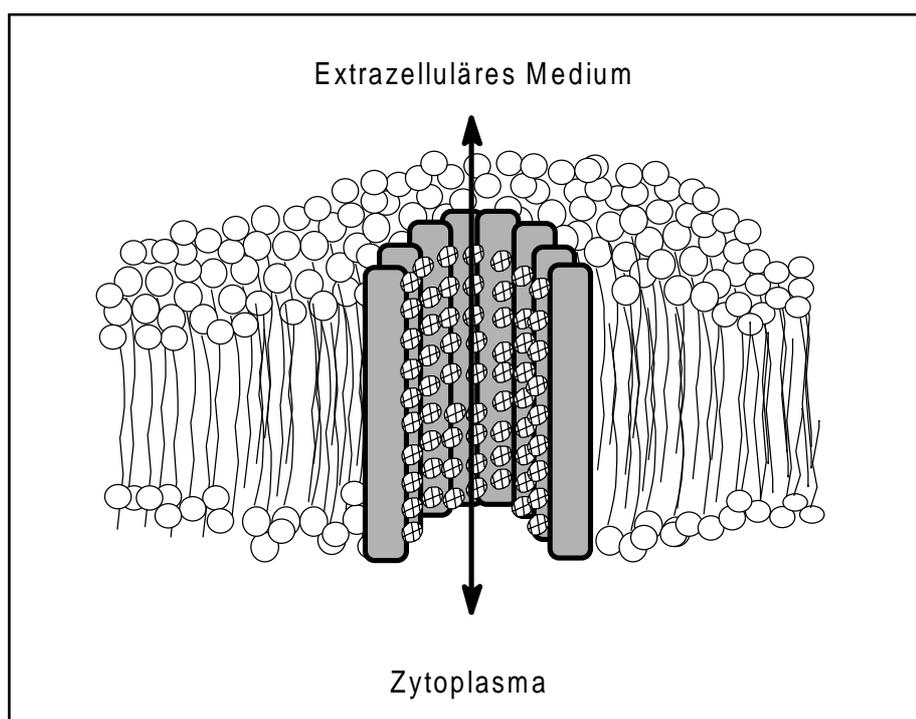


Anhand des Schemas (**siehe Abb. 36**) sieht man, daß Allylamine sehr früh in die Biosynthese eingreifen, während die Azole erst spät einen Einfluß auf die Biosynthese ausüben. Die Azole, wie Fluconazol (**29**), Voriconazol (**30**) und Itraconazol, entfalten ihre Wirkung durch Beeinflussung der Cytochrom P-450 abhängigen 14α -Sterol-demethylase^[47].

Die Allylamine, im speziellen Terbafine (**31**), inhibieren vermutlich die Steroid-Synthese an dem Punkt der Squalen-Epoxidation, d.h. die Reaktion, die durch eine Squalen-Epoxidase katalysiert wird^[46].

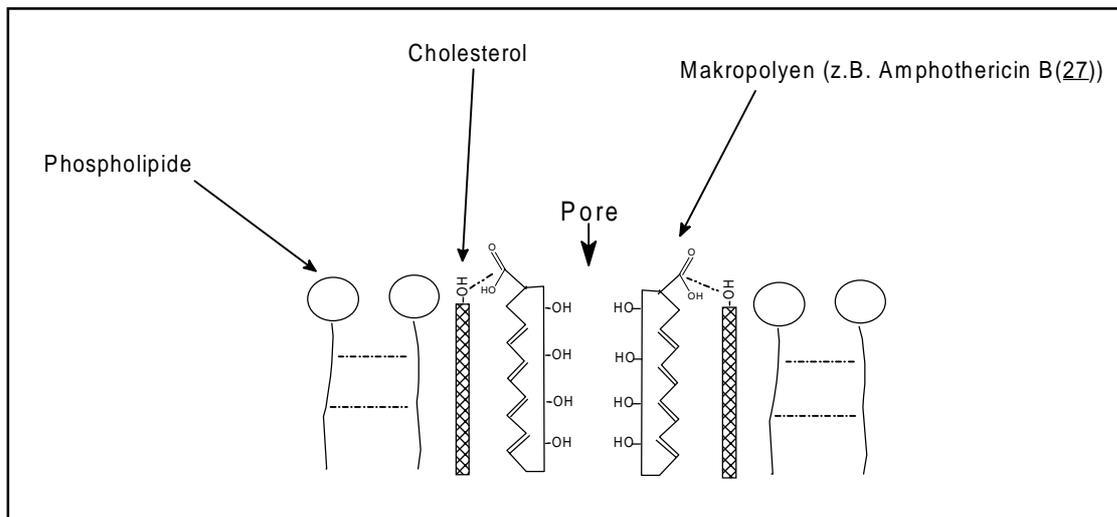
Die Substanzklasse der Polyene interagiert dagegen mit dem Ergosterol. Für Polyene ist es wichtig, daß sich Sterol in der Zellmembran befindet. Alle Organismen, die auf die Polyene einen Einfluß haben, wie z.B. Pilze, Algen und Protozoen, enthalten Steroide in ihrer Zellwand, während resistente Organismen diesen Bestandteil nicht enthalten. Dieser Tatbestand konnte durch verschiedene Experimente bestätigt werden. Doch nicht nur allein die Interaktion von Polyenen und Sterol führt zu der antifungischen Wirkung, sondern man konnte zeigen, daß bei großen Polyenen wie Amphothericin B (**27**), große wasserdurchlässige Poren gebildet werden^[48] (**siehe Abb. 37**).

Abb. 37: Schema der Porenbildung



Diese Anordnung, in der die hydrophile Seite (Hydroxygruppen) des Amphothericin (**27**) zum Poreinneren gerichtet ist (**siehe Abb. 38**), führt zu einer ansteigenden Permeabilität, was das Auslaufen von Zytoplasmakomponenten nach sich zieht und schließlich den Tod des Organismus hervorruft. Daneben konnten in *Candida albicans* oxidative Reaktionen beobachtet werden, die ebenfalls zu dem Zelltod führen.

Abb. 38: Schema der Wechselwirkungen



Amphothericin B (**27**) ist eine der effektivsten antifungisch wirkenden Substanzen, aber ihr Einsatz in der Medizin ist durch ihren sehr engen therapeutischen Index stark eingeschränkt. Die Toxizität von Amphothericin B (**27**) beinhaltet akute wie auch chronische Effekte. Akute Effekte wie Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit und Kreislaufbeschwerden entstehen während der Infusion. Chronische Effekte wie Blutarmut und ZNS-Störungen entstehen zumeist nur bei Langzeittherapien^[49].

Um diese Nebeneffekte zu reduzieren, wurde Amphothericin B (**27**) in Liposomen eingeschlossen, was einen Transport von höheren Dosen begünstigt, und die Toxizität gegen Mammaliazellen verringert.

Der Mechanismus für die reduzierte Toxizität und gesteigerte Aktivität hängt mit der Aufnahmefähigkeit von Liposomen zusammen. Amphothericin B (**27**) wird von den Liposomen komplett umschlossen und durch die höhere Affinität von Ergosterol zu Amphothericin B (**27**) erst in der Zellwand wieder freigelassen^[49].

3.3 Streptomyces Sp106

3.3.1 Fermentation und Isolierung

Der Stamm *Streptomyces Sp106*, welcher von einer spanischen Arbeitsgruppe von Prof. F Malpartida aus kubanischer Erde isoliert worden war, zeigte in einem ersten Screening eine Aktivität gegen Pilze. Aufgrund dieses Befundes wurde der Stamm an die Arbeitsgruppe Rohr übergeben, um die Isolierung und Charakterisierung möglicher Sekundärmetabolite vorzunehmen. Das von der spanischen Arbeitsgruppe zur Sporenvermehrung verwendete Medium, ist das von Hopwood (Hopwood Manual) beschriebene R5-Medium.

Um das optimale Medium für Flüssigkulturen herauszufinden, wurden verschiedene Medien getestet (siehe im Anhang Medium 1, Medium 2, Medium 3). Es stellte sich heraus, daß ein Wechsel des Mediums keine große Auswirkung auf die Ausbeute der einzelnen Komponenten hat, sehr wohl aber auf den Arbeitsaufwand bei der Aufarbeitung und auf den Kostenfaktor des Nährmediums.

Die Fermentation wurde bei 28° C durchgeführt und konnte nach drei Tagen gestoppt werden, da das Produktionsmaximum erreicht war. Zum Konzentrieren der Lösungen wurde das Verfahren der Lyophilisation angewendet, da die Stoffe sehr polar sind. Der entstandene braune Feststoff konnte nur teilweise in Wasser wieder auflöst werden, da sich noch Zellreste in der Lösung befanden. Die Feststoffe konnten über einen Faltenfilter entfernt werden.

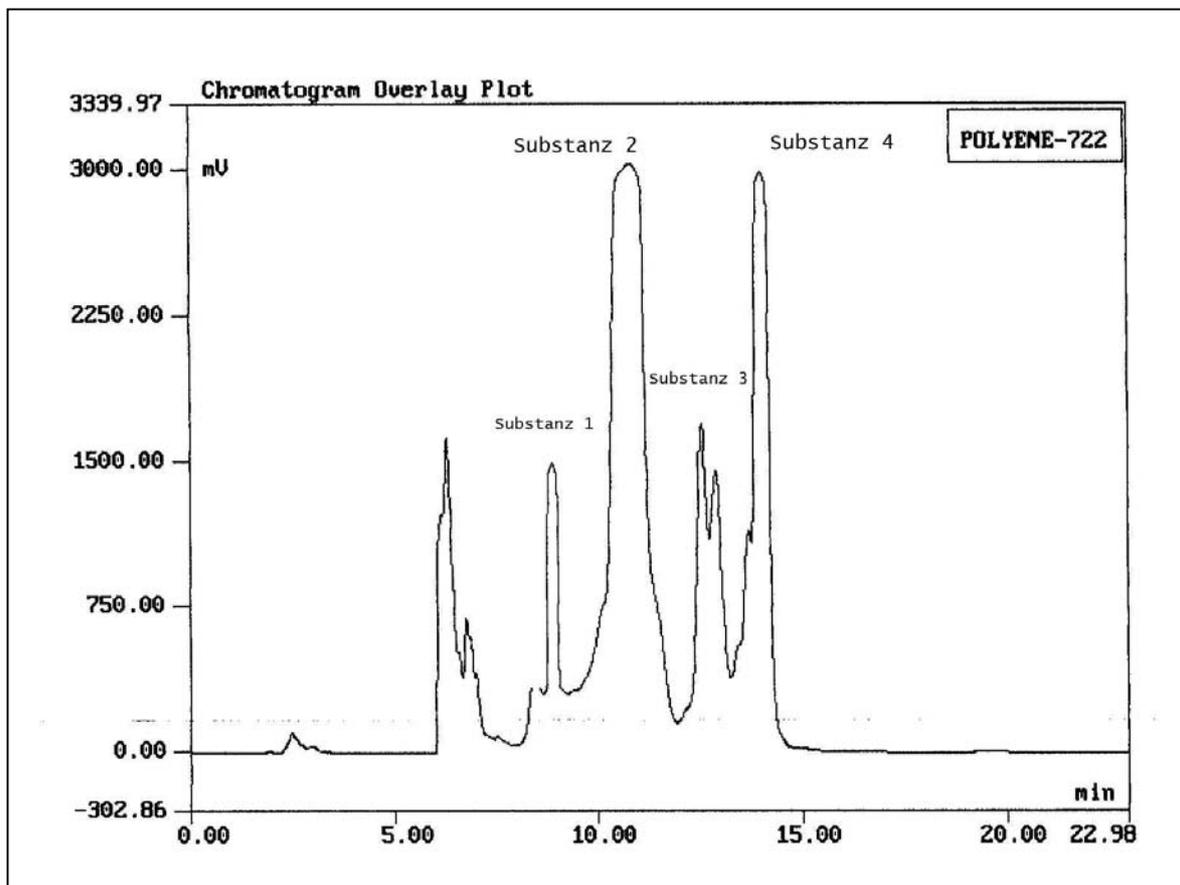
Eine Aufreinigung mittels Kieselgelchromatographie bzw. Sephadex LH-20 führte zu keinem Erfolg, da die Hauptproduktphasen sich nicht voneinander trennen ließen.

Während der Voruntersuchungen konnten folgende Erkenntnisse über die Substanzen erhalten werden. Die Substanzen erwiesen sich als farblos und zeigten auf dem Kieselgel-DC nur eine sehr schwache UV-Fluoreszenz bei der Wellenlänge 366 nm. Auch Versuche mit Anfärbemitteln wie Iod und Anisaldehyd ergaben eine mäßige Identifikation. Die Anfärbung mit Anisaldehyd führte zu einer leichten Braunfärbung und gab einen ersten Hinweis auf das mögliche Vorhandensein von Aminogruppen oder Zuckern.

Am geeignetsten erschien die Auftrennung mittels HPLC mit einer RP18-Säule. Als bestes Laufmittel stellte sich Wasser/Acetonitril im Gradientenverhältnis (siehe Experimenteller Teil) heraus und zur Detektion der Produkte wurde eine Wellenlänge von 304 nm benutzt.

In dem Chromatogramm (siehe **Abb. 39**) kann man die zwei Hauptkomponenten bei Peak 2 (**32**) und Peak 4 (**33**) erkennen. Bei den gekennzeichneten Nebenprodukten 1 und 3 handelt es sich ebenfalls um Makropolyene, wobei aufgrund der geringen Substanzmengen noch eine vollständige Charakterisierung aussteht.

Abb. 39: HPLC-Chromatogramm bei einer Wellenlänge von 304 nm.



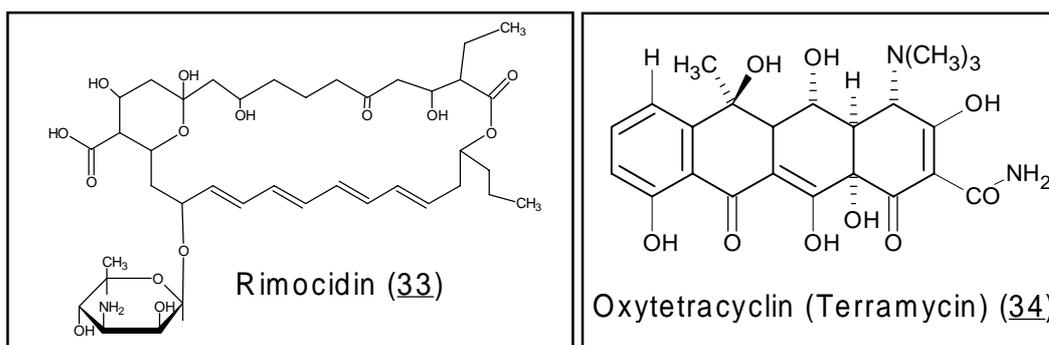
3.4 Strukturaufklärung

3.4.1 Literaturrecherche

Für die Hauptprodukte konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden. Im FAB-Massenspektrum (pos. Ionen) der Reinsubstanzen erhielt man für Substanz 2 (**32**) eine Molekülmasse von $m/e=740$ $[M+H]^+$ und für die Substanz 4 (**33**) $m/e=768$ $[M+H]^+$. Aus dem ^1H -Spektrum für den Stoff 2 (**32**) kann man auf ca. 48 sichtbare H-Atome schließen und das ^{13}C -Spektrum ergab 57 C-Atome. Aus diesen Erkenntnissen konnte man auf eine Summenformel von $\text{C}_{37}\text{H}_{56}\text{NO}_{14}$ schließen. In einer Literaturrecherche konnte keine Übereinstimmung mit den bis dato isolierten Verbindung gefunden werden.

Für Substanz 4 (**33**) konnte man ca. 52 H-Atome erkennen und das ^{13}C -Spektrum zeigte 39 C-Atome an. Man erhielt damit eine Summenformel $\text{C}_{39}\text{H}_{61}\text{NO}_{14}$. In diesem Fall ergab eine Literaturrecherche eine gute Übereinstimmung mit dem in den 50er Jahren von J.W. Davisson et al.^[50] gefundenen Makropolyen Rimocidin (**33**). Dieser Stoff wurde aus dem Stamm *Streptomyces rimosus* neben dem Stoff Terramycin (**34**) isoliert. Seine Strukturaufklärung wurde in den 60er Jahren von C. Cope et al.^[51] begonnen und wurde in der Mitte der 70er Jahre von Ramesh und Rinehart^[52] beendet. Zumindest seine Konstitutionsstruktur konnte bis dato geklärt werden. Die absolute Stereochemie wurde aber erst durch die polnische Arbeitsgruppe von P. Sowinski et al.^[53] im Jahre 1995 anhand eines Derivates mittels NMR bewiesen.

Abb. 40: Hauptprodukte des Produzenten *Streptomyces rimosus*



3.5 Strukturaufklärung von Substanz 4 (**33**) bzw. Rimocidin

Wie schon in dem Kapitel 3.4.1 erwähnt, ließ die durch HPLC isolierte Substanz 4 (13.5 min Retentionszeit) die Vermutung zu, das es sich hierbei um Rimocidin (**33**) handelt. Die massenspektroskopisch erhaltene Summenformel stimmte mit dem aus der Literatur erhaltenem Wert exakt überein. Auch andere charakteristische Werte, wie die UV-spektroskopischen Daten und der Schmelzpunkt stimmten mit den Literaturwerten überein. Für eine endgültige Bestätigung, sollte ein Vergleich von NMR-Daten den besten Hinweis geben.

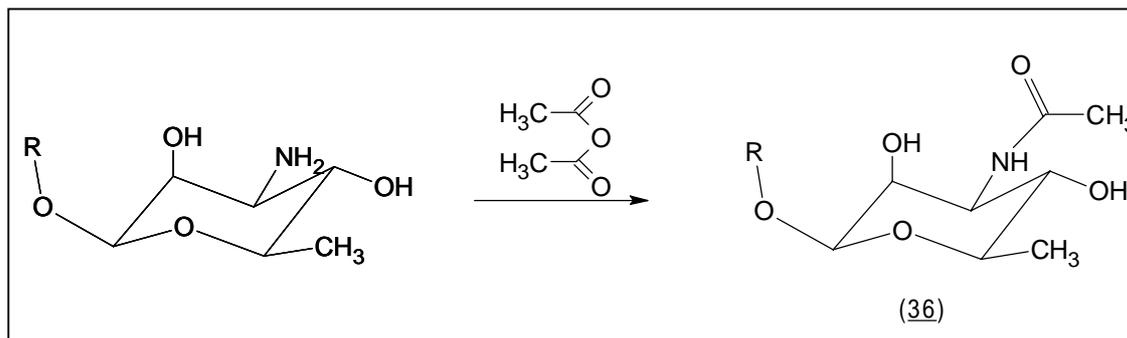
Von Rimocidin (**33**) selber gibt es keine veröffentlichten NMR-Spektren, die hilfreich für einen Vergleich wären. Das Problem bei Rimocidin (**33**) ist dabei seine schlechte Löslichkeit in den Standard-NMR-Lösungsmitteln und die daraus resultierende schlechte Auflösung der Signale.

In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 1995 beschreibt eine polnische Arbeitsgruppe^[53] einen Weg, wie durch Synthese eines Derivats die Löslichkeit stark verbessert wird und eine Aufklärung mittels NMR möglich ist.

3.6 Derivatisierung von Rimocidin

3.6.1 Acetylierung der Aminogruppe

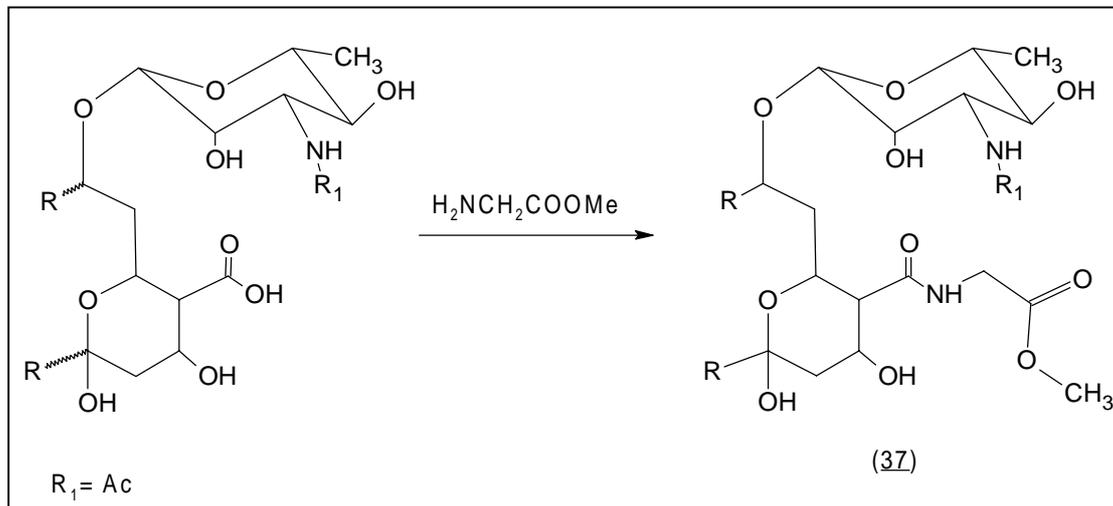
Abb.41: Acetylierung der Aminogruppe



In dem ersten Syntheseschritt wurde selektiv die Aminogruppe am Zucker acetyliert^[54]. Dieses erreicht man durch verwenden von Lösungsmitteln wie Methanol oder einer Mischung aus Tetrahydrofuran und Wasser. In der Literatur werden beide Lösungsmittel beschrieben, wobei in beiden Fällen die Ausbeuten bei ca. 90% liegen. Ein Nachteil, der sich bei der Verwendung des Tetrahydrofuran/Wasser-Gemisch herausstellte, ist das Entfernen des Wassers. Daher wurde in den hier verwendeten Reaktionen trockenes Methanol dem THF/Wasser Gemisch vorgezogen. Nach HPLC-Analyse erhielt man das gewünschte Produkt mit 95% Ausbeute. Die massenspektroskopische Analyse ergab für Derivat1(**36**) eine Masse von 809.8 g/mol und somit die Summenformel C₄₁H₆₃NO₁₅.

3.6.2 Amidierung der Carbonsäuregruppe an Position 14

Abb. 42: Reaktionsschema der Amidierung



Als zweiten Derivatisierungsschritt wurde eine Reaktion verwendet bei der durch Reaktion von Glycinmethylester die Carbonsäure in der Position 14 zu einem Amidderivat umgewandelt wird. Ursprünglich wurde diese Reaktion bei dem Polyenmakrolid Aureofacin verwendet um ein biologisches Essay zu erfassen und somit eine Struktur-Wirkungsbeziehung herzustellen. Dabei wurde eine Anzahl von verschiedenen Glycinestern verwendet^[55].

Im Fall von Rimocidin wurde dieser Reaktionsschritt zur weiteren Verbesserung der Löslichkeit herangezogen.

3.7 Strukturaufklärung von Rimocidin-Derivat (37)

3.7.1 Mycosamin-Derivat (35)

Abb.43: HMBC-Korrelationen von Mycosamin-Derivat (35)

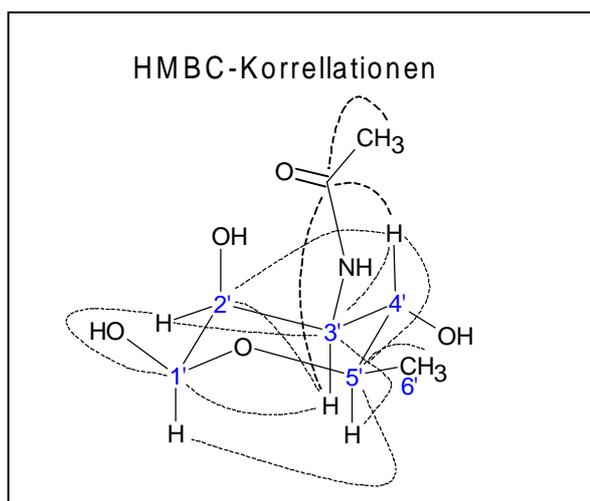


Tabelle 2: Mycosamin-Derivat (35)

Atom-Nr.	δ_H	δ_C
1'	5.29	98.3
2'	4.55	71.1
3'	3.65	56.2
4'	4.02	72.6
5'	3.95	74.5
6'	1.59	18.8
3'-NHCOMe		
-CO		172.0
Me	2.10	23.2

Im Fall von Stoff 4 (33) findet man ebenfalls Mycosamin als den Zuckerbaustein. Anhand der HMBC-Korrelationen, welche oben dargestellt sind, kann man sehr gut die Verknüpfung der Acetylgruppe mit der Aminogruppe erkennen. Bei dem Vergleich der Daten mit der Rimocidin-Veröffentlichung fällt auf, das vermutlich ein Fehler in den Veröffentlichungsdaten^[53] vorliegt. Das ^{13}C -Signal an Pos. 3' soll laut der Veröffentlichung bei $\delta_C = 68.28$ liegen, während das von uns gemessene

Signal bei $\delta_C = 56.23$ liegt. Nach Vergleich mit anderen Literaturdaten^[56, 57] kam man zu dem Entschluß, das vermutlich bei der Literaturstelle^[53] ein Fehler aufgetreten ist.

Abb. 44: H,H-COSY- und HMBC-Korrelationen des Aglykons (37)

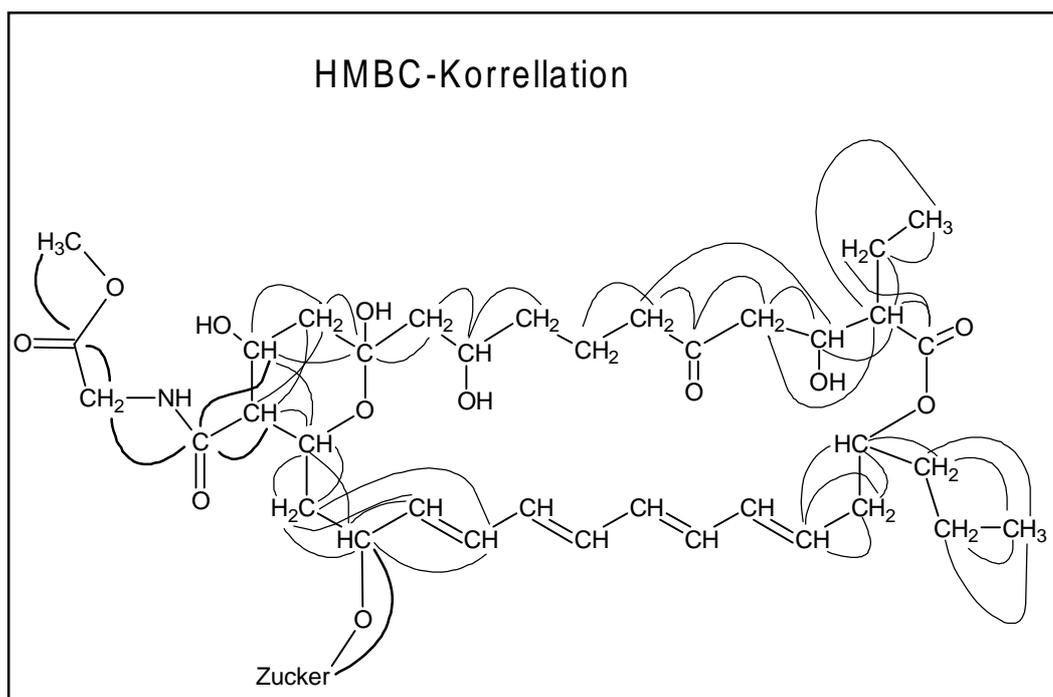


Tabelle 3: NMR-Daten Aglykon des Rimocidin-Derivats (**37**)

Atom-Nr	δ_H	δ_C
1		173.57
2	2.67	57.45
2"	2.30; 1.85	23.17
2"	1.06	14.14
3	4.64	68.84
4	2.70; 2.91	49.59
5		210.40
6	2.70; 2.55	45.20
7	1.75; 2.05	20.49
8	1.40; 1.63	38.37
9	4.54	68.59
10	1.78; 1.90	47.08
11		98.35
12	1.80; 2.55	45.65
13	5.12	66.45
14	2.85	58.10
14 -CO		174.49
15	5.23	66.90
16	2.98; 2.15	38.54
17	4.95	76.48
18	6.39	137.88
19	6.30	129.28
20		134.01
21	6.21	132.21
22	6.21	132.88
23	6.21	132.54
24		134.10
25	5.75	131.48
26	2.30; 2.45	38.61
27	5.23	73.54
28	1.63; 1.51	37.40
29	1.37	18.77
30	0.90	14.14
	Gly-OMe	
CH2	4.63; 3.99	41.45
-CO		171.04
Me	3.88	52.53

Anhand der in **Abbildung 49** gezeigten Korrelationen und Vergleichen mit Daten aus der Literatur ließ sich die Struktur aufklären. Anhand der HMBC-Kopplungen des Carbonsäure C-Atoms $\delta_C = 174.49$ auf die H-Atome des Glycinesters $\delta_H =$

2.85 und $\delta_H = 4.64$ konnte sehr gut die Verknüpfung des Glycineesters mit dem Aglykon charakterisiert werden.

Es war im Gegensatz zu den Literaturdaten nicht möglich eine genaue Zuordnung der C-Atome in der Tetraen-Bindungen vorzunehmen, da die Signale als ein multiplett erscheinen. Die COSY-Kopplungen ergeben ein ähnliches Korrelationsmuster wie im Fall der Substanz 2 (**32**) und sind in **Tabelle 5** aufgeführt.

Tabelle 4: COSY-Daten von Aglykon Rimocidin-Derivat (**37**)

δ_H	Korrelationen				
0.90	1.37				
1.06	1.85	2.30			
1.37	1.51	0.90	1.63		
1.40	2.05				
1.51	1.63	5.23			
1.63	1.40	1.51	2.05	4.54	5.23
1.75	2.05				
1.80	1.90	2.55	5.12		
1.85	1.06	2.30	2.67		
1.90	4.54				
2.05	1.75	2.55	2.70	1.40	1.63
2.15	2.98	5.23			
2.30	1.06	1.85	2.67	5.23	5.75
2.45	2.30	5.75			
2.55	1.75	1.80	2.05	2.70	5.12
2.70	1.75	1.85	2.05	2.55	2.91
2.85	5.23				
2.91	2.70	4.64			
2.98	2.15	4.95			
4.55	1.40	1.63	1.90	4.65	
4.64	2.67	2.91			
4.65	4.55	4.02			
4.95	2.98	6.39	2.15		
5.12	1.80	2.55	2.85		
5.23	1.51	1.63	2.15	2.30	2.85
5.75	2.30	2.45	6.21		
6.30	2.30	5.75			
6.39	4.95	6.30			

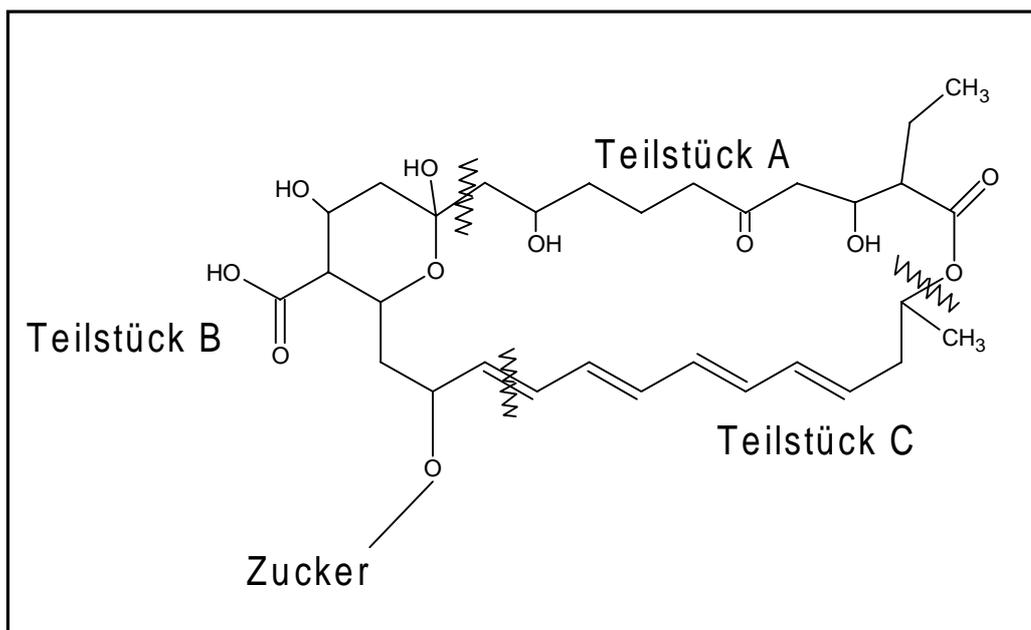
Es war somit klar, daß es sich bei der Hauptkomponente (**33**) um das Makropolyen Rimocidin handelt.

3.8 Charakterisierung der Strukturen von Substanz 2 (32)

Bei der Substanz 2 (32) handelt es sich ebenfalls um ein Makropolyen, welches der Substanz Rimocidin (33) gleicht. Der Unterschied zwischen den beiden Stoffen liegt in der Seitenkette, wobei Substanz 2 (32) eine Methylseitenkette enthält anstatt der in Rimocidin (33) vorhandenen Propylseitenkette.

Aufgrund der Größe von Makropolyenringen und der Komplexität bei der Aufklärung wird zum besseren Verständniss die Substanz 2 (32) gedanklich in drei Teilstücke zerlegt und einzeln besprochen.

Abb. 45: Aufteilung des Makropolyenes in verschiedene Teilstücke



3.8.1 Aufklärung des Zuckers: Mycosamin(38)

In Analogie zu den bis heute isolierten Makropolyenen ist eine Variation der Zucker am Makropolyenring nicht zu erwarten. Der am häufigsten gefundene und sehr gut charakterisierte Zucker ist Mycosamin (38). Man findet ihn in Makropolyenen wie z.B. Amphotericin B (27). Man konnte nun davon ausgehen, dass es sich mit größter Wahrscheinlichkeit in dem neu Makropolyene um diesen Zucker

handelt. Die ^{13}C -Daten zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Daten.

Abb. 46: COSY- und HMBC-Korrelationen von Mycosamin (38)

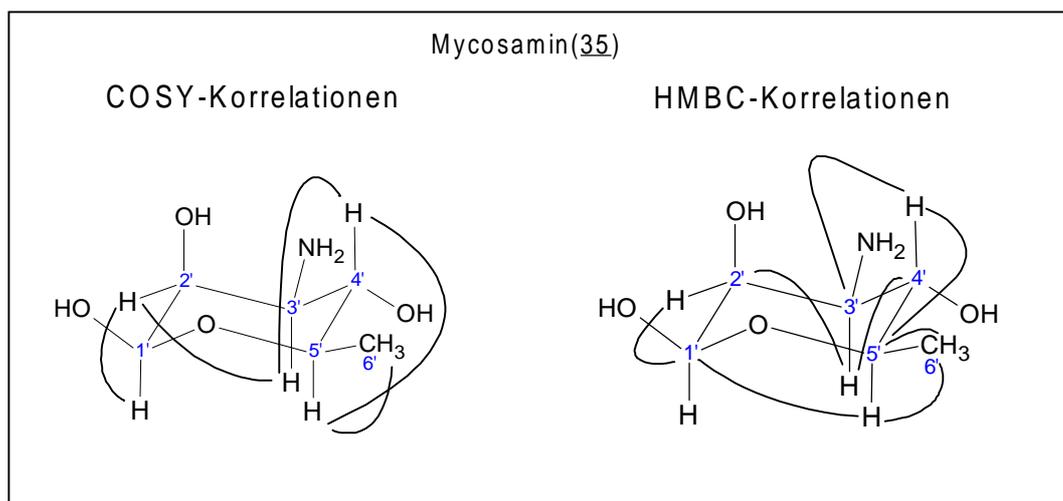


Tabelle 5: NMR-Daten von dem Zucker Mycosamin (38)

ATOM-Nr.	δ_{H}	Multiplizität (Hz)	δ_{C}
1'	4.62	s	98.2
2'	4.03	d, $J = 2.75$	68.0
3'	3.20	dd, $J = 2.75, 9.0$	56.1
4'	3.37 ^{*a}	m	69.5
5'	3.35 ^{*a}	m	73.5
6'	1.31	d, $J = 6.0$	16.7

^{*a}: Signale werden durch Lösungsmittelsignal teilweise verdeckt

Mycosamin (**38**) ist ein Aminozucker, was durch die Tieffeld-Verschiebung des ^{13}C - Signals an Position 3' bei $\delta_{\text{C}}=56.1$ belegt wird. Die Konstitution wird durch die oben dargestellten zwei 2D-NMR-Experimente (COSY und HMBC, jeweils 500MHz, CD_3OD) bestätigt.

Anhand der ^{13}C -NMR Signale kann man eine Aussage über die Stellung der Methylgruppe machen. In Desoxyzuckern sind äquatorial stehende Methylgruppen gegenüber axialen Methylgruppen hochfeldverschoben. Dies lässt sich gut am Beispiel von Kirromycin^[58, 59] zeigen, das an der C-4 Position zwei Methylgruppen

trägt. Hier zeigt die axial-stehende Methylgruppe im ^{13}C -NMR-Spektrum eine chemische Verschiebung von $\delta_{\text{C}} = 24.5$, die äquatorial ständige Methylgruppe von $\delta_{\text{C}} = 15.9$.

Im Fall von Mycosamin gibt die an C-5' sitzende Methylgruppe eine chemische Verschiebung von $\delta_{\text{C}} = 16.7$, was auf eine äquatoriale Position schließen läßt.

Zum anderen weist die Kopplung von H-3' auf H-4' mit einem Wert von $J = 9$ Hz auf eine axial-axial Stellung der Protonen hin, während die Kopplung von H-3' auf H-2' eine axial-äquatorial bzw. äquatorial-äquatorial Stellung mit $J = 2.97$ Hz angibt.

Man kann davon ausgehen, daß es sich bei dem Zucker um Mycosamin (**38**) handelt.

3.8.2 Teilstruktur A vom Aglykon

Bei Teilstück A handelt es sich um die hydrophile Seite des Polyenes, welche bei der Bildung von Poren zur Lochmitte gerichtet ist und somit den Transport von polaren Substanzen in und aus der Zelle begünstigt (siehe in Kap. 3.2, Abb. 38).

Abb. 47: COSY- und HMBC-Korrelationen im Teilstück A

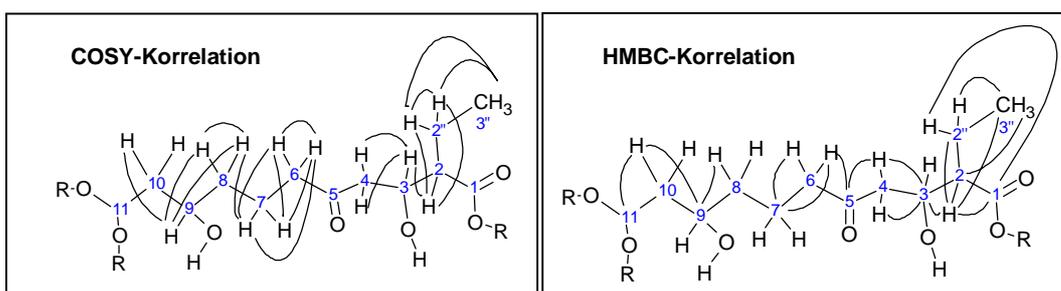


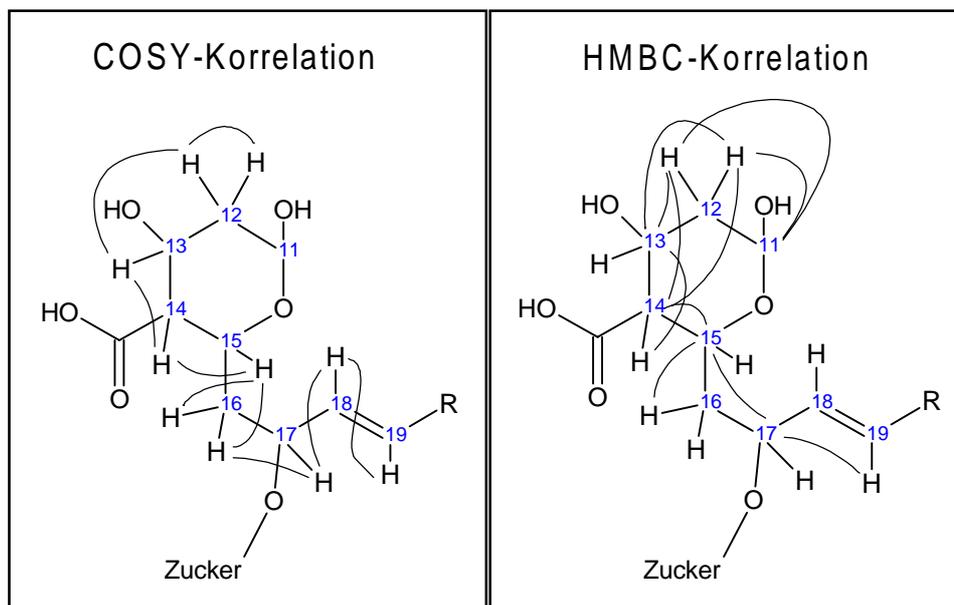
Tabelle 6: NMR-Daten Teilstück A

Atom-Nr	δ_H	δ_C
1		173.4
2	2.18	56.3
2''	1.59, 1.90	22.4
3''	0.92	10.9
3	4.11	68.5
4	2.37, 2.46	48.8
5		210.6
6	2.46, 2.32	44.3
7	1.39, 1.61	19.6
8	1.39, 1.30-1.26	37.6
9	4.12	68.4
10	1.61	46.5
11		97.8

Anhand der H,H-COSY- und HMBC-Kopplungen kommt man zu dem oben gezeigten Teilstück A. Die entscheidenden Kopplungen, welche zu der Teilstruktur führten sind die HMBC-Kopplungen zwischen C-5 $\delta_C = 210$ (Ketogruppe) und der an C-6 bzw. C-4 sitzenden Wasserstoffatome. Die HMBC-Kopplung zwischen C-11 $\delta_C = 97.8$ und dem Wasserstoffatom an der Position C-10 gibt Aufschluß über die Verknüpfungstelle zwischen dem Teilstückes A und dem Teilstück B.

3.8.3 Teilstruktur B

Bei dem unten gezeigten Teilstück B handelt es sich um den sechsgliedrigen Lactonring mit den jeweiligen Verknüpfungsstellen zu dem hydrophilen Teilstück A und hydrophoben Teilstück C.

Abb.48: COSY- und HMBC-Korrelationen im Teilstück B**Tabelle 7: NMR-Daten Teilstück B**

Atom-Nr.	δ_H	δ_C
11		97.8
12	2.02, 1.30-1.26	44.1
13	4.29	66.9
14	2.03	60.5
-COOH		179.3
15	4.37	66.6
16	2.30, 1.70	38.7
17	4.45	78.2

Eine Kopplung, die Aufschluß über die Verknüpfung zwischen dem Teilstück A und B angibt, ist die Kopplung des C-11 Atoms und den beiden Wasserstoffatomen an Position C-12. Das Atom an der Position 17 stellt den Verknüpfungspunkt zwischen Teilstück B und C dar und durch die HMBC-Kopplungen mit dem anomeren Wasserstoffatom, wird gleichzeitig die Position des Zuckers in der Substanz festgelegt. Die weitere Struktur ergibt sich durch die gezeigten COSY und HMBC-Korrelationen.

3.8.4 Teilstruktur C

Bei der Teilstruktur C handelt es sich um den hydrophoben Teil der Struktur, der wie schon im vorhergehenden Kapitel besprochen, verantwortlich für die Interaktion der Polyene mit der lipophilen Zellwand ist und damit einen wichtigen Bestandteil für den Wirkungsmechanismus darstellt. Sein Aufbau ist geprägt durch vier konjugierte Doppelbindungen. Die Verknüpfung mit der hydrophilen Teilstruktur A erfolgt durch eine Lactonbindung.

Abb. 49: COSY- und HMBC-Korrelationen im Teilstück C

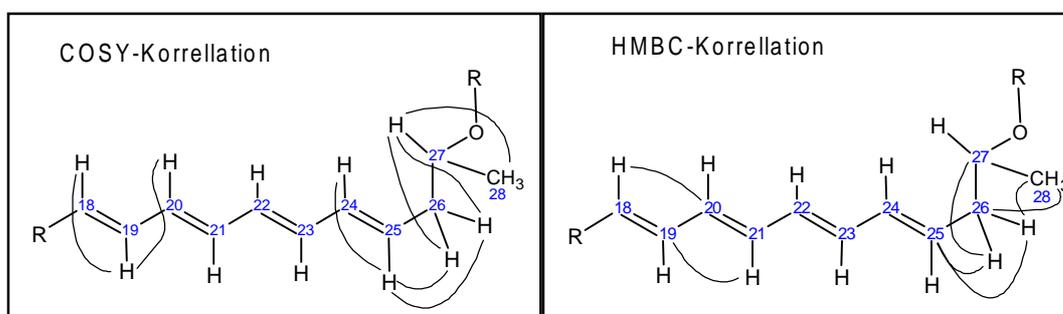


Tabelle 8: NMR-Daten Teilstück C

Atom-Nr.	δ_H	δ_C
18	5.95	136.0
19	6.35	133.6
20	6.13*	129.3
21	6.13*	133.4
22	6.13*	132.3
23	6.13*	132.3
24	6.13*	132.6
25	5.63	131.1
26	2.32, 2.40	40.0
27	5.07	70.8
28	1.26	20.0

* : Signale sind untereinander vertauschbar

Die genaue Zuordnung der C-Atome bzw. H-Atome innerhalb des konjugierten Tetraensystems konnte nicht erfolgen, da die Signale im $^1\text{H-NMR}$ sehr stark

überlappen. Anhand der Kopplungskonstanten kann man aber auf eine E-Konfiguration schließen.

Die Position der Lactonbindung konnte durch Vergleich mit NMR-Daten bekannter Polyene vorgenommen werden. HMBC- und COSY-Korrelationen können bei dieser Art von Bindung keine Informationen liefern. Gleichzeitig gab das im ^{13}C -Spektrum sehr Tieffeld verschoben Signal an Position C-27 Aufschluß über die Strukturverknüpfung der Lactonbindung.

3.8.5 Nebenprodukte Substanz 1 (**39**) und Substanz 3

Es konnten neben den Hauptprodukten auch noch zwei Nebenkomponenten gefunden werden, von denen aber aufgrund der geringen Substanzmenge zur Zeit nur ^1H -NMR-Spektren vorliegen.

Im UV-Detektor konnte man aufgrund der starken Absorption bei 304 nm und schwachen Absorption bei 254 nm erkennen, daß es sich hierbei ebenfalls um Makropolyene handelt. In den zur Zeit verfügbaren NMR-Spektren von Substanz 1 (**39**) sieht man, daß eine hohe Ähnlichkeit zu den Spektren der Substanzen 2 (**32**) und 4 (**33**) herrscht. Ein Unterschied, der auffällt, sind besteht in den den veränderten Signale der Seitenkette.

Bei Substanz 3 handelt es sich um ein Gemisch aus zwei Substanzen, die mit dem entwickelten HPLC-Program nicht zu trennen sind und für die ein separater Trennungsweg entwickelt werden muß.

3.8.6 Test auf Aktivität gegen Hefepilze

Die beiden Makropolyene Substanz 2 (**32**) und Rimocidin (**33**) wurden zusammen mit Amphothericin B (**27**) gegen die beiden Hefepilze *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans* getestet.

Man verwendete dafür ein in der Literatur beschriebens Standardverfahren, welches in den meisten grösseren Krankenhäusern in Amerika verwendet wird ^[60].

Dafür wird in den ersten Testversuchen zumeist die Aktivität gegen Hefepilze getestet. Wirksame Substanzen wurden nach diesen ersten Studien dann gegen eine größere Anzahl von Pilzen getestet.

Für unser Testverfahren wurde eine Mikrotiterplatte mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen von 0.01 µg/mL bis 16 µg/mL hergestellt. Dabei stellte sich heraus, daß Amphothericin B (**27**) in seiner Wirksamkeit am stärksten ist und schon bei einer Konzentration von 0.25 µg/mL wird die minimale Hemmkonzentration (MIC) bei *C. albicans* erreicht, während Rimocidin (**33**) und Substanz 2 (**32**) nur eine schwache Wirksamkeit zeigen, wobei vermutlich die die minimale Hemmkonzentrationen (MIC) oberhalb der von uns verwendeten Konzentrationen liegt. Das gleiche Ergebnis konnte auch bei dem Stamm *C. neoformans* gefunden werden. Für Rimocidin (**33**) sollten die Werte normalerweise bei 5 µg/mL liegen.

Vermutlich kam es bei der Einwaage der beiden Substanzen (**32**) und (**33**) zu einem Fehler, da sie nicht in größeren Mengen vorhanden waren und eine Stammlösung wie bei Amphothericin B nicht angesetzt werden konnte.

3.9 Diskussion und Ausblick

Die beiden komplett charakterisierten Produkte aus *Streptomyces* sp 106 kommen beide aus der Familie der Makropolyene.

Dabei handelt es sich um das bekannte Rimocidin (**33**) und um ein neues, zuvor unbekanntes Makropolyen (**32**).

Auffallend bei diesen beiden Makropolyenen ist, daß sie sich nur in den Seitenketten unterscheiden. Aglykon und der Zucker (**38**) sind hingegen gleich aufgebaut und in der selben Art und Anordnung miteinander verknüpft.

Bei den Nebenprodukten, von denen es bis dato nur ¹H-NMR-Spektren vorhanden sind, deuten bei Vergleichen ebenfalls auf das Vorhandensein des gleichen Aglykons bzw. Zuckers hin. Hieraus folgt, daß das letzte Modul eine gewisse Flexibilität aufweist, und somit für die Variation der Makropolyene verantwortlich ist.

Eine Struktur- Wirkungs-beziehung konnte nicht gefunden werden, d.h. es konnte aufgrund der veränderten Seitenkette keine bessere bzw. schlechtere Aktivität gegen *Candida albicans* bzw. *Cryptococcus neoformans* beobachtet werden.

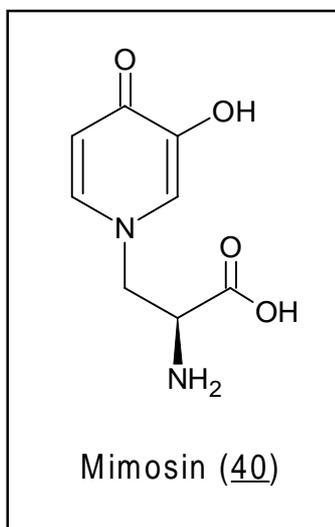
Dafür wirkt sich die Seitenkette auf die Löslichkeit aus. Während Substanz 2 (**32**) in Methanol noch relativ gut löslich war, nahm bei Rimocidin (**33**) die Löslichkeit in Methanol ab.

4. Mimosin

4.1 Einführung

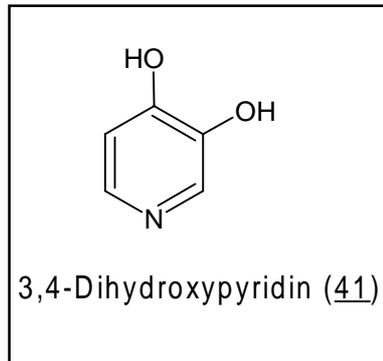
Mimosin 3-(3-Hydroxy-4-oxo-1(4H)-pyridyl)-L-alanin (**40**) ist eine toxische Aminosäure mit interessanten pharmakologischen Eigenschaften. Mimosin (**40**) wird von der zu den Mimosaceae zählenden Pflanzenart *Leucaena leucocephala* bzw. anderen Mimosenarten, z.B. *Mimosa pudica*, produziert^[61]. Mimosin (**40**) wird besonders in den Samen und Blättern der Pflanze angereichert^[62]. Die heterocyclische Substanz wurde zuerst aus der Pflanzenart *Mimosa pudica* isoliert und von Renz et al.^[63] im Jahre 1936 als Mimosin (**40**) bezeichnet. Später im Jahre 1946 wurde sie auch in der Pflanze *Leucaena leucocephala* von Klipool und Wibaut^[64] detektiert.

Abb. 50: Struktur von Mimosin (40**)**



Als weitere Substanz konnte 3,4-Dihydroxypyridin (**41**), aus *Leucaena leucocephala* isoliert und charakterisiert werden.

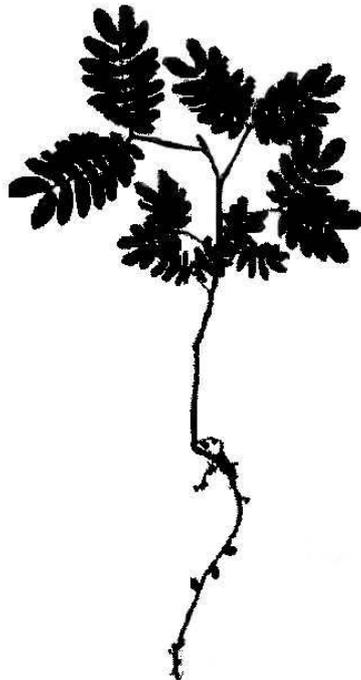
Abb. 51: Struktur von 3,4-Dihydroxypyridin (41)



4.2 Details zu der Pflanzenart *Leucaena leucocephala*

Leucaena leucocephala ist eine vielseitig nutzbare Pflanzenart, welche den 700 Stickstoff fixierenden Pflanzenarten zugeordnet wird.

Abb. 52: Zeichnung von der Pflanze *Leucaena leucocephala*



Leucaena leucocephala

4.2.1 Geschichte

In der Geschichte hatte *Leucaena leucocephala* verschiedene botanische Namen, wie z.B. *L. glauca* und *L. latisiliqua*. Bei der Eroberung Zentralamerikas durch die Spanier war *L. leucocephala* eine in der Region weit verbreitete und von den Naturvölkern vielseitig genutzte Pflanzenart. Anfang des 17. Jahrhunderts wurden die Pflanzensamen auf den Galeeren zuerst auf die Philippinen gebracht und von dort aus in die ganze Welt verbreitet^[65].

4.2.2 Verwendung

Die Pflanze dient als Quelle für Feuerholz, Holzkohle, zur Papierherstellung und Produktion des Textilstoffes Rayon, der Kautschuk wird bei Klebern verwendet. In der Agrarwirtschaft wird diese Pflanzenart bevorzugt als Schattenspender auf Tabak- und Kakaopflanzungen eingesetzt^[65].

Eine Besonderheit der Pflanze *Leucaena leucocephala* ist ihre Nutzung als Futtermittel für Rinder und Schafe. *Leucaena* Blätter sind reich an Proteinen, Mineralien und Xanthophyll und werden so neuerdings auch in der Geflügelhaltung als Futtermittel verwendet.

4.2.3 Nährstoffgehalt von *Leucaena leucocephala*

Der Nährstoffgehalt von *Leucaena leucocephala* ist, wie schon erwähnt, wichtig für die Futtermittelindustrie. In dem Zeitraum von 1946-1992 gab es ca. 65 Veröffentlichungen^[66], die sich mit dem Nährstoffgehalt der Pflanze auseinandergesetzt haben. Die Erkenntnisse zeigten, daß *Leucaena* Blätter ca. 78% verwertbares Protein enthalten und bezüglich des dazugehörigen Aminosäuregehaltes mit den Sojabohnen vergleichbar sind.

Der beste Zeitpunkt für die Ernte der Blätter liegt ca. acht Wochen vor der Blüte der Pflanze^[66].

4.2.4 Verwendung als Futtermittel für Tiere

Die Verwendung von *Leucaena*-Blättern als Viehfutter führt zu beachtlichen Gewichtszunahmen bei Rindern und Schafen, die bis zu 30% erreichen können^[67].

Es ist jedoch darauf zu achten, daß verstärktes Füttern von *Leucaena* Material ab einer bestimmten Grenze zu negativen Effekten führen kann. Die Grenzen variieren bei den verschiedenen Nutztieren und können bei Überschreiten zum Gewichtsverlust bis hin zum Tod des Tieres führen.

4.2.5 Problem mit Pflanzenschädlingen

Die „springende Pflanzenlaus“ (Psyllid) stellt in heutiger Zeit einen gefährlichen Schädling für *L. leucocephala* dar^[68]. In den 80er und 90er Jahren verbreitete sich dieser Schädling rund um die Erde und führte zu großer Aufmerksamkeit bei den Farmern. In Ländern, in denen er keine natürlichen Feinde, wie z.B. den Käfer *Curinus coeruleus* vorfand, richtete er großen Schaden an. In diesen Ländern wird die Plage mit verschiedenen Mitteln bekämpft, wie z.B. Ansiedeln von natürlichen Feinden, Insektizide oder durch Züchtung resistenter *L. leucocephala* Pflanzen^[65].

4.2.6 Toxizität von Mimosin (40) und 3,4-Dihydroxypyridin (41)

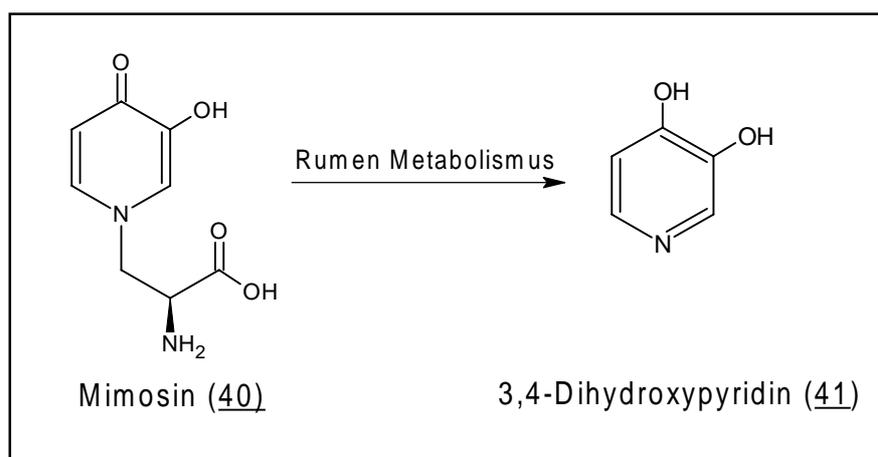
Leucaena leucocephala ist reich an Nährstoffen, bildet aber auch die toxische Aminosäure Mimosin (40), die man besonders in den Blättern und Samen der Pflanze findet. Der Mimosingehalt liegt in den getrockneten Blättern und Samen bei ca. 4%.

Die überhöhte Aufnahme von Mimosin (40) kann bei Tieren zu Wachstumshemmungen, Alopecia, Kropfbildung und zu einem niedrigen Tyrosinspiegel führen^[69].

Diese Faktoren sind der Grund für die eingeschränkte Verwendung von *Leucaena leucocephala* als Futtermittel.

Auffallend ist, daß Wiederkäuer weniger anfällig gegen *L. leucocephala*-Viehfutter sind als die anderen Tierarten. Der Grund dafür ist, daß Wiederkäuer einen besonderen Bakterienstamm *Synergistes jonesii* besitzen, der es ermöglicht, Mimosin (**40**) frühzeitig in das weniger toxische 3,4-Dihydroxypyridin (**41**) umzuwandeln bzw. sogar noch weiter abzubauen^[65].

Abb. 53: Abbau von Mimosin (40**) in Wiederkäuern**



Die meisten Wiederkäuer besitzen die Fähigkeit des in **Abb. 53** gezeigten Abbaus von Mimosin (**40**) zu 3,4-Dihydroxypyridin (**41**).

Es ist zu beachten, daß 3,4-Dihydroxypyridin (**41**) auch toxische Eigenschaften, die z.B. zur Kropfbildung führen können, besitzt. Erstaunlicherweise sind die Wiederkäuer in bestimmten Regionen (Mexiko, Indonesien, Hawaii) in der Lage, sogar das 3,4-Dihydroxypyridin (**41**) weiter zu ungiftigen Substanzen abzubauen^[70]. In anderen Gebieten, wie z.B. Australien und Afrika, sind die Wiederkäuer dagegen nicht fähig, das 3,4-Dihydroxypyridin (**41**) weiter abzubauen, und somit ist Toxizität heute noch ein Problem in diesen Ländern.

Dem Thema hat sich eine Organisation namens CSIRO (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation) in Australien zugewandt und dabei festgestellt, daß ein Fehlen der 3,4-Dihydroxypyridin (**41**) abbauenden Bakterien dafür verantwortlich ist. Dieses Problem kann durch Infektion der gefährdeten Tiere mit Dihydroxypyridin abbauenden Bakterien gelöst werden^[71].

Mit dieser Methode wurden in China und Afrika sehr gute Erfolge erzielt. Nach dem Transfer der Dihydroxypyridin abbauenden Bakterien konnte in den Messun-

gen von Urin und Blut keine nennenswerten Konzentrationen der toxischen Substanzen Mimosin (**40**) und 3,4-Dihydroxypyridin (**41**) festgestellt werden.

Ein Vorteil dieser Methode ist die einmalige Impfung einzelner Tiere, die die Bakterien innerhalb der Herde schnell weiter verbreiten. Es ist darauf zu achten, daß die Tiere ein reichhaltiges Nahrungsangebot an *L. leucocephala* bekommen, um die Bakterien in ihrer neuen Umgebung zu etablieren.

Beobachtungen an Hasen zeigten, daß diese große Mengen an *L. leucocephala* ohne Probleme zu sich nehmen können, während bei Schweinen und Geflügel das Quantum an *L. leucocephala* nicht über 10% der täglichen Nahrungsmittelzufuhr betragen sollte^[72].

4.3 Pharmakologische Eigenschaften

4.3.1 Mimosin (**40**) als Tyrosin Antagonist

Mimosin (**40**) agiert als Tyrosin Antagonist^[73], d.h. Mimosin (**40**) konkurriert mit Tyrosin um die Aktivität der Tyrosinase^[74]. Die Tyrosinase ist ein Enzym, das im Körper das Wachstum, z.B. von Haaren, reguliert und steuert.

Die durch die Tyrosin-Decarboxylase katalysierte Decarboxylierung von L-Tyrosin wird leicht gehemmt, wenn Mimosin (**40**) vorher mit dem Pyridoxal Phosphat Coenzym in Kontakt kommt^[75]. In Ratten konnte festgestellt werden, daß nachträglich zugeführtes Tyrosin die wachstumshemmenden Eigenschaften von Mimosin (**40**) wieder kompensiert.

Andere Berichte zeigten, daß das Zuführen von Tyrosin zu keinen positiven Ergebnissen bei der Prävention gegen die Effekte von Mimosin (**40**) führt. Spektroskopische Untersuchungen deuteten auf die Möglichkeit einer Komplexbildung zwischen Tyrosin und Mimosin (**40**) hin, obwohl sich der Tyrosin-Katabolismus in Ratten scheinbar durch Hinzufügen von Mimosin (**40**) zum Futter nicht verändert^[75]. Es wird daher angenommen, daß der Mechanismus von Mimosin (**40**) multifunktional ist.

4.3.2 Mimosin (**40**) als potentielles Antikrebsmittel

Für die Entwicklung von Antikrebsmitteln ist es wichtig, daß die untersuchten Substanzen die DNA- Synthese beeinflussen. Viele Substanzen sind bekannt, die entweder während der Verlängerung der DNA-Kette inhibieren oder das Initiieren des DNA-Replikations-Schrittes beeinflussen. Mimosin (**40**) hebt sich hervor, da es bei beiden Schritten wirken kann ^[76-78].

Bisher konnten folgende Erkenntnisse an speziellen Krebszellarten gewonnen werden:

1) Es wurde festgestellt, daß Mimosin (**40**) einen hemmenden Einfluß auf Lungenkrebszellen hat, indem es durch Aktivierung des p21WAF-1 Proteins indirekt das Krebszellenwachstum inhibiert^[79].

2.) Mimosin (**40**) kann durch Chelatbildung mit Eisen die Zellteilung der Brustkrebsart MDA-MB-453 blockieren ^[80].

4.3.3 Auswirkungen von Mimosin (**40**) auf HIV-1 Viren

In neueren Untersuchungen wurde herausgefunden, daß Mimosin (**40**) als ein Desoxyhyposylhydroxylase-Inhibitor (DOHH) wirken kann. DOHH katalysiert die Bildung von Hypusin, einer seltenen Aminosäure, die entscheidend zur Funktion des Wirtszellen eIF-5A-Faktors (eucaryotic initiation factor 5A) beiträgt. Dieser wird wiederum vom HIV-1-Protein Rev benötigt. Durch DOHH-Inhibition kann daher eine Ausdünnung des Faktors 5A stattfinden und es kommt zu einer Beeinträchtigung der Rev-Funktion. Die HIV-1 Multiplikationsrate wird reduziert ^[81].

4.4 Synthese von Mimosin (40)

Obwohl Mimosin (40) schon Ende des 19. Jahrhunderts detektiert worden war, wurde es erst in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts möglich, die Substanz zu reinigen und zu charakterisieren^[63]. Adams and Johnson^[82] gelang es 1949 zum ersten Mal, Mimosin (40) synthetisch herzustellen.

Die chemische Synthese von Mimosin (40) wurde später ebenfalls von I.D. Spenser und A.D. Notation 1962^[83] durchgeführt, doch beide Synthesen sind sehr umfangreich und ergeben nur eine geringe Ausbeute an Mimosin (40).

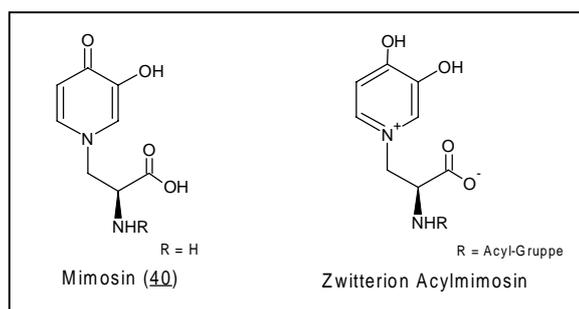
4.4.1 Verwendung von Mimosin (40) in der Peptidchemie

Aufgrund der biologischen Aktivität von Mimosin (40), wie z. B. Antitumor Effekte oder die Inhibierung von Tyrosinase, Dopamin β -Hydroxylase oder anderen Kupfer enthaltenen Enzymen, kam man zu der Überlegung, Mimosin (40) in Peptide einzufügen.

Da eine gewisse Übereinstimmung zu den Aminosäuren Tyrosin und Dopamin gegeben ist, versuchte man als erstes, diese durch Mimosin (40) zu ersetzen.

Es wurden schon einige Voruntersuchungen 1978 von Stewart^[84] durchgeführt, jedoch ohne Erfolg. Der Grund dafür liegt in der geringen Löslichkeit von Mimosin (40) in allen Lösungsmitteln. Desweiteren waren die Ausbeuten sehr gering und beim Schützen der Aminogruppe kam es zur Bildung der Zwitterionenform (3), welche nicht mehr die biologische Aktivität von Mimosin (40) aufweist. In einer Synthese aus dem Jahr 1996 von G. Roblot et al.^[85] ist es gelungen, diese Probleme zu umgehen und es konnte das erste Mimosin (40) enthaltende Peptid hergestellt werden.

Abb. 54: Umwandlung von Mimosin (40) in die Zwitterionenform



4.5 Isolierung und Charakterisierung von Mimosin (40) und Dihydroxypyridin (41) aus *L. leucocephala*

4.5.1 Bekannte Methoden

Eine einfache Isolierungsmethode von Mimosin (40) aus *L. leucocephala* Samen wurde 1944 von R. Yoshida^[86] beschrieben. Diese Methode ergab aber nur eine geringe Ausbeute von Mimosin (40) und das Produkt war oftmals noch mit schwer abzutrennenden Polysacchariden verunreinigt.

Eine Methode von I.D. Spenser und A.D. Notation^[83] verwendete einfache Dialyse-Techniken, um reines Mimosin (40) zu erhalten, aber die Ausbeuten waren immer noch sehr niedrig.

Eine beschriebene Isolierungsmethode von Günther^[69] aus dem Jahr 1987 basiert auf der Methode von R. Yoshida^[86]. Der Unterschied liegt in der Verwendung von destilliertem Wasser anstatt der von Yoshida verwendeten 0.1N HCL-Lösung.

4.5.2 Isolierung von Mimosin (40)

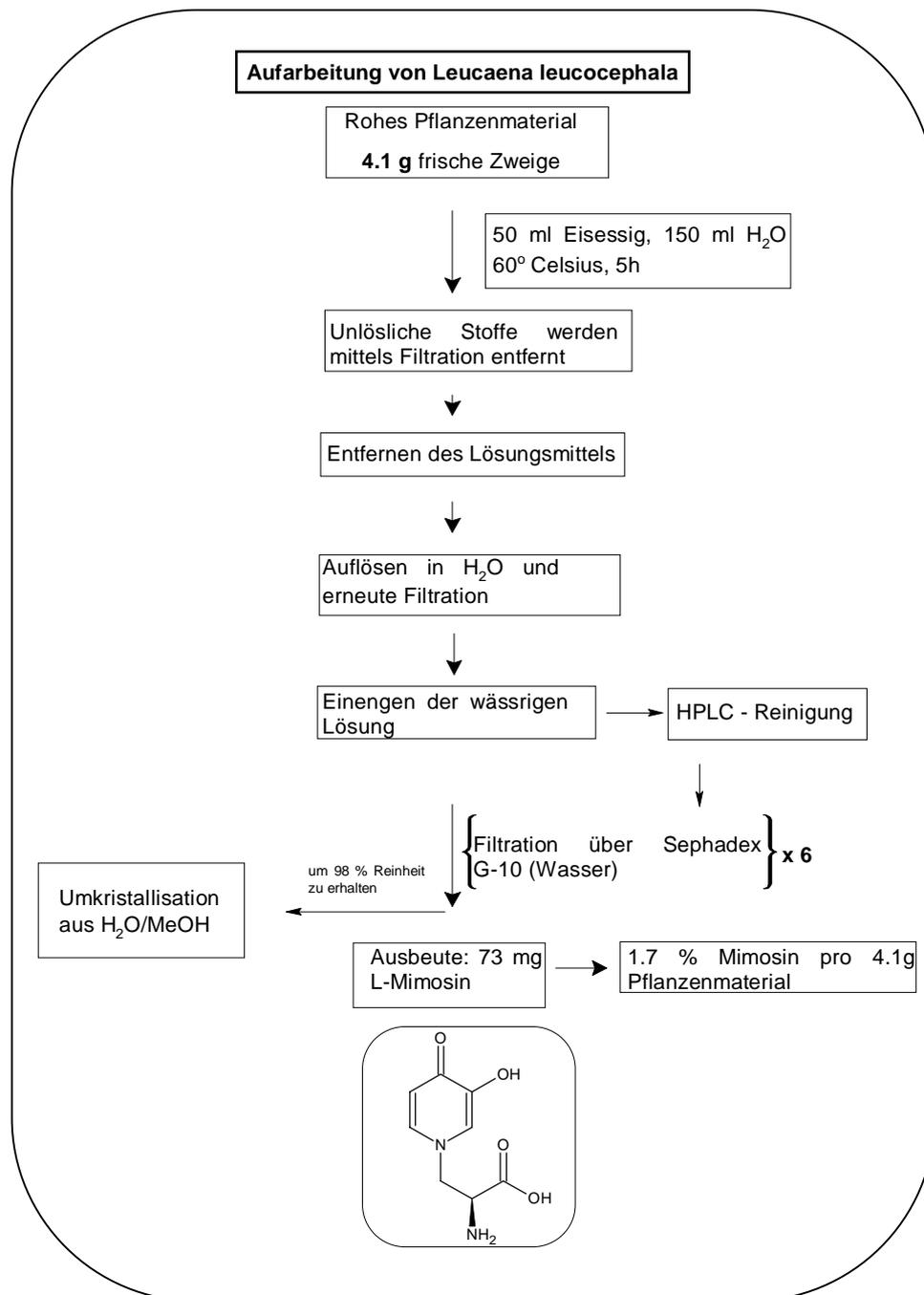
Die Methode, die wir in unserem Labor verwenden, ist vergleichbar mit den Methoden von Günther und R. Yoshida. Für die Extraktion von Mimosin (40) aus der Pflanze wird eine Mischung aus Essigsäure und Wasser eingesetzt.

Man verwendet Essigsäure, da sie sich leichter entfernen lässt als Salzsäure, aber trotzdem das Mimosin (40) schneller aus den Pflanzenzellen herauslöst und in die flüssige Extraktionsphase transportiert.

Für Ausbeutenanalysen wurde auf die Methode der Kristallisation verzichtet, da es zu signifikanten Verlusten von Mimosin (40) kommen kann. Für die Aufreinigung des Rohextrakts wurde eine G-10 Sephadexsäule (bidest. Wasser) verwendet, da hierbei keine großen Verluste von Mimosin (40) zu erwarten sind. Die Methode ist aber sehr zeitaufwendig, da man das saubere Produkt erst nach ungefähr zehnmaligen Wiederholen des Reinigungsschritts (Säulenchromatographie) erhält.

Um den Aufreinigungsprozess zu beschleunigen, wurde das Rohprodukt mittels einer RP-18 Säule auf der HPLC^[87] vorgetrennt und anschliessend kristallisiert. Für die Bestimmung von Ausbeuten ist diese Methode aber ungeeignet.

Abb. 55: Schema zur Isolierung von Mimosin (40)



4.6 Spektroskopische Daten

4.6.1 Mimosin (40)

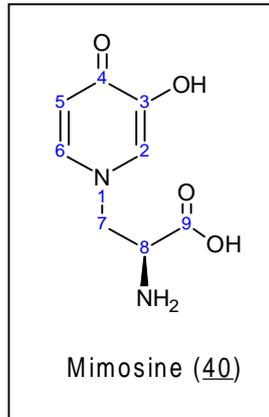
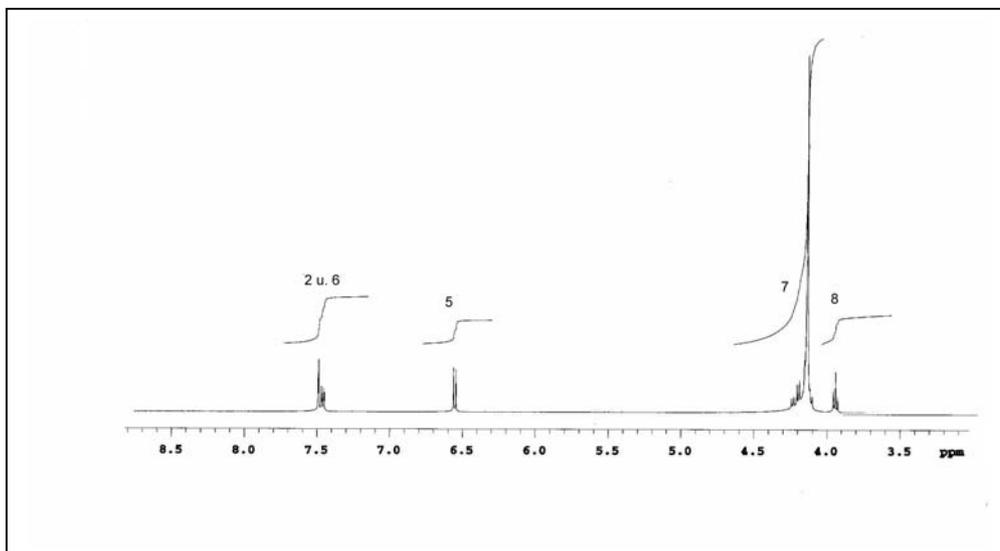


Tabelle 9: NMR-Daten von Mimosin (40)

Atom-Nr.	δ_{H}	Multiplizität	δ_{C}
2	7.45	s, 1H	130.4
3			146.1
4			160.5
5	6.50	d, 1H, J = 7.0	113.0
6	7.43	d, 1H, J = 7.0	139.1
7	4.15	dd, J = 5.2, J = 15.1, 2H	56.3
8	3.99	t, J = 5.2, 1H	51.8
9			167.1

Abb. 56: ^1H -NMR-Daten vom Mimosin (40)



4.6.2 3,4-Dihydroxypyridin (**41**)

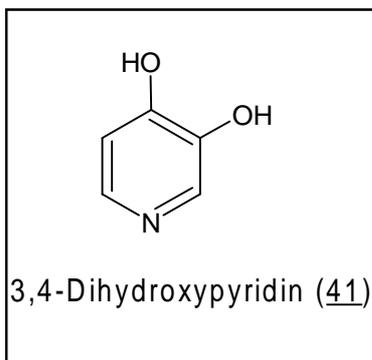


Tabelle 10: NMR-Daten von 3,4-Dihydroxypyridin (**41**)

Atom-Nr.	δ_H	Multiplizität	δ_C
2	7.92	s, 1H	124.0
3			146.1
4			168.2
5	7.10	d, 1H, J = 7.0	113.8
6	7.90	d, 1H, J = 7.0	135.4

Die Aufklärung der Struktur von 3,4-Dihydroxypyridin (**41**) fand durch Vergleich mit den NMR-Daten von Mimosin (**40**) statt. Die Anordnung der Protonen im Ring konnte durch das Kopplungsmuster und die spezifischen Verschiebungen zugeordnet werden. Durch den Verlust der Seitenkette kommt es zu einer Tieffeldverschiebung der Signale, die bedingt ist durch die Aromatisierung des Ringes.

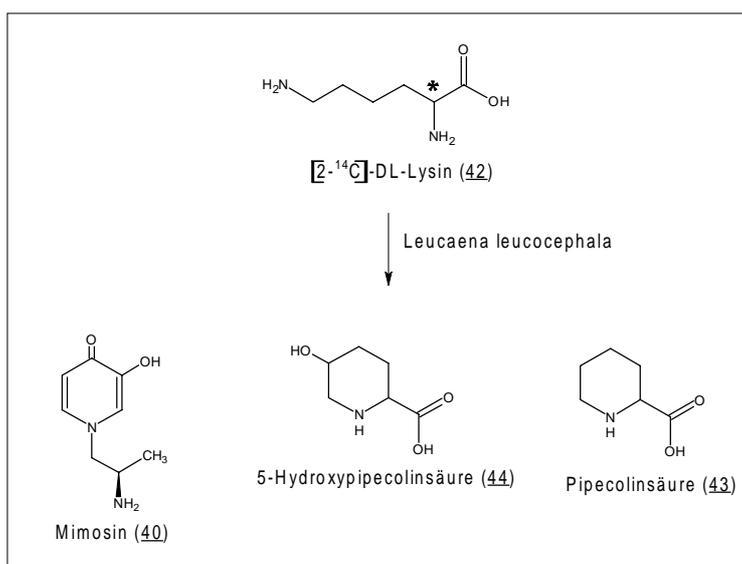
4.7 Stand der bisherigen Forschungen zur Biosynthese von Mimosin (40)

4.7.1 Studien mit [2-¹⁴C]-DL-Lysin-monochlorid (42)

J.W. Hylin et al. zeigte, daß bei einer Aufnahme von [2-¹⁴C]-DL-Lysin-monochlorid (42) in *Leucaena leucocephala* (ehemals *Leucaena glauca benth*) die Inkorporationen in Mimosin (40), Pipecolinsäure (43) und 5-Hydroxypipicolinsäure (44) erfolgten^[88] (siehe Abb. 57).

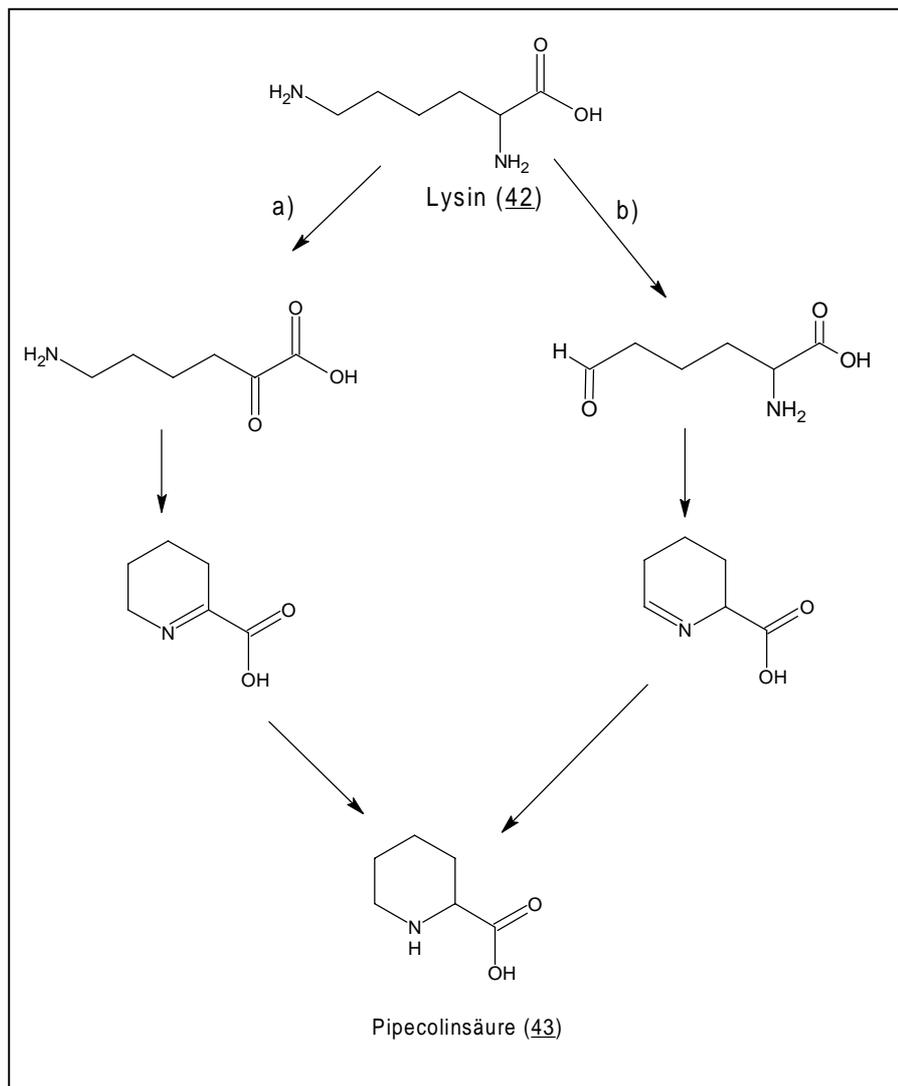
Die hohe Einbaurate von markiertem Lysin (42) ließ die Vermutung aufkommen, daß es sich bei Lysin (42) um eine wichtige Vorläufersubstanz für die drei Heterocyklen handelt. Die Einbauraten in 5-Hydroxypipicolinsäure (44) zeigten, daß Lysin (42) nicht nur ein Vorläufer von Mimosin (40) ist, sondern auch von 5-Hydroxypipicolinsäure (44) und Pipecolinsäure (43). Nach einer Methode von R. Adams et al.^[89] konnte durch Pyrolyse nachgewiesen werden, daß die Markierungen vornehmlich in dem Pyridonring vorkommen, da das isolierte 3,4-Dihydroxypyridin (41) 95% der Aktivität von dem vorher gemessenen Mimosin (40) enthielt.

Abb. 57: Radioaktiv markierte Produkte nach Fütterung mit [2-¹⁴C]-Lysin (42)



In Anbetracht der Tatsache, daß die drei genannten Heterocyklen in *L. leucocephala* vorkommen und der Biosyntheseweg von Pipecolinsäure (**43**) schon aufgeklärt worden war, stellte das Lysin (**42**) die vielversprechendste Substanz für Fütterungsexperimente dar (**siehe Abb. 58**)

Abb. 58: Biosyntheseweg von Pipecolinsäure (43)



Die in **Abbildung 57** gezeigten Umwandlungen von L-Lysin (**42**) in Pipecolinsäure (**43**) sind offensichtlich:

a) ist ein Weg über ϵ -Amino- α -ketocaprinsäure und Δ -Piperidein-2-carbonsäure, der den Verlust der α -Aminogruppe von Lysin (**42**) beinhaltet und zu dem Einbau des an ϵ -Position sitzenden Stickstoffs in den Ring führt.

b) ist ein Weg über die Substanzen α -Aminoadipinsäure- δ -semialdehyd und Δ^1 -Piperidein-6-Carbonsäure, der den Verlust der ϵ -Aminogruppe und zu dem Einbau des an α -Position sitzenden Stickstoffs in den Pipecolinring (**43**) führt.

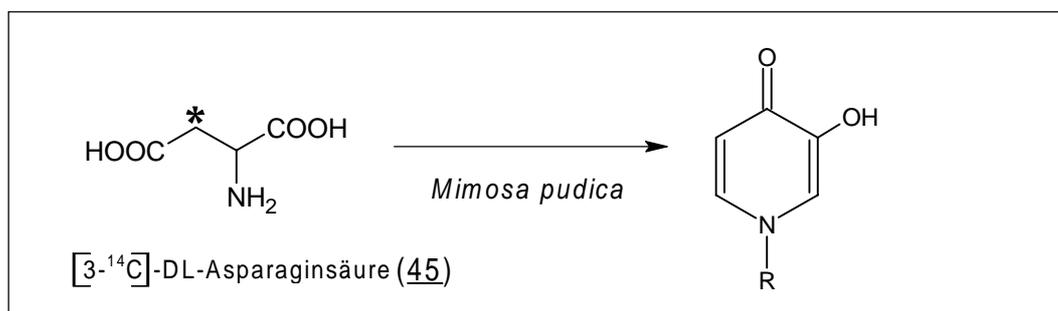
In einer Veröffentlichung von Seelig et al.^[90] wird vermutet, daß in Bakterien und Pflanzen Pipecolinsäure (**43**) nach dem Weg b) gebildet wird.

An *Leucaena leucocephala* wurden solche Untersuchungen bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht durchgeführt.

Allerdings gibt es eine Untersuchung an dem Marcfortine A produzierenden Bakterienstamm *Penicillium roqueforti*, bei der durch Fütterungsversuche mit ¹⁵N-markiertem Lysin (**42**) bewiesen werden konnte, daß die Picolat-Einheit nach dem Weg a) gebildet wird^[91].

4.7.2 Fütterungsversuche mit [3-¹⁴C]-Asparaginsäure (**45**)

Radioaktives Mimosin (**40**) konnte von I.D. Spenser et al.^[92, 93] von der Pflanzenart *Mimosa pudica* isoliert werden. Dabei wurde aber nicht markiertes Lysin (**42**) zugefüttert, sondern [3-¹⁴C]-Asparaginsäure (**45**). Durch Abbaureaktionen konnte bewiesen werden, dass sich die Markierung im Ring befindet.

Abb. 59: Einbau von markierter Asparaginsäure (45) in den Pyridonring

Bei Fütterungsexperimenten mit [1-¹⁴C]-Asparaginsäure und mit [4-¹⁴C]-Asparaginsäure an *Mimosa pudica* konnte kein einheitlicher Einbau im Pyridonring gefunden werden. Beide Carboxylgruppen wurden also im Verlauf des Biosynthesewegs abgespalten.

Daß Mimosin (40) trotzdem eine Aktivität aufweist, liegt vermutlich an dem Einbau von radioaktiv markiertem Kohlendioxid, welches aus der Carbonsäure von Asparaginsäure (45) entstanden war.

Da sich die Biosynthesen von *L. leucocephala* und *Mimosa pudica* wahrscheinlich nicht unterscheiden, und Lysin (42) der direkte Vorläufer von Mimosin (40) ist, folgte die Annahme, daß Asparaginsäure eine Vorläufersubstanz von Lysin (42) während der Biosynthese darstellen mußte. Die Inkorporation findet unter Abspaltung der C-4 Carbonsäure von Asparaginsäure (45) statt.

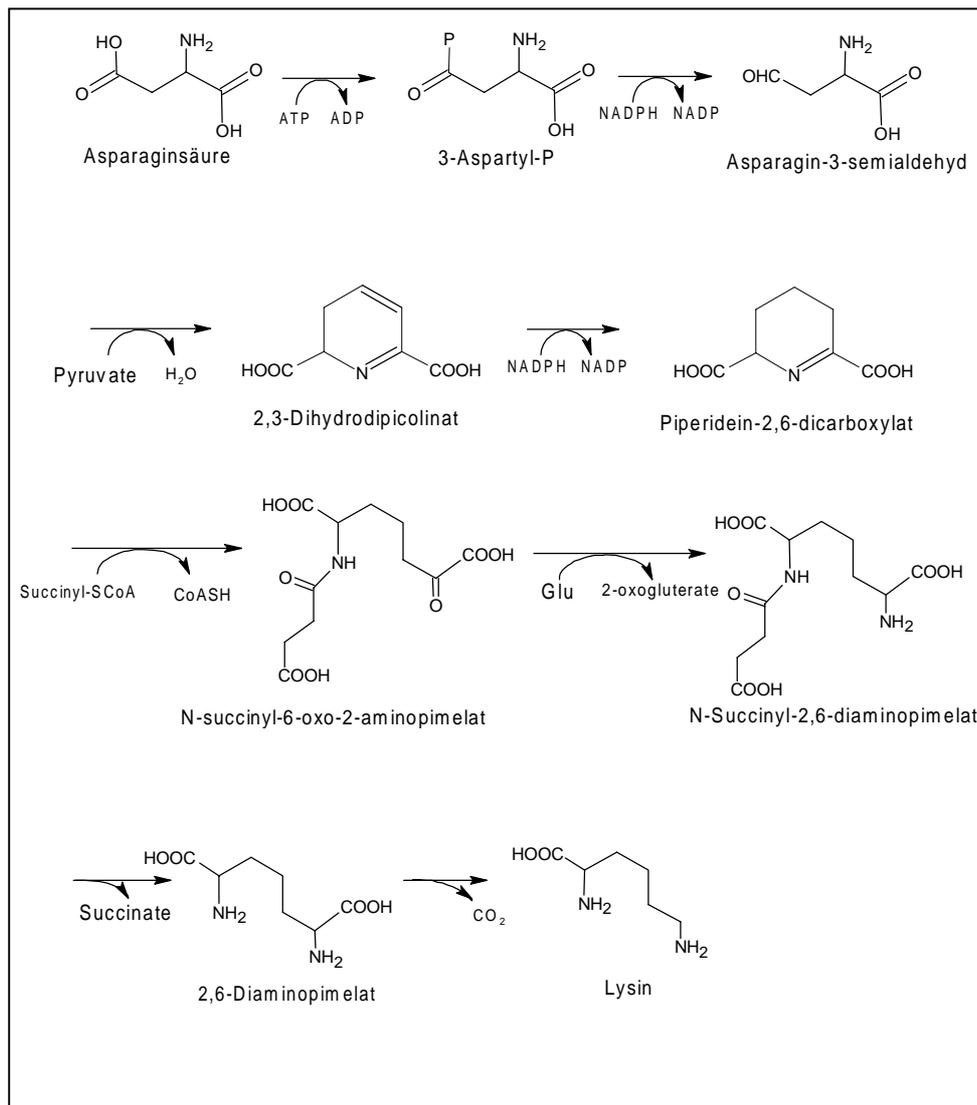
4.7.3 Bekannte Biosynthesen von Lysin (42)

Zwei Wege sind für die Biosynthese von Lysin (42) bekannt:

- der Diamino-pimelinsäure Weg von Pflanzen und Bakterien, bei dem die gesamte Kohlenstoffkette von Asparaginsäure (45) in Lysin (42) eingefügt wird.
- der α -Amino adipinsäure-Weg in Pilzen, bei dem nur die Positionen C-2 und C-3 von Asparaginsäure (45) in Lysin (42) inkorporiert werden, während die anderen Kohlenstoffatome aus dem α -Ketoglutarat kommen.

Die oben erwähnten Fütterungen von verschiedenen markierten Asparaginsäuren deuten für *Mimosa pudica* auf den α -Aminoadipinsäure Biosyntheseweg hin, wobei interessant ist, daß für andere Pflanzenspezien eher der Diaminopimelinsäureweg favorisiert wird.

Abb. 60: Biosyntheseweg von Lysin (42) in Pflanzen und Bakterien

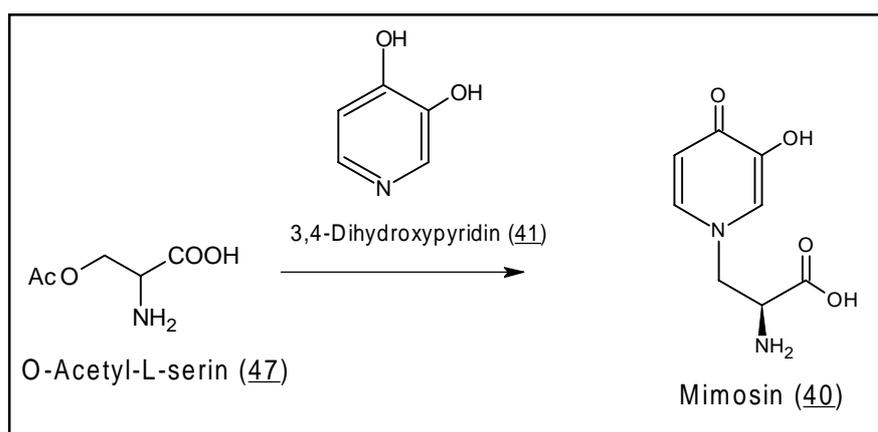


4.7.4 Cystein Synthase katalysierte Mimosinbildung

Die Herkunft der Seitenkette von Mimosin (**40**) wurde ebenfalls von I.D. Spenser et al.^[92] an der Pflanze *Mimosa pudica* untersucht. Für die Fütterungsexperimente verwendete I.D. Spenser [1-¹⁴C]-Serin (**46**) und konnte damit beweisen, daß die Seitenkette aus Serin (**46**) aufgebaut wird.

Durch die schnelle Aufnahme und die hohen Inkorporationsraten von Serin (**46**) hat die Arbeitsgruppe von I. Murakoshi et al.^[94] dieses Phänomen unter enzymatischen Gesichtspunkten untersucht und dabei herausgefunden, daß O-Acetyl-L-serin (**47**) das aktive Substrat bei der Bildung von Mimosin (**40**) darstellt (siehe **Abb. 61**).

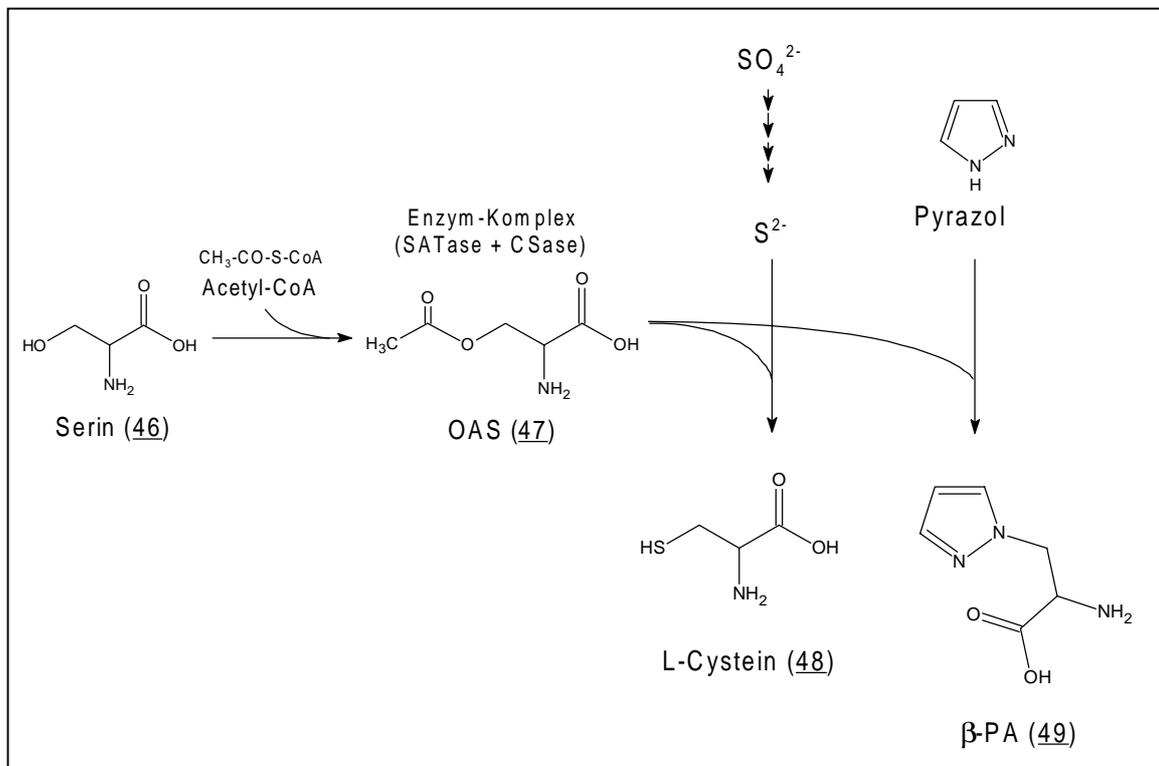
Abb. 61: Reaktion von O-Acetyl-L-serin (47)



Bei dem Enzym handelt es sich um ein Multienzym, bestehend aus Serin-Acyltransferase und Cystein-Synthase, mit einer besonderen Substratspezifität für heterocyclische Substanzen. Dieses System ist ebenfalls für die Biosynthese von L-Cystein (**48**) in Pflanzen zuständig^[95].

Die Serin-Acyltransferase katalysiert die Bildung von O-Acetyl-L-serin (**47**) und Acetyl-CoA, die durch die Cystein-Synthase katalysierte Reaktion von H₂S, 3,4-Dihydroxypyridin(**41**) oder Pyrazol mit O-Acetyl-L-serin (**48**) führt dann zu den Produkten Cystein (**48**), Mimosin (**40**) oder β -(Pyrazol-1-yl)-L-alanin (β -PA) (**49**) (siehe **Abb. 62**).

Abb. 62: Schema für Serin-Acyltransferase

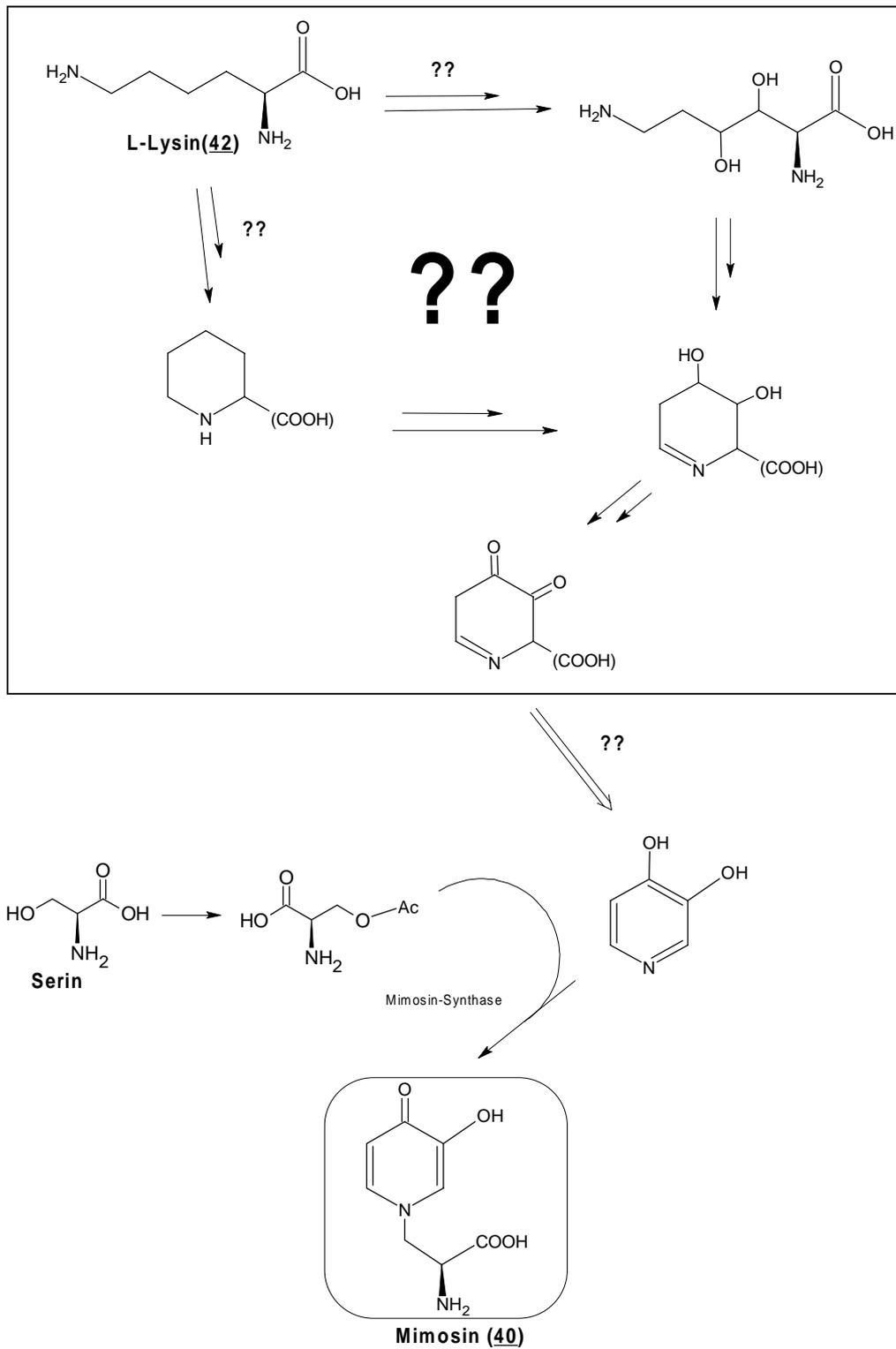


4.8 Zusammenfassung der Literaturdaten

Mimosin (40) setzt sich zusammen aus L-Serin (46), welches durch einen Enzymkomplex als O-Acetylserin (47) mit dem Stickstoffheterocyclus gekoppelt wird. Dies konnte in verschiedenen Veröffentlichungen aus den letzten Jahren gezeigt werden^[92, 94-97].

Das 3,4-Dihydroxypyridin (41) entsteht nach J.W. Hylin^[88] und I.D. Spenser^[98] aus L-Lysin (42). Es ist aber nicht bekannt, wie der Biosyntheseweg verläuft, d.h. in welcher Art und Weise die Sauerstoffatome in Lysin (42) eingefügt werden und die Bildung des Ringschlusses stattfindet. (Siehe Abb. 63)

Abb. 63: Zusammenfassung der bisherigen Erkenntnisse:

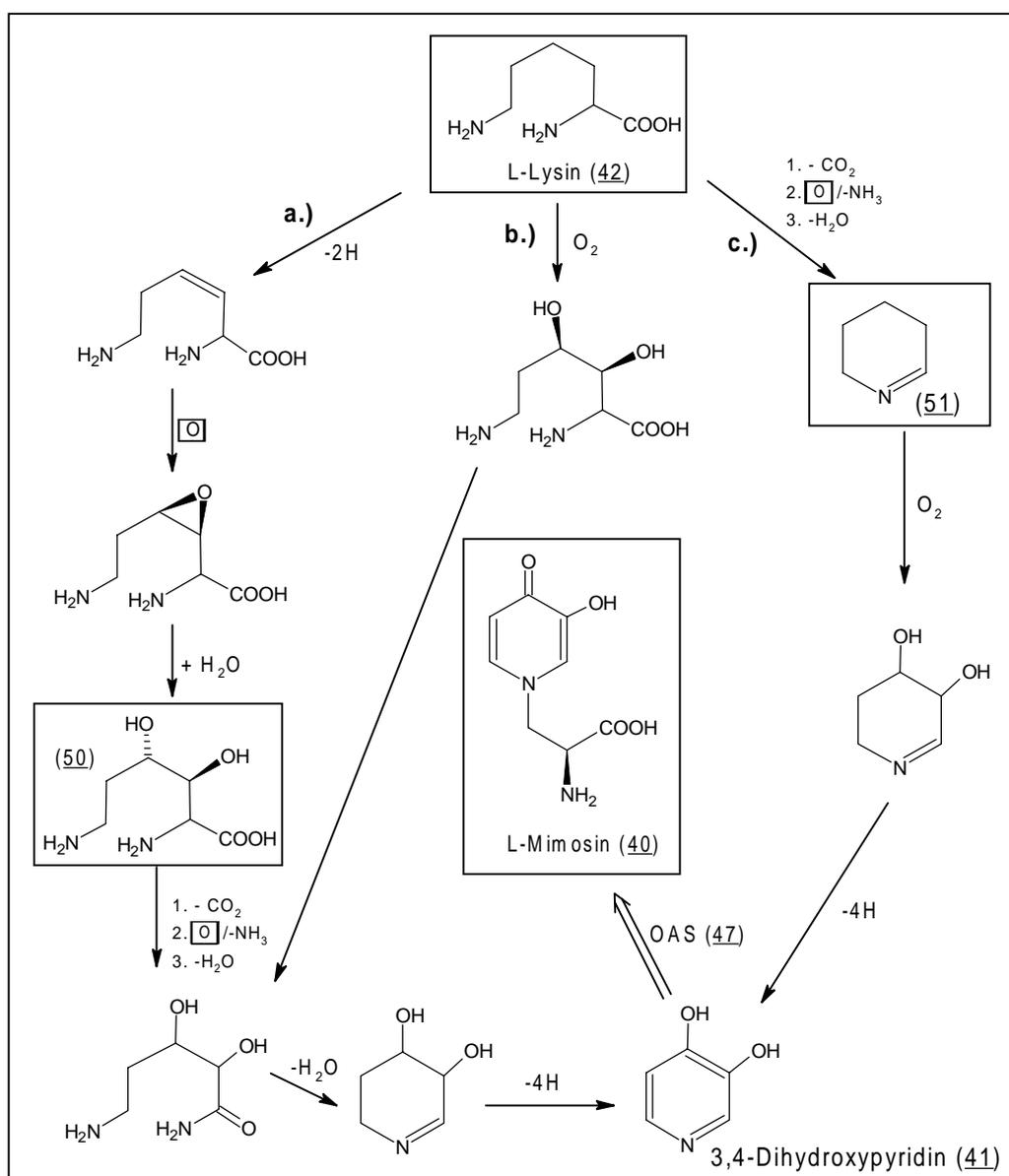


4.9 Neue biosynthetische Studien

4.9.1 Biosynthetische Studien mit markiertem Lysin (42)

Um weitere Erkenntnisse über den Biosyntheseweg von 3,4-Dihydroxypyridin (41) und L-Mimosin (40) (siehe Abb. 64) zu bekommen und somit mehr über den Aufbau des Pyridonrings zu erfahren, sollen weitere Untersuchungen mit markierten Substanzen stattfinden.

Abb.64: Biosynthetische Überlegungen



Wie man in dem Schema erkennt, lassen sich für die Vorläufersubstanz Lysin (**42**) verschiedene Biosynthesewege postulieren.

Im Weg a.) würde Lysin (**42**) durch eine Monooxygenase in ein Epoxid umgewandelt werden und anschließend in das 3,4-Dihydroxylysin (**50**) mittels Wasseranlagerung umgewandelt werden.

Das Dihydroxylysin (**50**) müßte dann unter Decarboxylierung und Abspalten der Aminogruppe in das Dihydroxypiperidein übergehen welches sich in das aromatische 3,4-Dihydroxypyridin (**41**) umwandelt.

Der Weg b.) unterscheidet sich lediglich in der Bildung von Dihydroxylysin (**50**) durch die Anwesenheit einer Dioxygenase von Weg a).

Nach Weg c.) wird postuliert, dass der Ringschluß bereits vor Einführung der Sauerstoffatome stattfindet.

Um die postulierten Biosynthesewege zu überprüfen, können zwei Vorläufer für deren Überprüfung ausgewählt werden. Zum einen wäre es das 3,4-Dihydroxylysin (**50**) von Weg a.) und b.) und zum anderen das in Weg c.) beschriebene Δ^1 -Piperidein (**51**).

Für diese Versuche muß aber erst ein System entwickelt werden, was erlaubt, die markierten Substanzen in den Biosyntheseweg einzuschleusen.

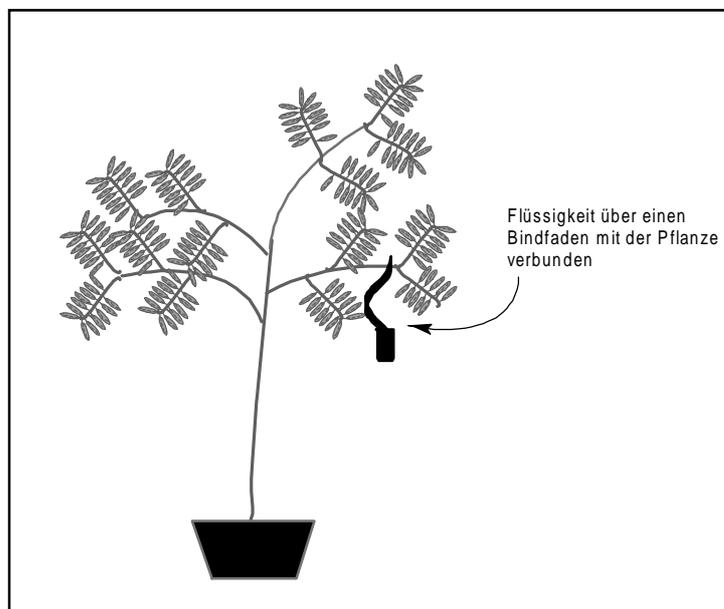
4.10 Wie überführt man die markierten Substanzen in die Pflanze?

In der Literatur sind zwei Möglichkeiten beschrieben worden, wie man Fütterungsexperimente an *Leucaena leucocephala* durchführen kann. Beide Experimente wurden für Fütterungen mit radioaktiv markierten Substanzen beschrieben und direkt an der Pflanze durchgeführt.

4.10.1 I.D. Spenser`s Methode

Die radioaktiven Substanzen wurden in destilliertem Wasser aufgelöst und dann mittels eines Bindfadens oder Baumwollstreifens mit dem Zweig der Pflanze in Kontakt gebracht^[93] (siehe **Abb. 65**). Die eingesetzten Mengen der markierten Substanzen lagen für ein zwei Tage andauerndes Experiment bei 2 mg.

Abb. 65: Fütterungsversuch nach I.D. Spenser



Für Fütterungen mit größeren Substanzmengen ist diese Methode nicht geeignet, da ein großer Anteil der zu fütternden Substanz in dem Bindfaden gebunden und nicht mehr weiter zur Pflanze transportiert wurde.

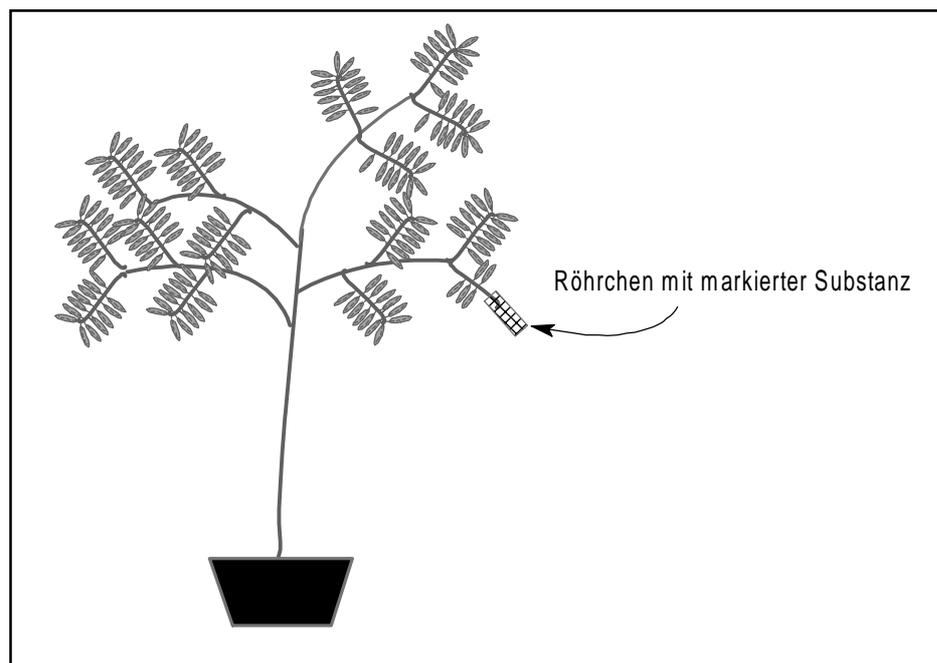
Ein Nachteil bei Fütterungen an Pflanzen ist, daß sich die markierten Substanzen in der gesamten Pflanze verteilen können und danach schwer zu detektieren sind.

4.10.2 J.W. Hylin's Methode

In dieser Methode erfolgt die Aufnahme an jungen Pflanzentrieben. Die eingesetzte Menge der markierten Substanz liegt bei 0.5 mg für ein drei Tage andauerndes Experiment.

Die Blättchen eines jungen Triebes werden entfernt und der Stiel wird sofort in die Fütterungslösung, die sich in einem Röhrchen befindet, eingetaucht (**siehe Abb. 66**).

Abb. 66: Fütterungsversuch nach J.W. Hylin^[88]



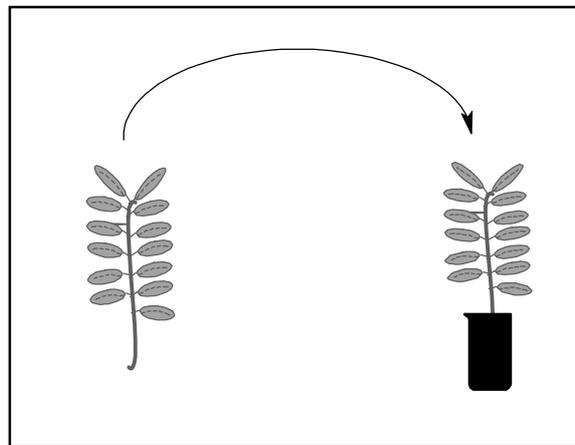
Diese Methode kann nur bei Fütterungen mit geringen Substanzmengen bzw. wenig Lösungsmittelvolumen durchgeführt werden, da die Aufnahme der Flüssigkeit gegen den Flüssigkeitsstrom und die Kapillarkräfte der Pflanze geht.

Da die Fütterungen ebenfalls an der gesamten intakten Pflanze durchgeführt werden, ist ein unkontrollierbares Verteilen der zu fütternden Substanzen möglich.

4.10.3 Fütterung an einem abgeschnittenen Zweig

Ein frisch von der Pflanze abgeschnittener Zweig wird sofort in einem Gläschen mit der markierten Lösung in Kontakt gebracht. Die Konzentrationen von markierten Substanzen können von 1-100 mg/Zweig variieren. Die Dauer der Fütterung liegt im Durchschnitt bei 2-3 Tagen.

Abb. 67: Schema für Fütterung an einem abgeschnittenen Blatt



Die Vorteile dieser Methode sind das ermöglichte Füttern größerer Substanzmengen und die bessere Kontrolle über das Verbleiben der Stoffe in der Pflanze.

Der Nachteil ist, daß durch das Abschneiden der Zweige möglicherweise Biosynthesewege der Pflanze beeinflusst werden.

4.11 Fütterungsexperimente

4.11.1 Vorversuche

In einer ersten Studie wurden die Auswirkung von verschiedenen pH-Werten an abgeschnittenen Zweigen nach phänomenologischen Gesichtspunkten (Frische, Überlebensdauer, Austrocknung) untersucht.

Als bester pH-Wert stellte sich der Bereich zwischen pH=6-7 heraus. Hier waren die Pflanzen nach drei Tagen noch grün und es konnte die größte Flüssigkeitsaufnahme beobachtet werden. Im basischen Bereich pH=8-9 war ein Großteil der Pflanzen schon nach einem Tag vertrocknet, während im schwach sauren Bereich pH=4-5 nach 2 Tagen die Pflanzen zwar in relativ gutem Zustand waren, es aber nur zu einer geringen Flüssigkeitsaufnahme kam.

Nachdem nun das pH-Optimum gefunden war, fing man an, Fütterungsexperimente mit verschiedenen Konzentrationen von unmarkiertem Lysin (42) durchzuführen.

Es wurde ein Konzentrationsbereich von 5-50 mg pro Zweig bei einem pH=6.5 für die Versuche ausgewählt. Der pH-Bereich wurde mit Natriumhydroxid-Lösung eingestellt.

Als Resultat erhielt man eine Konzentration von 10 mg L-Lysin (42) pro Zweig. Es war die höchste Konzentration, bei der die Zweige nach drei Tagen noch intakt aussahen, d.h. keine hängenden Blätter hatten. Bei höheren Konzentrationen waren zwar die Blätter noch grün, aber sehr welk und teilweise trocken.

Da man sich bis jetzt nur nach den rein äußerlichen Kriterien orientiert hatte und nicht nach der Mimosin-Konzentration, wurden nun die Konzentrationen von Mimosin (40) einer Pflanze ohne Fütterung und mit Fütterung verglichen.

Die erhaltenen Ergebnisse unterschieden sich nur geringfügig, d.h. es kam zu keiner Beeinflussung der Mimosinproduktion.

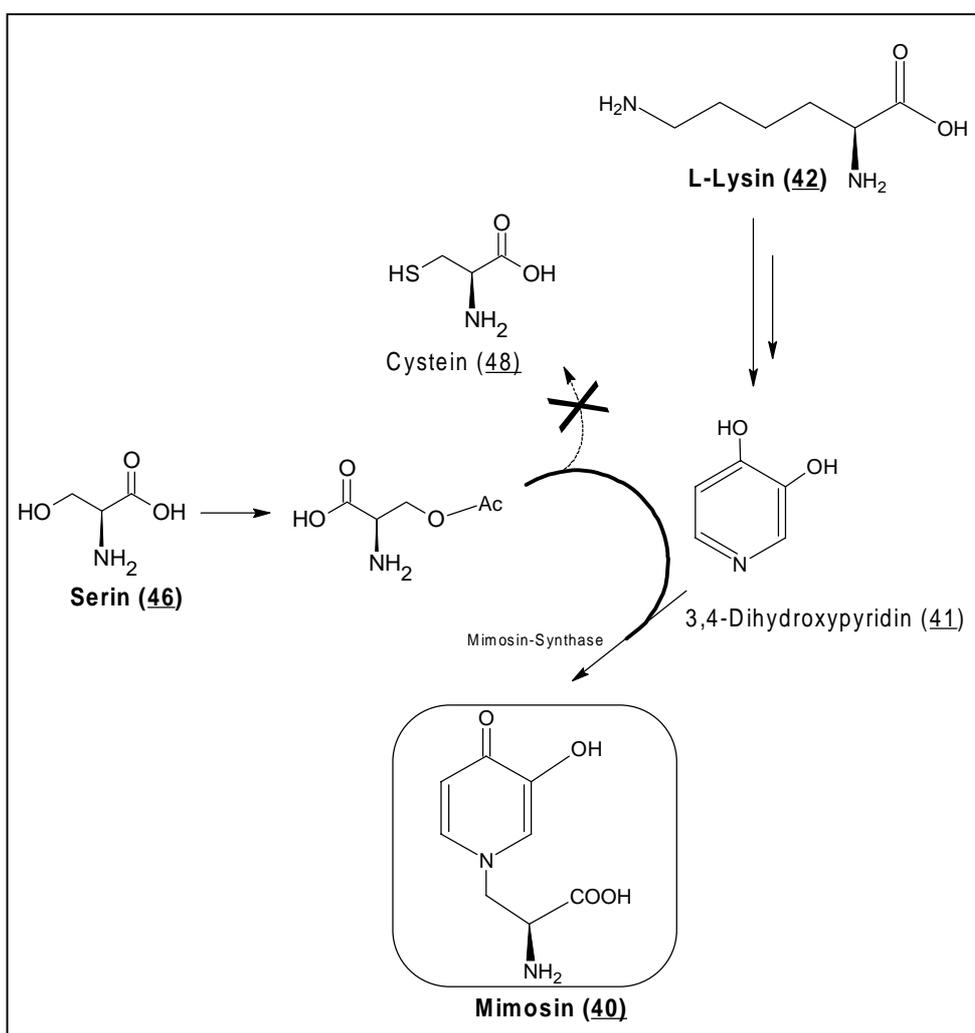
Zusammenfassend konnte man bis zu diesem Zeitpunkt sagen, daß eine Lysin-fütterung von 10 mg pro Blatt bei einem pH=6.5 am geeignetsten erschien.

Bei der Fütterung mit 10 mg [2-¹³C]-DL-Lysin (**42**) zeigte sich jedoch keine Anreicherung in den NMR-Spektren. Auch in einem zweiten Versuch mit 20 mg konnte keine Signalerhöhung im ¹³C-NMR-Spektrum detektiert werden.

4.11.2 Versuche zur Steigerung der Mimosinproduktion

Nachdem die ersten Fütterungsexperimente fehlgeschlagen waren, versuchte man, durch Zufüttern von Cystein (**48**) die Mimosinproduktion zu steigern. Der Gedanke hierbei war, durch eine Überschwemmung des Systems mit Cystein (**48**) die O-Acetyl-serin-Konzentration im System zu erhöhen, somit eine Nachfrage nach dem Pyridonring zu schaffen und als Schlußfolgerung die Umwandlung von Lysin (**42**) zum Heterocyclus zu fördern.

Abb. 68: Beeinflussung der Mimosinproduktion



In den Experimenten wurde der pH-Wert weiterhin bei pH=6.5 gehalten. Die Versuche wurden mit jeweils zwei Zweigen durchgeführt.

Tab.1 : Fütterung an zwei Blättern

mg Lysin	mg Cystein	Ausbeute
5 mg/mL	5 mg/mL	24 mg
5 mg/mL		18 mg
	5 mg/mL	18 mg

Anhand der Ergebnisse erkennt man, daß es zu einer Steigerung der Ausbeute an Mimosin (**40**) von bis zu 30% kommen kann. Um das Ergebnis abzusichern und eventuelle Fehler z.B. Wägefehler minimal zu halten, wurde der Versuch ein weiteres Mal mit einer größeren Anzahl von Blättern wiederholt. In diesem Versuch wurden sieben Blätter verwendet.

Tab. 2: Fütterung an sieben Blättern

mg Lysin	mg Cystein	Ausbeute
5 mg/ml	5 mg/ml	110 mg
5 mg/ml		84 mg

Das Ergebnis konnte bestätigt werden und das Protokoll wurde für Fütterungsversuche mit [2-¹³C]-DL-Lysin * 2 HCl (**42**) verwendet.

Es konnte aber ebenfalls kein Einbau des markierten Lysins (**42**) im Mimosin (**40**) gefunden werden.

Folgende Erklärungsmöglichkeiten kommen für diese Ergebnisse in Betracht.

- a.) Durch niedrige Einbauraten ist es nicht möglich, die Markierungen im NMR-Spektrum zu detektieren.
- b.) Der Prozeß von Aufbau und Abbau von Mimosin (**40**) verläuft schnell und die mittlere Anreicherung ist zu gering.

Beide Möglichkeiten zeigen, daß Fütterungsversuche mit größeren Mengen von markiertem Lysin (42) durchgeführt werden sollten.

4.11.3 Radioaktive Fütterungsversuche mit ^{14}C -L-Lysin (42)

Zur Bestimmung der Einbauraten wurde radioaktives Lysin (42) verwendet, da es auch bei geringen Konzentrationen nachweisbar und gegenüber ^{13}C -markierten Lysin (42) erheblich günstiger ist.

Um eine gewisse Routine zu bekommen bzw. um zu überprüfen, ob überhaupt ein Einbau stattfand, wurde der Versuch mit den Konzentrationsangaben von J.W. Hylin^[88] unter Verwendung unserer Fütterungsmethode wiederholt.

4.11.4 Versuchsbedingungen

Folgende Versuchsbedingungen wurden dabei verwendet:

10 μl radioaktives Lysin (42) mit einer Aktivität von $2.45 \cdot 10^6$ dpm, dies entspricht 1.10 μCi .

Die 10 μl wurden in 2 mL Wasser aufgelöst, und zu jeweils 0.33 mL an sechs Blätter verteilt. Innerhalb von vier Stunden wurde die Flüssigkeit komplett von den Blättern aufgenommen. Es wurde dann jeweils 0.5 mL Wasser zugegeben und die Pflanzen wurden für zwei Tage aufbewahrt.

Die Aufarbeitung des radioaktiven Mimosins (40) wurde folgendermaßen durchgeführt:

- a.) Die Pflanzen wurden in einer verschließbaren Pyrexflasche mit 200 mL Wasser und 100 mL konz. Essigsäure für 3-5 Stunden bei 50 Grad Celsius erhitzt.
- b.) Trennung des Pflanzenmaterials und der Lösung mittels Filtration durch Papierfilter.

-
- c.) Entfernen der wässrigen Lösung am Rotationsverdampfer. Dabei erhielt man ein orangenes Öl, welches erneut in Wasser aufgenommen wurde. Hierbei fand eine Ausfällung von Proteinen statt, die durch erneute Filtration entfernt wurden.
- d.) Danach erneutes Entfernen der wässrigen Phase.
- e.) Trennung von Mimosin (**40**) mittels Sephadex G-10, dieser Schritt wurde mehrmals wiederholt (ca. 5 mal), bis man eine konstante Radioaktivität erhielt.

Dabei detektierte man einen Wert, der bei abnehmender Masse konstant blieb.

4.11.5 Allgemeine Meßprozedur

Die Mimosinfraktion wurde in 3 mL Wasser aufgelöst und 10 µl für die Messung mittels Szintillationszähler abgenommen.

Folgender Wert ergab sich dabei: 236 mg 393.12 dpm

Das entspricht einem absoluten Einbau von 4.8% bezogen auf die eingesetzte Radioaktivität.

Da aber die Mimosin (**40**) Produktion von sechs Blättern bei 50-70 mg liegt, handelt es sich bei dem Rest um Verunreinigungen. Um nun sicher zu sein, daß die Radioaktivität vom Mimosin (**40**) kommt, wurde die Kristallisation als weiterer Reinigungsschritt hinzugezogen. Das Problem bei dieser Aufreinigungsmethode ist die geringe Ausbeute, da man nur einen Bruchteil des Mimosinanteils in Reinform erhält. Die Ausbeute lag bei 5.6 mg mit einer Radioaktivität von 8054 dpm. Dies würde einem Einbau von 4.1% entsprechen.

4.11.6 Daten zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität

Bestimmen der Radioaktivität von 10 μl ^{14}C Lysin:

$$10 \mu\text{l} = 2.45 \cdot 10^6 \text{ dpm} = 40833,33 \text{ dps} = 1.10 \mu\text{Ci}$$

Insgesamt hat die Lösung eine Aktivität von 3.7 MBq/mL

Berechnung des Koeffizienten: $1.85 \text{ MBq} = 50 \mu\text{Ci}$

$$\text{d.h. } 1.1 \mu\text{Ci} = 40.7 \text{ KBq}$$

Formeln zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität:

spez. Einbaurrate = Erhaltene spez. Aktivität/ Zugeführte spez. Aktivität

spez. Aktivität = Molmasse/Einwaage * Beq/dpm * gem. Aktivität

4.11.7 Fütterungsversuche

Es wurden vier Fütterungsversuche durchgeführt. In allen wurde die oben angegebene Menge an radioaktivem Lysin (**42**) zugegeben.

1.) Im ersten Fütterungsversuch wurden pro Blatt 40 mg Lysin (**42**) gefüttert. Diese Menge wurde in 0.3 mL Wasser aufgelöst und dann dem Blatt zugeführt. Die Aufnahme der Flüssigkeit fand in einem Zeitraum von drei bis fünf Stunden statt. Bevor das Blatt für vier Tage in das Gewächshaus gestellt wurde, führte man 1 mL Wasser zu. Es wurde jeden Tag darauf geachtet, daß dem Blatt immer genügend Wasser zur Verfügung stand.

Nach vier Tagen wurde nach dem oben beschriebenen Verfahren aufgearbeitet. Bis auf Punkt e.), da hier die HPLC anstatt Sephadex G10 aus Zeitgründen verwendet wurde. Man erhielt: 6.3 mg mit 294 dpm, dies entspricht einem Einbau von 0.6%.

2.) Im zweiten Fütterungsversuch wurden 210 mg Lysin (**42**) auf zwei Blätter eingesetzt und in 1.6 mL Wasser gelöst.

Man erhielt: 5.4 mg mit 3460 dpm, dies entspricht einen Einbau von 6.8%

3.) Der dritte Fütterungsversuch beinhaltete 160 mg Lysin (**42**), das auf zwei Blätter eingesetzt und in 1.5 mL Wasser gelöst wurde.

Man erhielt: 5.1 mg mit 1560 dpm, dies entspricht einem Einbau von 2.7%.

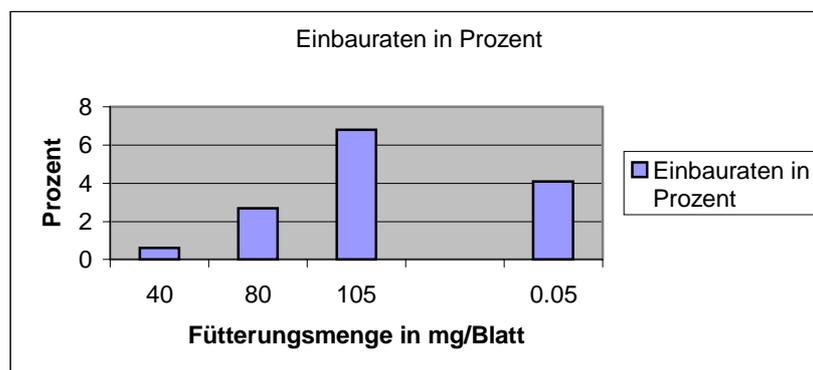
4.) Beim vierten Fütterungsversuch wurden 250 mg Lysin (**42**) auf zwei Blätter eingesetzt und in 3 mL Wasser gelöst.

Leider war die Mimosin-Konzentration so gering, daß kein reines Mimosin (**40**) isoliert werden konnte.

Tab. 3 Zusammenfassung der Einbauraten

Fütterungsexperiment	Nach Umkristallisieren
40 mg pro Pflanze	0.6%
80 mg pro Pflanze	2.7%
105 mg pro Pflanze	6.8%

Abb. 69: Graphische Darstellung der Fütterungsergebnisse



Anhand der Daten erkennt man, daß ein Zusammenhang zwischen Fütterungskonzentration und Einbauraten besteht. Je höher die Fütterungsmenge ist, um so grössere Einbauraten sind zu erwarten. Jedoch kann man die zuzuführende

Menge nicht unbegrenzt erhöhen, da Lysin (**42**) ab einer bestimmten Konzentration nicht mehr in Wasser löslich ist.

Es läßt sich auch zeigen, daß ein Loch zwischen der 0.05 mg und der 40 mg Fütterung besteht. Vermutlich ist das Pflanzensystem in diesem Bereich in einer Art „Schockzustand“ und nimmt kein zugeführtes Lysin (**42**) auf oder verwendet es für anderen Biosyntheseschritte. Erst nachdem man das System mit Lysin (**42**) flutet, kommt es wieder zu einem Einbau in Mimosin (**40**).

Das Ergebnis konnte nun für Fütterungsexperimente mit ¹³C-markierten Lysin (**42**) eingesetzt werden.

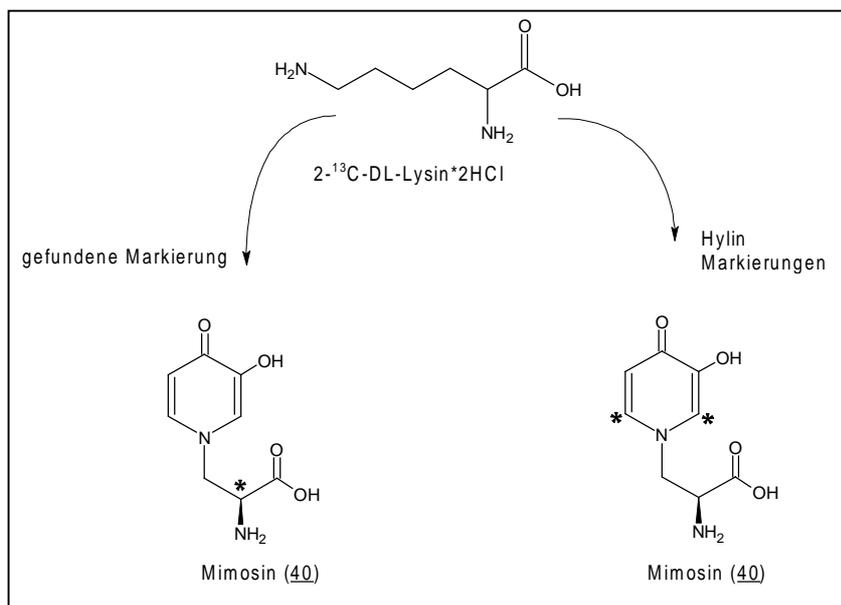
4.12 Fütterung mit [2-¹³C]-DL-Lysin * 2HCl (42**)**

Als Fütterungsvorschrift wurden die im vorhergehenden Kapitel erarbeiteten Ergebnisse verwendet. Die Fütterung mit 105 mg Lysin (**42**) pro Zweig lieferte die höchste Einbaurate. Sie liegt bei ca. 7-8%.

Die erwartete Markierung an Pos. 2 und/oder 6 im Pyridonring blieb aus, stattdessen konnte ein Einbau in die Seitenkette an der Pos. 8 mit einer Einbaurate von 6.7% beobachtet werden.

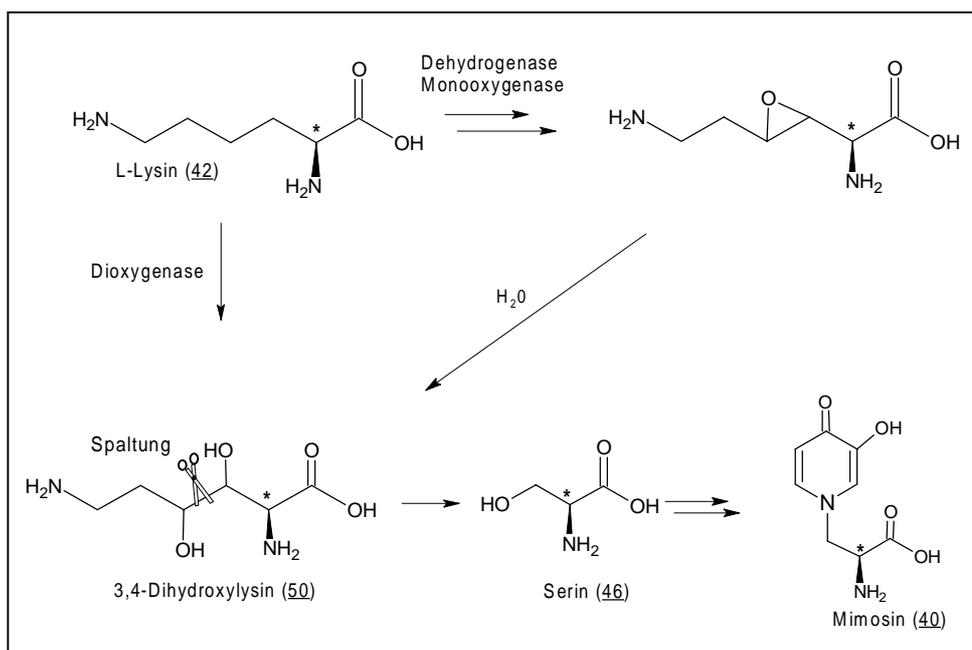
Ein Ergebnis war schon von Dr. Rao aus unserer Arbeitsgruppe gefunden und durch den weiteren Seitenketteneinbau nur bestätigt worden.

Abb. 70: Markierungen in Mimosin (40)



Dieses Ergebnis steht im krassen Widerspruch zu den von J.W. Hylin^[88] und I.D. Spenser et al.^[93] erhaltenen Resultaten. Nach ihren Erkenntnissen hätte der Einbau im Ring stattfinden sollen und nicht in der Seitenkette. (Siehe Abb. 71)

Abb. 71: Biosynthetische Interpretation dieses Ergebnisses



Es könnte sein, daß durch eine Dioxygenase das 3,4-Dihydroxylysin (**50**) aus Lysin (**42**) gebildet wird und es dann zu einer Spaltung kommt, durch die Serin (**46**) entsteht, welches in die Seitenkette eingebaut wird.

Eine zweite Möglichkeit wäre das Vorhandensein einer Dehydrogenase, die mit einer Monooxygenase gekoppelt ist. In diesem Fall könnte ein Epoxid entstehen, welches dann unter Wasseranlagerung 3,4-Dihydroxylysin (**50**) bildet.

4.12.1 Begründung

Die Unterschiede zwischen unseren Experimenten und denen von J.W. Hylin^[88] und I.D. Spenser^[93] liegen zum einen an der Verwendung von abgeschnittenen Zweigen für die Fütterung und zum anderen an den Fütterungsmengen.

J.W. Hylin und auch I.D. Spenser verfütterten die markierten Substanzen an die komplette Pflanze (**siehe Kap. 4.10**). Bei unserem Experiment wurde nur ein einzelner Zweig verwendet. Dieses könnte von dem System als Angriff gewertet werden und das Auslösen der oben gezeigten Enzymaktivitäten hervorrufen, um schneller toxisches Mimosin (**40**) herstellen zu können.

Eine andere Überlegung ist, daß durch das Fluten des Pflanzensystems mit größeren Mengen an Lysin (**42**) eine Biosyntheseweg aktiviert wurde, der das Lysin (**42**) schneller verarbeitet und aus dem System entfernt und der Einbau somit als Zufall gewertet werden kann. Das würde auch den in der **Abb. 69** (Chart) gezeigten Abfall der Einbauraten zwischen den Konzentrationen 0.05 mg Lysin (**42**) und 40 mg erklären.

Um zu überprüfen, ob bei geringeren Lysin-Konzentrationen Markierungen im Ring zu beobachten sind, wurde die in **Kap. 4.11.7** beschriebene Fütterung ein weiteres Mal durchgeführt.

4.13 Radioaktive Fütterung mit geringer Lysin-Konzentration

Die 10 µl wurden in 2 mL Wasser aufgelöst und zu jeweils 0.33 mL an sechs Zweige verteilt. Innerhalb von vier Stunden wurde die Flüssigkeit von ihnen komplett aufgenommen. Es wurden dann jeweils 0.5 mL Wasser zugegeben und die Zweige für zwei Tage aufbewahrt.

Es konnte dabei ein Einbau von 6% in das Mimosin (**40**) gefunden werden.

Anschließend wurde die Seitenkette durch Pyrolyse abgespalten. Das erhaltene 3,4-Dihydroxypyridin (**41**) wurde mittels Szintillation auf eine mögliche Inkorporation überprüft.

Es konnte aber keine Strahlung festgestellt werden, d.h. der Pyridin-Ring enthielt keine Markierung.

Es konnte gezeigt werden, daß die Konzentration an Lysin (**42**) keinen Einfluß auf die Art des Einbaus hat. Es war nun nötig, die Fütterung nach J.W. Hylin^[88] direkt an der Pflanze durchzuführen, um zu sehen, ob die Form der Verabreichung eine Rolle spielt.

4.14 Radioaktive Fütterungen nach der Methode von J.W. Hylin

Es wurde versucht, die Experimente von J.W. Hylin^[88] zu wiederholen und die Fütterungen direkt an der Pflanze vorzunehmen.

Es fiel auf, daß die in der Vorschrift von J.W. Hylin angegebenen Daten über die Aufnahmezeiten der Flüssigkeit nicht mit unseren Daten übereinstimmten. Nach J.W. Hylin's Angaben sollte die Aufnahmezeiten bei 1-2 Stunden liegen. In unserem Fall war erst nach 2 Tagen die Hälfte der Flüssigkeit aufgenommen worden.

Man war bis dahin immer davon ausgegangen, daß J.W. Hylin^[88] in seinen Versuchen Wasser als Lösungsmittel verwendet hat, da keine anderen Angaben gemacht worden waren.

Man konnte aber beobachten, daß durch Zusatz von Ethanol zum Lösungsmittel Wasser die Aufnahmezeiten erheblich verbessert werden können. Im Fall einer Mischung aus 80% Wasser und 20% Ethanol wurde die gesamte Lösung inner-

halb von 8-12 Stunden aufgenommen. Die angrenzenden Blätter zeigten keine Beeinträchtigung wie z.B. Austrocknung oder eine Veränderung der Blattfarbe.

Daher wurde eine Fütterung an zwei Blättern mit jeweils 10 µl radioaktiven Lysin (**42**) in 0.3 mL ethanolischer Lösung durchgeführt.

Das erhaltene Mimosin (**40**) wies nur einen 1.8%igen Einbau auf, nach der Abbaureaktion zu 3,4-Dihydroxypyridin (**41**) konnte keine Radioaktivität mehr nachgewiesen werden. Auch in dem direkt aus der Pflanze isolierten 3,4-Dihydroxypyridin (**41**) konnte keine Radioaktivität festgestellt werden.

4.15 Entwicklung eines Systems für spezielle Fütterungsexperimente und spätere genetische Untersuchungen.

Neben den Fütterungsexperimenten an Pflanzen sollten auch Fütterungsexperimente an Pflanzenzellen durchgeführt werden. Der Vorteil von Pflanzenzellkulturen ist, daß viele Nebenkomponenten in ihnen nicht vorhanden sind. Die Fütterungsbedingungen sind viel besser kontrollierbar, d.h. man kann auch Fütterungen mit leicht flüchtigen Stoffen wie Kohlendioxid, Stickstoff oder Sauerstoff durchführen^[99].

Für das Mimosinprojekt wäre eine Fütterung mit ¹⁸O-Sauerstoff sehr interessant, da es uns, wie in **Abb. 64** in Kap. 4.9.1 gezeigt, ermöglichen könnte, die Herkunft der Sauerstoffatome im Mimosin (**40**) aufzuklären.

Es war daher wichtig, Pflanzenzellen zu züchten, die in der Lage sind, Mimosin (**40**) in ausreichenden Mengen zu produzieren.

4.15.1 Kultivierung von Pflanzenzellen (Kallus)

Um optimale Bedingungen für Pflanzenzellkulturen zu entwickeln, muß man sich der Komplexität der beteiligten Faktoren und auch ihrer Anzahl bewußt sein^[100]:

1. Der genetische Aufbau der Pflanze:

Dies ist ein entscheidender Faktor in jedem Wachstumsstadium der Pflanze, er bestimmt z.B. die Blattform, die optimale Temperatur für die Blüte der Pflanze usw.

2. Nährstoffe: Wasser, Makro- und Mikroelemente und Zucker

3. Physiologische Wachstumsfaktoren: Licht, Temperatur, pH, Sauerstoff und CO₂-Konzentrationen

Diese Faktoren kann man von *in vivo* auf die *in vitro* Pflanze übertragen. Sie haben Einfluß z.B. auf die Wasseraufnahme, Photosynthese usw.

4. Einige organische Substanzen: Regulatoren, Vitamine usw.

Regulatoren sind organische Stoffe, welche nur in ganz geringen Konzentrationen in der Pflanze vorkommen. Sie sind z.B. verantwortlich für die Zellteilung und das Zellwachstum. Insbesondere sind Auxine und Cytokinine für *in vitro* Kulturen wichtig. Sie regulieren die Entwicklung von bestimmten Organen der Pflanze.

Um nun Pflanzenzellen zu isolieren und *in vitro* zum Wachstum anzuregen, bedarf es einer Vielzahl von Substanzen. (**Siehe Abb. 72**)

Abb. 72: Wichtige Nährstoffe und Hormone für Pflanzenzellkulturen

Wichtige Nährstoffe und Hormone für Pflanzenkulturen				
Wasser				
Organische Substanzen	Makro	Mikro		
Zucker	N	Fe	Co	
Aminosäuren	P	Zn	Ni	
Vitamine	K	B	Al	
	Ca	Mn	Mo	
Regulatoren : Auxin Cytokinin Gibberellin Abscisicsäuren Ethylen	Mg	Cu	I	
	S			
				↑
				pH
				↓
Nicht definierte Substanzen: Hefeextrakt Pflanzenextrakte Pepton und Trypton				

Makro- und Mikroelemente sind ebenfalls wichtig für die *in vivo* lebenden Pflanzen, während die organischen Substanzen und die nicht definierten

Komponenten zwar *in vitro* unabdingbar sind, aber *in vivo* zumeist von der Pflanze selber gebildet werden können.

Es werden in der Literatur verschiedene Medien beschrieben, die sich in den Konzentrationen der verschiedenen Makro- und Mikroelemente unterscheiden.

In den von uns durchgeführten Versuchen wurde das Medium von Murashige und Skoog ^[101] verwendet, da es ein allgemeines Medium ist und eine Vielzahl von Pflanzen positiv darauf reagieren.

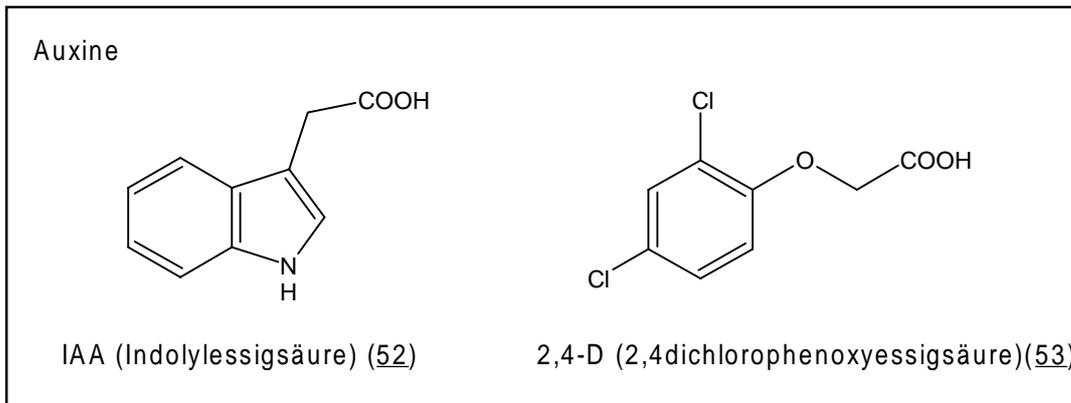
Der pH-Wert wurde in unseren Versuchen auf pH=5.9 eingestellt. Bisher ist noch wenig bekannt über die Auswirkungen des pH-Wertes auf das Pflanzenwachstum. Die Erfahrung hat gezeigt, daß der pH-Wert zwischen pH=5.0-6.5 liegen sollte, da es bei einem pH-Wert außerhalb dieses Bereiches zu einem Wachstumsstop kommt^[101].

Nachdem nun das Medium und der pH-Wert festgelegt worden waren, mußte entschieden werden, welche Regulatoren eingesetzt werden sollen.

In Pflanzen sind Hormone die Regulatoren für Wachstum und Entwicklung. Da in *in vitro* Kulturen keine natürlichen Hormone vorhanden sind, verwendet man synthetische Substanzen, die die Hormone simulieren sollen.

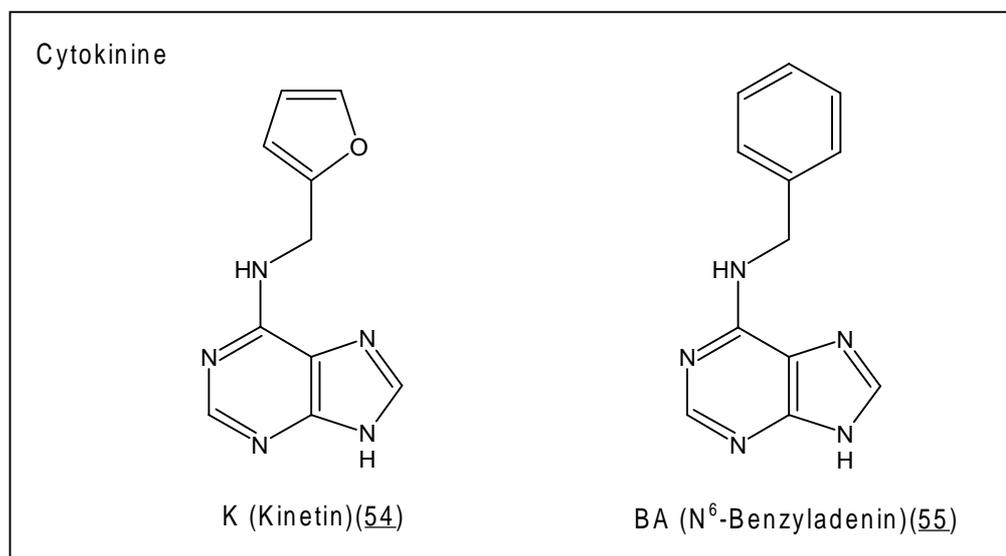
Für *in vitro* Kulturen der Pflanzen verwendet man die Gruppe der Auxine und/oder Cytokinine.

Auxin: Auxine werden allgemein für Zellwachstum, Anschwellen des Gewebes, Zellteilung (Kallus) und Bildung von Wurzeln verwendet. Auxin inhibiert das Keimen bzw. Wachsen von Pflanzentrieben ^[102] .

Abb. 73: Beispiel für Auxine

Cytokinin: Cytokinine werden für Wachstumsstimulation und Entwicklung verwendet. Sie fördern ebenfalls die Zellteilung, insbesondere im Zusammenspiel mit Auxinen^[100].

Cytokinin induziert in höheren Konzentrationen die Bildung von Pflanzentrieben, d.h. somit auch die Chlorophyllproduktion, inhibiert aber die Wurzelbildung.

Abb. 74: Beispiel für Cytokinine

Wann immer ein Auxin und/oder Cytokinin zugeführt werden muß, um Zellwachstum oder -teilung zu stimulieren, ist es notwendig, die Art der schon vorhandenen Substanz zu bestimmen.

Dies bedeutet, wenn Pflanzenzellen bereits ein Auxin produzieren, ist eine weitere Zugabe nicht notwendig.

Es müssen Untersuchungen durchgeführt werden, um folgendes zu bestimmen.

- a. Kulturen brauchen weder Auxin noch Cytokinin
- b. Kulturen brauchen nur Auxin
- c. Kulturen brauchen nur Cytokinin
- d. Kulturen brauchen beides, d.h. Auxin und Cytokinin

4.15.2 Testen verschiedener Regulatoren

Um nun die besten Wachstumsbedingungen für den Kallus zu bekommen, wurden die verschiedenen Hormone in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet.

2,4 D (2,4-Dichlorophenoxyessigsäure)(53)

I₂2BA (Indolylessigsäure (52)+ Benzyladenin (55))

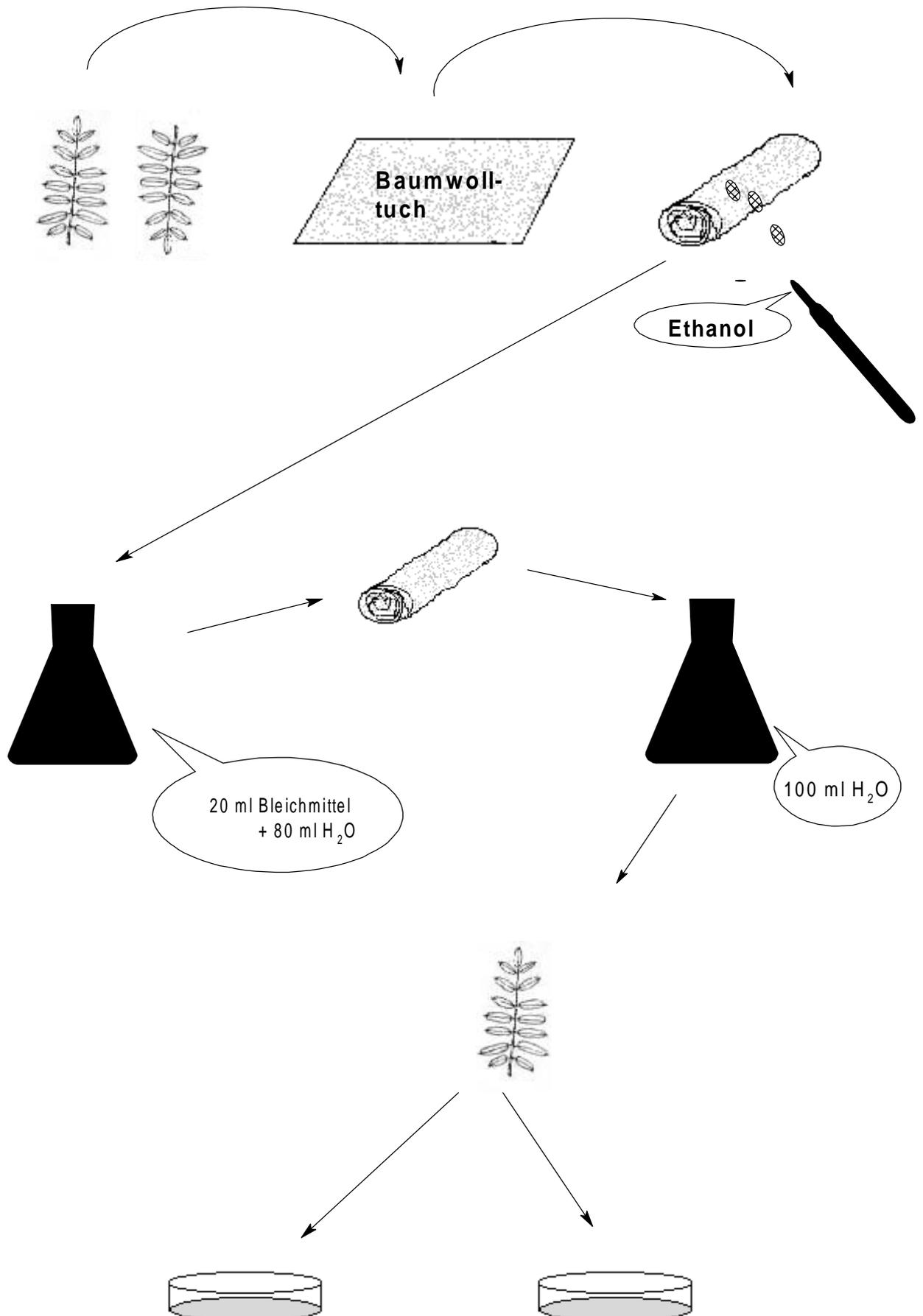
I₂4BA (Indolylessigsäure (52) + Benzyladenin (55))

I₁K₁ (Indolylessigsäure (52) + Kinetin (54))

Um das Pflanzenmaterial für die Kallusbildung verwenden zu können, muß es als erstes sterilisiert werden. Dabei geht man folgendermaßen vor (**siehe ebenfalls Abb. 75**):

1. Herstellung einer Bleiche-Lösung (20 mL Bleiche + 80 mL Wasser)
2. Pflanzenmaterial wurde in passende Stücke geschnitten und in einem Baumwolltuch eingewickelt.
3. Das Baumwolltuch wurde dann für 15 min in die Bleich-Lösung getaucht und anschliessend für 5 min in steril. Wasser getaucht.
4. Pflanzenmaterial wurde zerkleinert und dann auf die Agar-Platten verteilt.

Abb. 75: Bildung von Kallus:



4.15.3 Beobachtungen der Untersuchungen

Nach 2 Wochen zeigten sich die ersten Anzeichen einer Kallusbildung in den Medien I₂4BA und I₂2BA. Man konnte dabei helle Zellklumpen erkennen, welche aus der Rinde von Zweigen herauswuchsen. Blätter zeigten kaum Anzeichen für Kallusbildung, es fand meistens nur eine Verdickung des Blattgewebes statt.

2,4 D (**53**) zeigte auch Anzeichen von Kallusproduktion, aber das Zellwachstum war nur sehr gering und stoppte nach 4 Wochen ganz.

Das Medium I₁K₁ rief keinerlei Reaktionen bei dem Pflanzenmaterial hervor. Bei Erhöhung der Kinetinkonzentration zu I₂K₄ konnte zwar erste Anzeichen, wie Aufquellen der Rinde, beobachtet werden, aber mit dem Cytokinin BA (**55**) waren die Erfolgsaussichten besser.

Es wurde somit das Medium I₂4BA für das Produzieren von Kallus verwendet. Alle drei bis vier Wochen wurde der Kallus auf frisches I₂4BA-Medium übergeimpft und von Pflanzenresten befreit. Das Entfernen von Pflanzenresten war wichtig, da bei der späteren Untersuchung auf Mimosin (**40**) noch in den Pflanzenresten vorhandenes Mimosin (**40**) nicht stören kann und das Ergebnis verfälscht.

Um nun reinen Kallus in ausreichenden Mengen für weitere Untersuchungen zu erhalten, mußte drei bis vier mal auf frisches Medium übergeimpft werden.

Nachdem Pflanzenzellkulturen in ausreichenden Mengen vorhanden waren, wurde diese auf das Vorhandensein von Mimosin (**40**) überprüft. Man verwendete 1 g Kallusgewebe und versuchte nach der oben beschriebenen Methode mit Wasser/Essigsäure, Mimosin (**40**) zu extrahieren.

Das erhaltene Rohextrakt zeigte im HPLC-Chromatogramm keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Mimosin (**40**).

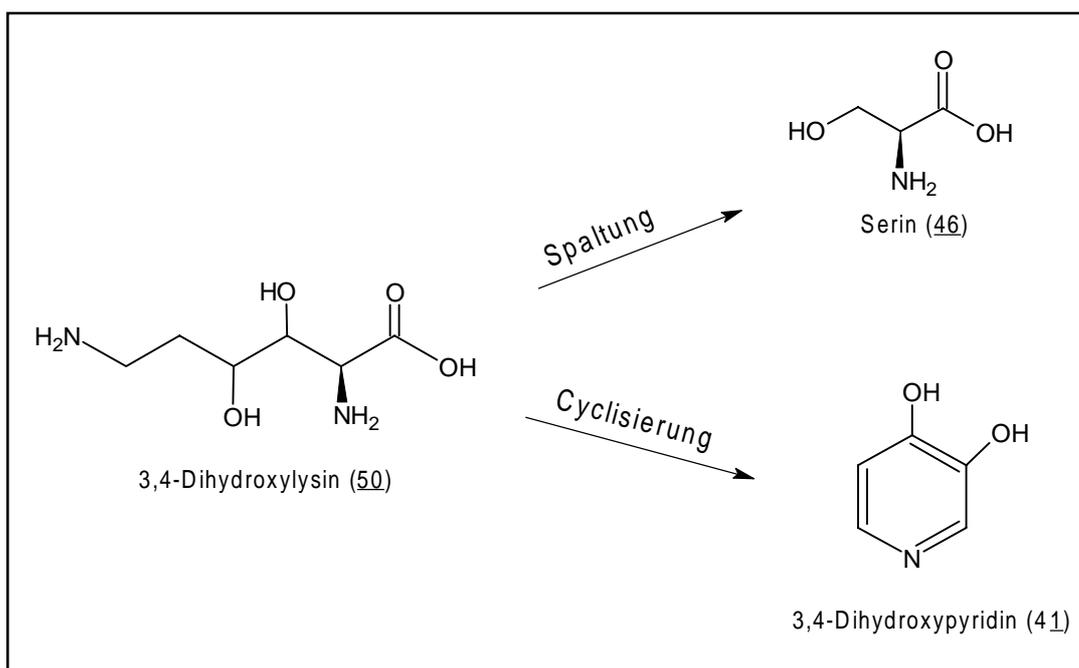
4.16 Diskussion und Ausblick

Bei Betrachtung der Ergebnisse stellt sich die Frage, ob Lysin (**42**) ein Vorläuferprodukt für den Ringaufbau ist oder nicht.

Bei der Vielzahl von Fütterungsversuchen konnte man zwar zeigen, daß Lysin (**42**) in Mimosin (**40**) eingebaut wurde, aber nicht in den Ring, sondern in die Seitenkette.

Die daraus folgenden biosynthetischen Überlegungen (**siehe Abb 64**) zeigen als mögliches Zwischenprodukt 3,4-Dihydroxylysin (**50**), welches ebenfalls bei unseren anfänglichen Überlegungen ein direktes Vorläuferprodukt von 3,4-Dihydroxypyridin (**41**) (**siehe Abb. 76**) wäre.

Abb. 76: Vorläufersubstanz 3,4-Dihydroxylysin (50)



Die Begründungen, daß die erhöhten Konzentrationen von Lysin (**42**) bzw. die Fütterungsart eine Rolle für die Spaltungsreaktion spielen, konnte durch Wiederholung der Versuche von J.W. Hylin^[88] nicht bewiesen werden. Es bestätigte sich eher das von uns gefundene Ergebnis der Markierung in der Seitenkette.

Zur Überprüfung der Biosynthese sollte markiertes 3,4-Dihydroxylysin (**50**) für Fütterungsexperimente herangezogen werden.

Es könnte der Schlüssel für die weiteren biosynthetischen Überlegungen sein, da es in beiden postulierten Biosynthesewegen als Zwischenprodukt vorkommt.

Falls es zu keinem Einbau in den Ring kommt, aber ein Seitenketteneinbau erfolgt, kann man definitiv Lysin (**42**) als Baustein für den Ring ausschließen.

Bei den Pflanzenzellkulturen sollte eine Optimierung des Nährmediums erfolgen, um die Biosynthese von Mimosin (**40**) anzuregen.

Da in dem Pflanzenmedium I₂4BA die Auxinkonzentration von IAA noch hoch ist und die Zellkulturen vielleicht zu sehr in Richtung Wurzelproduktion tendieren, sollte versucht werden, die Auxinkonzentration ganz herabzusetzen und nur noch das Cytokinin BA (**55**) zu verwenden. Dieses könnte mehr die Bildung von frischen Trieben fördern, und somit die Chlorophyllproduktion, aber gleichzeitig auch die Mimosinproduktion anregen.

In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 1994^[103] konnte gezeigt werden, daß die Bildung von Trieben in einem Gemisch aus dem Cytokinin BA (**55**) und Nitraten in Dunkelheit am stärksten war. Dieses könnte ebenfalls einen Hinweis für weitere Untersuchungen geben.

Da von Mimosin (**40**) vermutet wird, daß es eine Substanz für die Verteidigung der Pflanze gegen natürliche Feinde darstellt, wäre es auch möglich, durch Induzieren von sogenannten Elicitoren, die Produktion von Mimosin (**40**) zu beeinflussen.

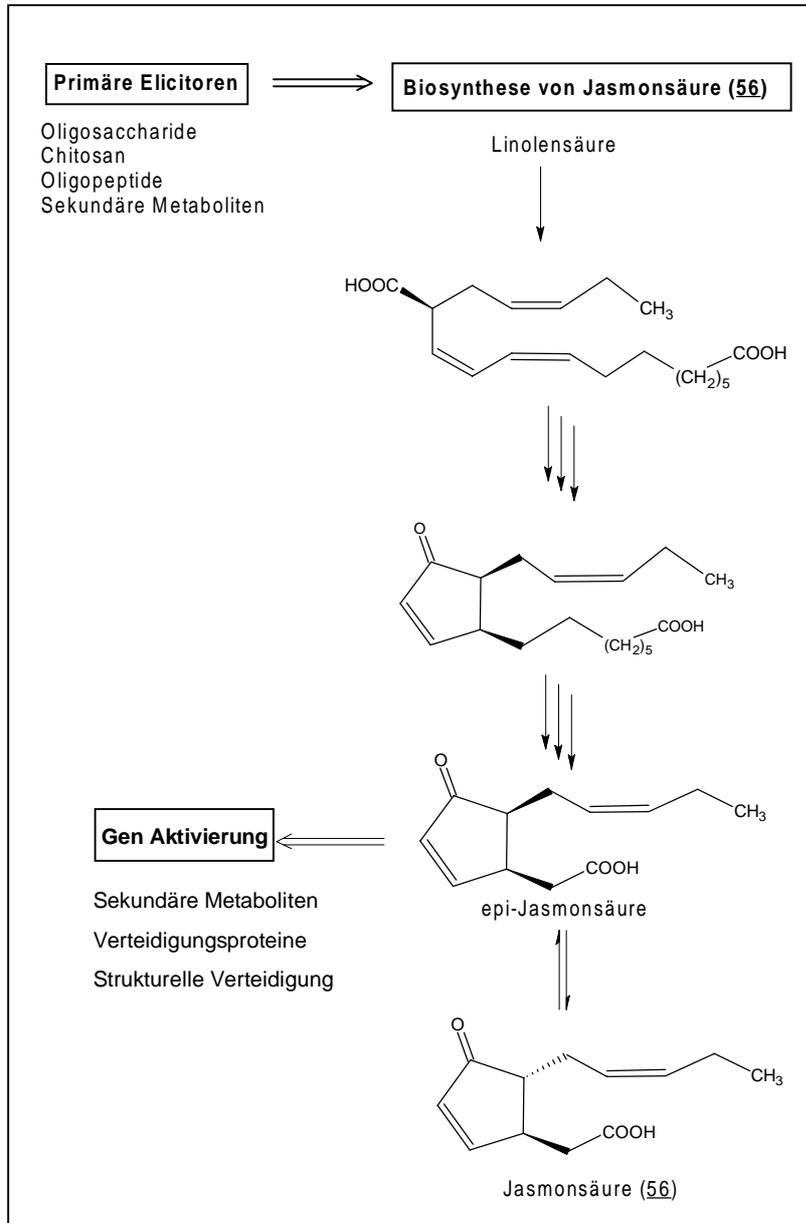
Es konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, daß bestimmte Regulationsmechanismen die Produktion von sekundären Metaboliten kontrollieren.

Diese regen die Biosynthese der Verteidigungsstoffe erst an, wenn eine Verletzung stattgefunden hat, wobei das Verteidigungssystem der Pflanze lokal oder systematisch in der ganzen Pflanze angeregt werden kann.

Dieses Warnsystem muß schnell auf die Angriffe reagieren. Obwohl noch nicht alle Schritte aufgeklärt worden sind und in den verschiedenen Pflanzen auch stark variieren konnte ein Mechanismus in einer Vielzahl von Pflanzen gefunden werden^[104].

Der Weg für das Signalsystem führt über den Biosyntheseweg von Jasmonsäure^[104] (**56**)

Abb. 76: Biosyntheseweg von Jasmonsäure (56)



Es wäre möglich, durch Hinzufügen von Jasmonsäure (56) die Mimosinbiosynthese zu beeinflussen und eine Produktionssteigerung zu erreichen.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Polyketidsynthese

Zur Untersuchung von Cyclisierungsmechanismen von Polyketiden wurden die drei Modellmolekülen (**20**), (**22**) und (**23**) synthetisiert. Aus den Strukturen konnte geschlossen werden, daß Hemiketalbildung gegenüber 4-Pyronbildung bevorzugt ist. Mit der Synthese der offenkettigen Polyketide ist die Möglichkeit gegeben, durch Umwandlung der Methylestergruppe in einen Thioester genauere Untersuchungen der Pyron-Cyclisierung durchzuführen.

2. Makropolyene

- a.) Den in einem Screening auffällig gewordenen Stamm *Streptomyces sp.106* kultivierte man, isolierte die Metaboliten aus den Extrakten und klärte deren Strukturen mit spektroskopischen Methoden auf.
- b.) Ein HPLC-System wurde ausgearbeitet, das die schnelle analytische Überprüfung sowie die präparative Aufarbeitung der Metaboliten erlaubt.
- c.) Es stellte sich heraus, daß es sich bei den Produkten um Vertreter der Substanzklasse der Makropolyene handelt. Die beiden Hauptkomponenten konnten als das neue Makropolyen (**32**) und Rimocidin (**33**) identifiziert werden, welche sich in den Seitenketten unterscheiden.
- d.) Für die Strukturaufklärung von Rimocidin (**33**) wurde aufgrund der schlechten Löslichkeit ein Derivat (**37**) mittels einer Zweistufen-Synthese gebildet. Dadurch war die Möglichkeit gegeben eine, Strukturaufklärung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie durchzuführen.

e.) Rimocidin (**33**) und Substanz 2 (**32**) wurden einem biologischen Test gegen *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans* unterzogen. Hierbei erwiesen sich beide Makropolyene (**33**) und (**32**) als nur schwach wirksam im Vergleich mit Amphotericin B (**27**). Eine Veränderung der Aktivität durch die unterschiedlichen Seitenketten konnte nicht beobachtet werden.

3. Biosynthese von Mimosin (**40**)

Zur Aufklärung der Biosynthese von Mimosin wurden Einbauversuch mit einem hypothetischen Biosynthesevorläufer, DL-Lysin, in isopenmarkierter Form durchgeführt.

- a. Es wurde ein Fütterungsprotokoll für ^{13}C -markiertes Lysin (**42**) mit Hilfe von radioaktivem Lysin (**42**) entwickelt.
- b. Bei der Fütterung mit ^{13}C -markierten Lysin kam es zu einem Einbau in die Seitenkette von Mimosin (**40**). Einen Einbau der Markierung in den Ring, wie er in der Literatur beschrieben ist, konnte nicht gefunden werden (**siehe Abb. 70**).
- c. Beim Überprüfen der von J.W. Hylin^[88] veröffentlichten Methode zum Einbau von radioaktivem Lysin (**42**) direkt an der Pflanze konnten ebenfalls keine radioaktiven Isotope in den heterocyclischen Ring eingebaut werden.
- d. Es wurden von Pflanzenzellkulturen für weiterführende Fütterungsversuche mit ^{18}O -markiertem Sauerstoff entwickelt. Dieses System kann für spätere genetische Untersuchungen verwendet werden. Dabei ist aber zu erwähnen, daß für die Mimosin-Produktion noch weitere Optimierungen mit z.B. Elicitoren notwendig sind.

B. Experimenteller Teil

1. Allgemeine Methoden

Alle Umsetzungen wurden, soweit sinnvoll, in ausgeheizten Glasapparaturen unter einem leichten N₂-Überdruck durchgeführt. Lösungsmittel wurden nach den üblichen Laboratoriumsmethoden getrocknet, destilliert und gegebenenfalls absolutiert. Käufliche Produkte wurden ohne weitere Bearbeitung eingesetzt.

Instrumentelle Analytik

Schmelzpunkte: Schmelzpunkte wurden mit einem Schmelzpunktgerät SMP-20 der Firma Büchi bestimmt und sind nicht korrigiert.

Massenspektren: EI-MS: Finnigan MAT 95, 70 eV; DCI-MS: Finnigan MAT 311 A, 200 eV; Ammoniak als Reaktionsgas eingesetzt

UV-Spektren: Kontron UV IKON 860; + HCl bzw. + NaOH: zu 2 mL der angegebenen Lösung wurde je 1 Tropfen 2 N HCl bzw. 2 N NaOH gegeben.

Perkin-Elmer Lambda 4A; + HCl bzw. +NaOH: zu 1 mL der angegebenen Lösung wurde je 1 Tropfen 0.1 N HCl bzw. 0.1 N NaOH gegeben.

¹H-NMR-Spektren: Varian Inova-500 (500 MHz), Bruker DMX 500 (500 MHz), Varian VXR-S 400 (400 MHz), Varian Unity-300 (300 MHz), Varian VXR 300 (300 MHz), Bruker AMX 300 (300 MHz), Varian XL 200 (200 MHz), Varian VXR 200 (200 MHz).

Chemische Verschiebungen in Werten der δ -Skala (ppm) relativ zu Tetramethylsilan als internem Standard. Kopplungskonstanten (J) in [Hz].

Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett, dd = Dublett vom Dublett, br = breit.

¹³C-NMR-Spektren: Bruker DMX 500 (125.7 MHz), Varian VXR-S 400 (100.6 MHz), Varian Unity-300 (75.5 MHz), Bruker AMX 300 (75.5 MHz), Varian XL 200 (50.3 MHz), Varian VXR 200 (50.3 MHz).

Chemische Verschiebungen sind in Werten der δ -Skala (ppm) relativ zu Tetramethylsilan als internem Standard angegeben.

Abkürzungen: APT (Attached Proton Test), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)

Schüttler: Infors, Multitron HT, GFL Modell 3033

Inkubator: Sanyo Modell MIR 152, Boekel Scientific Modell 133000

Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie: DC-Kieselgel-Fertigplatten Sil G-25/UV (254 + 366 nm), 0.25 mm Schichtdicke (Fa. Macherey & Nagel); DC-Kieselgel-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ (Fa. Merck), 0.25 mm Schichtdicke; DC-Fertigplatten RP-18 F₂₅₄ (Fa. Merck).

Säulenchromatographie: Kieselgel, 30-60 μ m Korngröße (Fa. J. T. Baker); Kieselgel 60, 40-63 μ m Korngröße (Fa. Macherey & Nagel); Sephadex LH-20 (Pharmacia), Sephadex G-10 (Pharmacia Biotech).

Anfärbereagenzien: Anisaldehyd-Sprühreagenz (Gemisch aus 850 mL Methanol, 100 mL Essigsäure und 50 ml Schwefelsäure; pro 100 mL dieses Gemisches Zugabe von 1 mL Anisaldehyd, nach Ansprühen erwärmt);

FeCl₃-DC-Platte: 5% methanolische Lösung auf DC-Kieselgelplatte giessen und eintrocknen lassen

HPLC: Pumpe: Kontron 420; Detektoren: Kontron 450; Mischkammer: Kontron M 800; Kontron Multiport; Datensystem: Kontron Data System 450; Vorsäule: Upchurch Scientific Precolumn Module 5 x 5 mm mit Macherey & Nagel

RP-8, 25-40 μm ; Säule: Kontron 250 x 10 mm Spherisorb ODS RP-18 10 μm (semipräparativ), Kontron 250 x 4.6 mm Spherisorb ODS RP-1 5 μm (analytisch).

Lösungsmittel: Lösungsmittel für die Chromatographie wurden, sofern nicht analysenrein, vor der Benutzung destilliert. Für die HPLC wurden nur analysenreine Lösungsmittel (Fa. Fisher Scientific) sowie bidestilliertes Wasser benutzt, die zuvor im Ultraschallbad entgast wurden.

Isotopenmarkierte Verbindungen: ^{14}C -markiertes L-Lysin (spez. Aktivität: 11.4 GBq/mmol, Konzentration 3.7 MBq/mL, radio-chemische Reinheit: 99.9%) von der Fa. NEN Life Science Products.

[2- ^{13}C]-DL-Lysin * 2HCl von der Fa. Isotec Inc.

Flüssigkeitszintillationszähler: Beckmann LS 1801 Liquid Scitillation Systems

Flüssigkeit: Scinti Safe 30% von der Fa. Fisher Scientific

Berechnung der spezifischen Aktivität:

$$407000 \text{ Bq} = 2.45 * 10^6 \text{ dpm}$$

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{\text{Molmasse}}{\text{Einwaage}} * \frac{40.7\text{Bq}}{2450 \text{ DPM}} * \text{gem.DPM}$$

Berechnung der spezifischen Einbaurate:

$$\text{spezifische Einbaurate} = \frac{\text{Erhaltene spezifische Aktivität}}{\text{Zugeführte spezifische Aktivität}}$$

Berechnung der ^{13}C -Anreicherung:

$$\% \text{Anreicherung} = 1.1\% * \frac{X/X_{\text{ST}}}{Y/Y_{\text{ST}}} \% - 1.1\%$$

X: Intensität des Signals der markierten Verbindung

Y: Intensität des Referenzsignals

St: Standardsignal

Mikrobiologische Methoden

Abkürzungen:

dd Wasser: bidest. Wasser

Nährmedienbestandteile: D-Glucose, Malzextrakt, D-Mannit, Calciumcarbonat und Saccharose wurden von der Firma Merck bezogen.

Agar, Tryptic Soy Broth, Bacto Tryptone und Yeast Extract wurden von der Fa. Difco gekauft.

L-Lysin, L-Serin, L-Cystein von der Fa. Sigma gekauft.

Vollfett-Sojamehl wurde von der Fa. Henschel bezogen.

Wachstumssubstanzen für Pflanzen: 3-Indolylessigsäure (IAA), N⁶-Benzyladenin (BA), und Kinetin (K) wurden bei der Fa. Fluka geordert.

Nährmedienzusammensetzung: Alle Nährmedien wurden 20 Minuten bei 121°C autoklaviert

Tabelle 1: Festmedien:

R5-Medium	
21g	Agar
103 g	Succrose
10 g	D-Glucose
5 g	Hefeextrakt
5.73g	TES-Puffer
10.72g	MgCl ₂ x H ₂ O
0.25 g	K ₂ SO ₄
0.1g	Casaminoacids
mit 850 mL dest. Wasser auf 1 Liter auffüllen	

Tabelle 2: Flüssigmedien

Medium 1	Medium 2	Medium 3
0.25% Nutrient broth	2% vollfett Sojamehl	20 g D-Glucose
0.4 % Tripton	2% D-Mannit	20 g lösliche Stärke
0.5 % Tryptic soy broth	pH = 7-7.5	5 g Hefeextrakt
0.2 % D-Glucose		2.5 g Pharmamedium
2.5 % lösliche Stärke		1 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O
0.3 % Hefeextrakt		1.3 g KH ₂ PO ₄ x 3 H ₂ O
		3 g NaCl
		3 g CaCO ₃
		mit Leitungswasser auf 1 Liter auffüllen

Pflanzenmedien:

B5 Medium: Zusammensetzung der Stammlösungen für einen Liter Medium

1. Anorganische Salz-Lösung	100 mL
2. Stammlösung A	1 mL
3. Stammlösung B	5 mL
4. Stammlösung C	1 mL
5. Stammlösung D	1 mL
6. Stammlösung E	variabel
7. Stammlösung F	1 mL
8. Zucker	20 g

Der pH-Wert wird auf 5.9 ± 0.1 unter Verwendung von 3 % KOH- oder 1% HCL-Lösung eingestellt. Anschließend auf 1 Liter mit dest. Wasser auffüllen.

Herstellung der Stammlösungen:1. Anorganische Salze

NaH ₂ PO ₄	1.50 g
KNO ₃	25.00g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.34 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	2.50 g

gelöst in einem Liter dest. Wasser

2. Stammlösung A

CaCl ₂ * 2H ₂ O	15 g in 100 mL dest. Wasser
---------------------------------------	-----------------------------

3. Stammlösung B (muß im Gefrierschrank bei – 10 °C gelagert werden)

Nicotinsäure	200 mg
Thiamin HCl	2.0 g
Pyridoxin HCl	100 mg
M-inositol	20 g

gelöst in ein Liter dest. Wasser und in 5 mL große Portionen aufteilen.

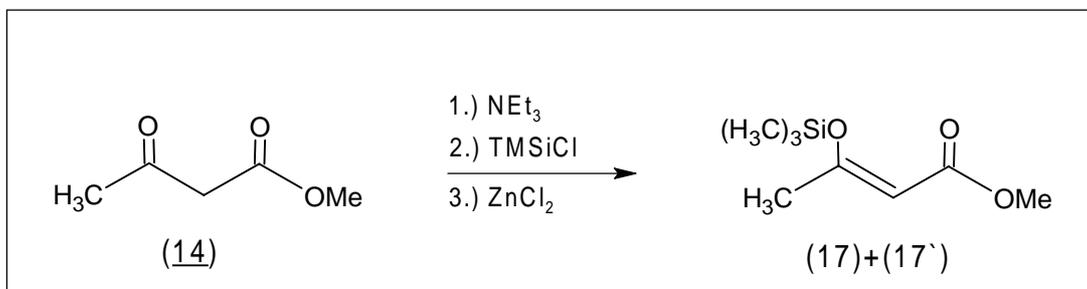
4. Stammlösung C

MnSO ₄ * H ₂ O	1.0 g
H ₃ BO ₃	300 mg
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	200 mg
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	25 mg
CuSO ₄ * 5H ₂ O	3.9 mg
CoCl ₂ * 6H ₂ O	2.5 mg

Gelöst in 100 mL dest. Wasser

2. Polyketidsynthesen

2.1 Darstellung von 3-trimethylsiloxybut-2-enoat (**17**)+(17')



116.11 g/mol

188.3 g/mol

In einen 250 mL Kolben wurden 2 g ZnCl_2 ($M = 136.28 \text{ g/mol}$; 14.6 mmol) durch Erwärmen im Vakuum getrocknet. Danach wurden 16 mL Triethylamin ($M = 101.07 \text{ g/mol}$; 0.11 mmol) zugegeben und 1 Stunde lang gerührt. Dann fügte man 9 mL Trimethylchlorosilan TMSiCl ($M = 108.64 \text{ g/mol}$; 0.08 mmol) zu.

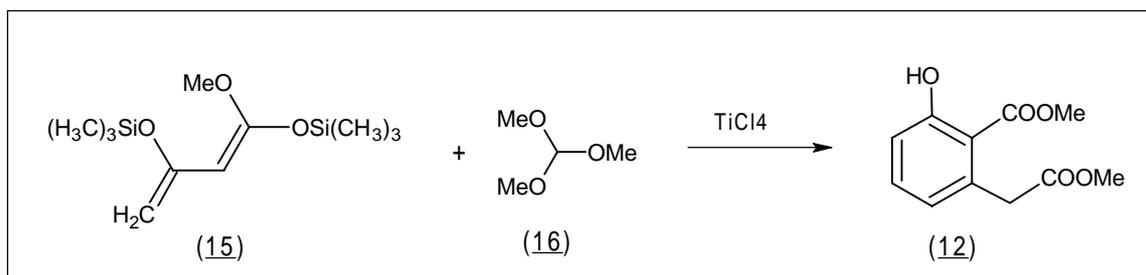
Die Lösung wurde anschließend 2 Stunden unter Rückfluß gerührt. Nach Abkühlen der Lösung gab man 7 g (60 mmol, $M = 100.11 \text{ g/mol}$) Acetoacetat (**14**) zu und ließ die Lösung weitere 8 Stunden unter Rückfluß erwärmen. Nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde der Feststoff abgetrennt und mehrmals mit Petrolether (PE) gewaschen.

Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Durch Destillation erhielt man 9.5 g (54 mmol, 93%) von (**17**)+(17'). Dabei lag der Stoff in einem Gemisch bestehend aus der E (**17'**)- und Z (**17**)-Konfiguration vor.

Tabelle 3: ^1H -NMR-Daten (300 MHz, d_1 -Chloroform) von (**17**)+(17')

E-Konfiguration		Z-Konfiguration	
^1H -Daten δ (ppm)	Multiplizität (J/Hz)	^1H -Daten δ (ppm)	Multiplizität (J/Hz)
0.28	9H, s –Si(CH ₃) ₃	0.28	9H, s –Si(CH ₃) ₃
2.27	3H, s	1.90	3H, s
3.77	3H, s, -OMe	3.60	3H, s -OMe
5.14	1H, s	5.10	1H, s

2.3 Darstellung von Dimethyl 3-hydroxyhomophthalat (12)



260.3 g/mol

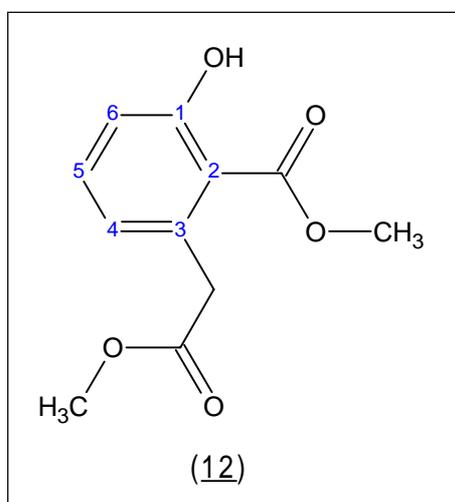
106.1 g/mol

224.2 g/mol

Zu einer Lösung bestehend aus 0.656 g (4 mmol) Orthoameisensäuretrimethylester (**16**) und 0.8 mL (8 mmol) TiCl_4 in 10 mL p.a. CH_2Cl_2 wurden bei -78°C 2 g (8 mmol) 1,3-bis(trimethylsiloxy)-1-methoxybuta-1,3-dien (**15**) innerhalb von 45 min zugegeben. Die Lösung wurde dann zwei Stunden bei -78°C gerührt, bevor langsam auf Raumtemperatur erwärmt und weitere zwei Stunden gerührt wurde. Die dunkelrote Lösung wurde dann in 200 mL einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung gegeben und mit Et_2O extrahiert. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer eingengt. Im Dünnschichtchromatogram konnten drei Spots identifiziert werden.

Die Reinigung erfolgte durch Kieselgelsäulenchromatographie (CH_2Cl_2)

Hauptprodukt: 1-Hydroxy-2-methoxycarbonyl-3-phenylacetat (12)



R_f -Wert = 0.53 (CH_2Cl_2)

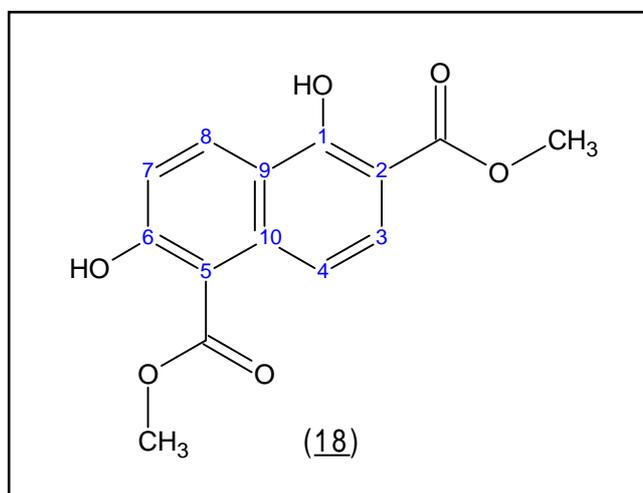
EI-MS (70 eV) : $m/z = 224$ [M; (35%)], 192 [M-OCH₃, (100%)], 161 [M-OCH₃, (40%)] $\rightarrow \text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$

Ausbeute : 56 %

Tabelle 5: ¹H-NMR-Daten (300 MHz, d₁-Chloroform) von (12)

Nr.	¹ H-Daten δ (ppm)	Multiplizität (J/Hz)	¹³ C-Daten δ (ppm)
3'	3.66	2H, s	42.21
3'-OMe	3.86	3H, s (-CO ₂ CH ₃)	51.63
2'-OMe	3.95	3H, s (-CO ₂ CH ₃)	51.81
		(-CO ₂ CH ₃)	170.76
		(-CO ₂ CH ₃)	171.70
1	11.2	1H, s (-OH)	162.61
2			111.90
3			136.16
4	6.72	1H, d (8.0)	117.17
5	6.92	1H, d (8.0)	123.61
6	7.84	1H, dd (8.0)	134.23

Nebenprodukt: 1,6-dihydroxy-naphthalen-2,5-acetat (18)



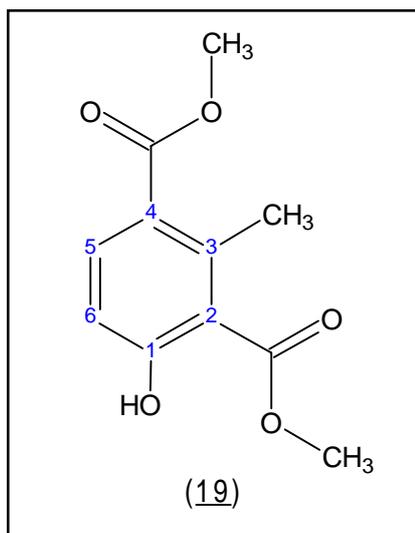
$R_f = 0.89$ (CH_2Cl_2)

EI-MS (70 eV) : $m/z = 276$ [M; (55%)], 244 [M-OCH₃; (40%)], 212 [M-OCH₃; (100%)] $\rightarrow \text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_6$

Ausbeute: 10%

Tabelle 6: ¹H-NMR-Daten (300 MHz, d₁-Chloroform) von (**18**)
¹³C-NMR-Daten (75.5 MHz, d₁-Chloroform),
 Multiplizität der ¹³C-Daten durch APT

Nr.	¹ H-Daten δ (ppm)	Multiplizität (J/Hz)	¹³ C-Daten δ (ppm)
1	12.38	1H, s (Pos.1, -OH)	166.49 (u)
2			136.92 (u)
3	7.17	1H, d (10.0)	118.64 (o)
4	7.82	1H, d (10.0)	127.20 (o)
5			119.20 (u)
6	11.86	1H, s (Pos.6, -OH)	160.56 (u)
7	8.30	1H, d (10.0)	116.04 (o)
8	8.55	1H, d (10.0)	131.83 (o)
9			105.15 (u)
10			104.52 (u)
	4.0	3H, s (Pos. 2, - CO ₂ CH ₃)	52.31 (o)
		(Pos.2,-CO ₂ Me3)	171.04 (u)
	4.1	3H, s (Pos. 5, - CO ₂ CH ₃)	52.59 (o)
		(Pos.5,-CO ₂ Me3)	172.54 (u)

Nebenprodukt: Dimethyl-1-Hydroxy-3-methylphthalat (19)

$R_f = 0.55$ (CH_2Cl_2)

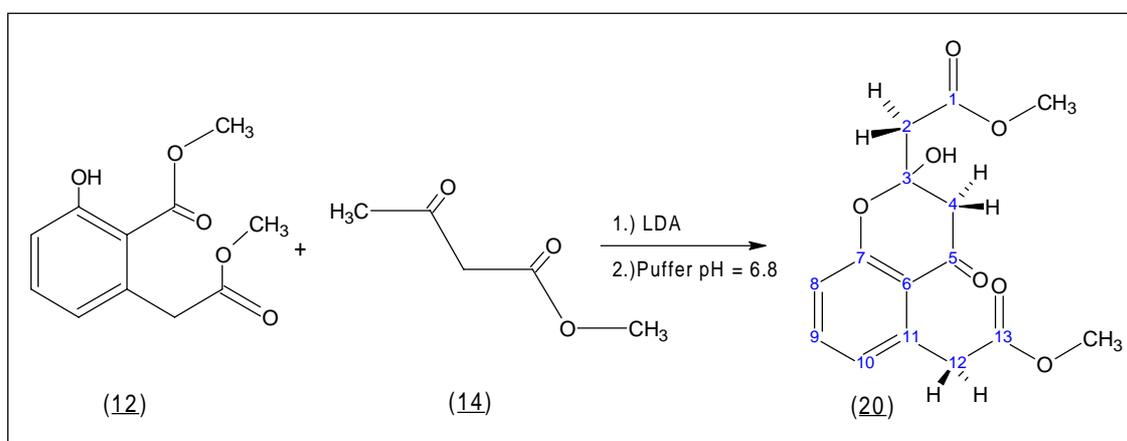
EI-MS (70 eV) : $m/z = 224$ [M; (35%)], 192 [M-OCH₃, (100%)], 161 [M-OCH₃, (40%)] → C₁₁H₁₂O₅

Ausbeute : 20 %

Tabelle 7: ¹H-NMR-Daten (300 MHz, d₁-Chloroform) von (19)
¹³C-NMR-Daten (75.5 MHz, d₁-Chloroform)
 Multiplizität der ¹³C-Daten durch APT

Nr.	¹ H-Daten δ (ppm)	Multiplizität (J/Hz)	¹³ C-Daten δ (ppm)
1	11.04	1H, s (-OH)	163.97 (u)
2			114.53 (u)
3			143.64 (u)
4			123.92 (u)
5	7.79	1H, d (8.0)	135.96 (o)
6	6.80	1H, d (8.0)	115.22 (o)
	2.66	3H, s (-CH ₃)	20.03 (o)
	3.82	3H, s (-CO ₂ CH ₃)	52.03 (o)
	3.93	3H, s (-CO ₂ CH ₃)	52.57 (o)
			168.01 (u)
			171.70 (u)

2.4 Darstellung von Substanz (20)



224.21g/mol

116.1 g/mol

308.28 g/mol

Um LDA-Lösung (8 mmol) herzustellen, gab man bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1.2 mL (8 mmol) Diisopropylamin und 7.6 mL n-BuLi (8 mmol) in 10 mL THF zusammen. Nach 10 min wurden 0.232 g (2 mmol) Acetessigsäuremethylester (**14**) zugegeben und 30 min bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Dann gab man eine Lösung bestehend aus 200 mg (0.89 mmol) Dimethyl-3-Hydroxyhomophthalatester (**12**) und 1 mL TMEDA in 5 mL THF bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ zu. Die Lösung wurde 30 min bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und dann auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 2 Stunden gerührt. Nun gab man die Lösung in einen Puffer bestehend aus 25 mL KH_2PO_4 und 25 mL K_2HPO_4 (pH = 6.8) und rührte die Mischung 1 h. Danach extrahierte man mit CH_2Cl_2 . Das Produkt erhielt man durch Kieselgelsäulenchromatographie mit dem Laufmittel Toluol/Essigester 8:2 in 40% Ausbeute.

$R_f = 0.31$ (Toluol/Essigester (8:2))

EI-MS (70 eV) : $m/z = 308$ [M; (80%)] $\rightarrow \text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_7$

Ausbeute: 108 mg (40%)

UV (Methanol) λ_{max} [nm] (ϵ) = 214 (6300)

UV (Methanol/HCl) λ_{max} [nm] (ϵ) = 214 (6200)

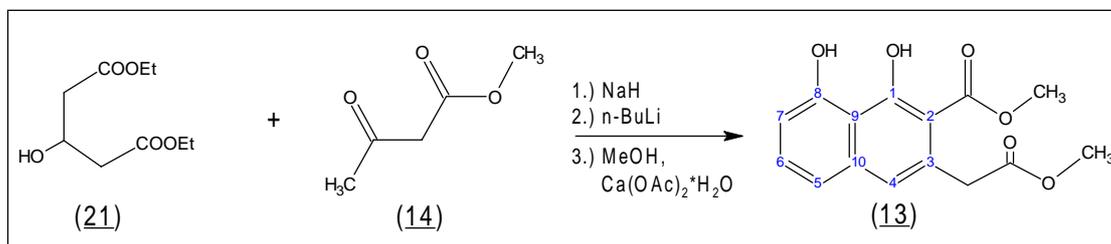
UV (Methanol/NaOH) λ_{max} [nm] (ϵ) = 207 (6200)

Tabelle 8: ^1H -NMR-Daten (200 MHz, d_1 -Chloroform) von (**20**)
 ^{13}C -NMR-Daten (50.3 MHz, d_1 -Chloroform),
 Multiplizität der ^{13}C -Daten durch APT

Nr.	^1H -Daten δ (ppm)	Multiplizität (J/Hz)	^{13}C -Daten δ (ppm)
1			171.73 ^{*1} (u)
2	2.91	2H, d (8.0)	48.17 (u)
3			99.47 (u)
4a	3.03 ^{*2}	1H, d (15.0)	42.64 (o)
4b	2.78 ^{*2}	1H, d (15.0)	42.64 (o)
5			191.48 (u)
6			119.02 (u)
7			158.91 (u)
8	6.82	1H, d (8.0)	125.75 (o)
9	7.41	1H, dd (8.0)	135.02 (o)
10	6.92	1H, d (8.0)	118.23 (o)
11			135.99 (u)
12a	4.19 ^{*3}	1H, d (15.0)	40.66 (o)
12b	3.85 ^{*3}	1H, d (15.0)	40.66 (o)
13 ^{*1}			171.32 ^{*1} (u)
1'	3.83 ^{*4}	3H, s	51.82 ^{*4} (o)
13'	3.71 ^{*4}	3H, s	52.37 ^{*4} (o)

*Zuordnung untereinander vertauschbar

2.5 Darstellung von Methyl 1,8-dihydroxy-2-(Methoxycarbonyl)-3-naphthyl-acetat



204.2 g/mol

116.1 g/mol

290.3 g/mol

Unter Stickstoffatmosphäre wurden Methylacetoacetat (**14**) (3.22g, 27.9 mmol) in 10 mL THF und eine Suspension aus Natriumhydrid (672 mg, 28 mmol) in 30 mL THF zusammengegeben. Die Lösungen wurden während der Zusammengabe auf 0° Celsius abgekühlt. Dann rührte man die Lösung 10 min, bevor n-Butyllithium (28 mmol) in Hexan (18 mL) bei weiterhin 0° Celsius hinzugegeben wurde. Nach weiteren 10 min gab man dann eine Lösung bestehend aus 3-Hydroxyglutarsäureethylester (**21**) (0.714 mg, 3.5 mmol) in THF (4 mL) hinzu. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur erwärmt und für 2 Stunden rühren gelassen.

Anschließend gab man das Reaktionsgemisch in eine auf 0° Celsius abgekühlte 2N HCl Lösung (50 mL) und extrahierte danach das organische Material mit zweimal mit Ethylacetat. Die Lösung wurde mit Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt. Weiter wurde eine Suspension bestehend aus Methanol und Ca(OAc)₂ · H₂O vorbereitet in die nun die ölige Flüssigkeit zugegeben wurde. Das Gemisch wurde 2 h unter Rückfluß gerührt.

Eine erneute Zugabe von 2N HCl und Extraktion mit Ethylacetat ergab wiederum eine ölige Flüssigkeit. Das Produkt erhielt man durch Säulenchromatographie (CH₂Cl₂) in 43%iger Ausbeute.

R_f = 0.65 (CH₂Cl₂)

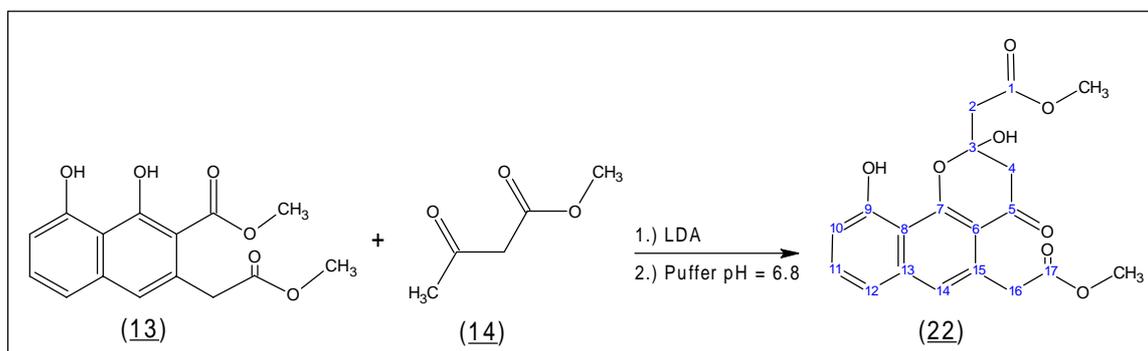
Ei-MS (70 eV) : m/z =290 [M; (30%)], 258 [M-OCH₃; (40%)], 226 [M-OCH₃; (100%)] → C₁₅H₁₄O₆

Ausbeute: 436 mg (43%)

Tabelle 9: $^1\text{H-NMR}$ -Daten (200 MHz, d_1 -Chloroform) von **(13)**

Nr.	^1H -Daten δ (ppm)	Multiplizität (J/Hz)
1	14.2	1H, s (-OH)
4	7.06	1H, s
5	7.15	1H, d (7.0)
7	6.87	1H, d (7.0)
6	7.45	1H, t (7.0)
8	9.53	1H, s (-OH)
<u>-CH₂COOMe</u>	3.67	5H, s
<u>-COOMe</u>	3.93	3H, s

2.6 Darstellung der Verbindung **(22)**



290.3 g/mol

116.1 g/mol

374.3 g/mol

Zu einer LDA-Lösung (8 mmol ;1.1 mL Diisopropylamin, 6 mL n-BuLi, 1 mL TMEDA) fügte man bei -78°C langsam 174 mg Acetessigsäuremethylester **(14)** (8 eq, 1.5 mmol) hinzu. Die Lösung wurde 1 h bei -78°C rühren gelassen, bevor der Methyl 1,8-Dihydroxy-2-(methoxycarbonyl)-3-naphthyl-acetate **(13)** (100 mg, 0.3 mmol) in 5 mL THF innerhalb von 30 min zugegeben wurde. Die Lösung wurde für weitere 30 min bei -78°C gerührt und dann langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Nach weiteren 2 h gab man die Lösung langsam in eine 50 mL Pufferlösung (pH = 6.8, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$). Nach einer Stunde extrahierte man mit

CH₂Cl₂. Das Produkt erhielt man durch Kieselgelsäulenchromatographie mit dem Laufmittel Toluol/Essigester 8:2 in 32% Ausbeute.

R_f (Toluol/AcOEt 8:2)= 0.27

EI-MS (70 eV): m/z = 374 [M; (100%)], 342 [M-OCH₃; (30%)] → C₁₉H₁₈O₈

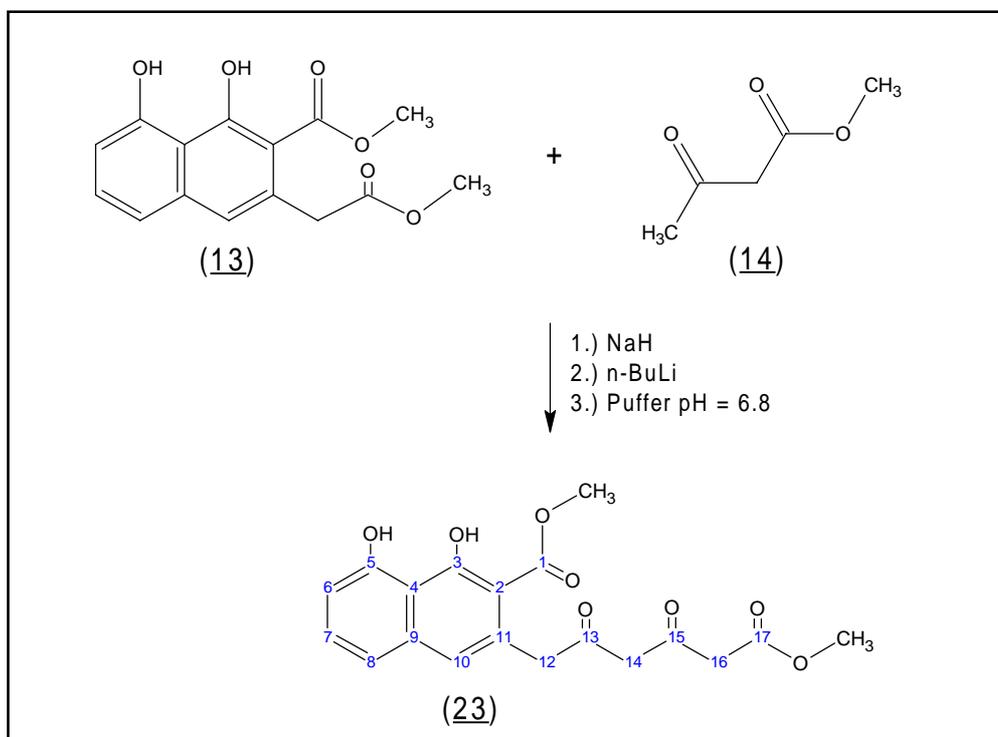
Ausbeute: 34 mg (32%)

Tabelle 10: ¹H-NMR-Daten (200 MHz, d₁-Chloroform) von (**22**)
¹³C-NMR-Daten (50.3 MHz, d₁-Chloroform),
 Multiplizität der ¹³C-Daten durch APT

Nr.	¹ H-Daten δ (ppm)	Multiplizität (J/Hz)	¹³ C-Daten δ (ppm)
1* ¹			172.2
2	3.00	2H, dd (15, 27)	43.0
3	5.79	1H, s (-OH)	65.0
4a* ²	2.95	1H, t (18)	47.8
4b* ²	3.21	1H, t (18)	47.8
5			189.6
6			102.1
7			158.0
8			113.9
9	8.92	1H, s (-OH)	155.4
10	6.89	1H, d (7.0)	112.3(o)
11	7.45	1H, t (7.0)	131.6(o)
12	7.19	1H, d (7.0)	126.1(o)
13			138.3
14	7.18	1H, s	119.0(o)
15			130.3
16a* ³	4.15	1H, d (18)	41.1
16b* ³	3.92	1H, d (18)	41.1
17* ¹			171.2
18* ⁴	3.69	3H, s, COOCH ₃	51.9
19* ⁴	3.85	3H, s, COOCH ₃	53.0

*Zuordnung untereinander vertauschbar

2.7 Darstellung der Substanz (23)



Unter Stickstoffatmosphäre wurde eine THF-Lösung (10 mL) bestehend aus 1.07 g (9 eq, 9 mmol) Methylacetoacetat (**14**) zu einer THF (30 mL) Suspension mit NaH (224 mg, 9 mmol), bei 0° Celsius, zugegeben. Die Lösung wurde dabei 10 min gerührt. Butyllithium (10 mmol) in 10 mL Hexan wurden zugefügt und nach weiteren 10 min gab man eine weitere THF-Lösung bestehend aus Methyl 1,8-dihydroxy-2-(methoxycarbonyl)-3-naphthyl-acetate (**13**) (1 eq, 290 mg, 1mmol) und 6 mL HMPT zu. Es wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend in einer 200 mL Phosphatpuffer-Lösung (pH = 6.8) gequenchet. Nach einer halben Stunde wurde das Lösungsmittel entfernt. Die Trennung erfolgte mittels Kieselgelsäulenchromatographie (PE/EE 6:4). Die Ausbeute lag bei 24%.

$R_f = 0.27$ (Petrolether/Essigester (6:4))

EI-MS : $m/z = 374$ [M; (100%)], 342 [M-OCH₃; (30%)] → C₁₉H₁₈O₈

Ausbeute: 89 mg (24%)

Tabelle 11: ^1H -NMR-Daten (200 MHz, d_1 -Chloroform) von **(23)**
 ^{13}C -NMR-Daten (75.5 MHz, d_1 -Chloroform),
 Multiplizität der ^{13}C -Daten durch APT

Nr.	^1H -Daten δ (ppm)	Multiplizität (J/Hz)	^{13}C -Daten δ (ppm)
1			167.9 (u) ^{*2}
2			104.1 (u)
3	14.25	1H, s (-OH)	164.1 (u)
4			113.3 (u)
5	9.72	1H,s (-OH)	156.8 (u)
6	6.91	1H, d (7.0)	111.8 (o)
7	7.48	1H, t (7.0)	132.0 (o)
8	7.17	1H, d (7.0)	124.1 (o)
9			137.7 (u)
10	7.08	1H, s	118.2 (o)
11	5.5	1H, s (-OH)	130.2 (u)
12	3.99	2H, s	47.0 (u)
13			182.9 (u)
14	3.92	1H, s	99.4 (o)
15	15.1	1H, s (-OH)	195.6 (u)
16	3.22	2H, s	43.5 (u)
17			172.5 (u) ^{*2}
18	3.90	3H, s (-CO ₂ CH ₃)	52.5 (o) ^{*1}
19	3.23	3H, s (-CO ₂ CH ₃)	52.4 (o) ^{*1}

*Zuordnung untereinander vertauschbar

3. Streptomyces SP 106

3.1 Kultivierung des Stamms

Zur Sporenvermehrung wurde das R5-Medium verwendet. Man brachte die aus Spanien stammenden Sporen auf Platten aus und ließ sie 4 Tage lang bei 28°C anwachsen. Von diesen Agarplatten wurden Flüssigkulturen mit gut bewachsenen Stücken angeimpft (100 mL Medium 2 in 250 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen) und 72 Stunden bei 28° Celsius und 180 U/min fermentiert.

Für die Isolierung der Rohprodukte vermischte man die Kulturlösung mit Celite (100 g/L) und trennte anschließend mittels Vakuumfiltration. Die gelblich wäßrige Lösung wurde in einem Aceton/Trockeneisbad eingefroren und das Wasser dann mittels der Gefriertrocknung entfernt. Dabei erhielt man einen hellbraunen Feststoff welcher in 200 mL Methanol aufgenommen wurde und über einen Papierfilter ein weiteres Mal gereinigt wurde. Dabei wusch man der Rückstand dreimal mit 100 mL Methanol. Das Lösungsmittel wurde am Rotationverdampfer entfernt. Die weitere Aufreinigung fand mittels HPLC mit einer semipräparativen RP-18 Säule statt.

HPLC-Programm:

0-3 min Gradient Wasser/Acetonitril (100%/0%).

3-4 min zu Wasser/Acetonitril (70%/30%)

4-9 min zu Wasser/Acetonitril (65%/35%)

9-11 min zu Wasser/Acetonitril (60%/40%)

11-13 min zu Wasser Acetonitril (50%/50%)

13-14.50 min zu Wasser/Acetonitril (30%/70%)

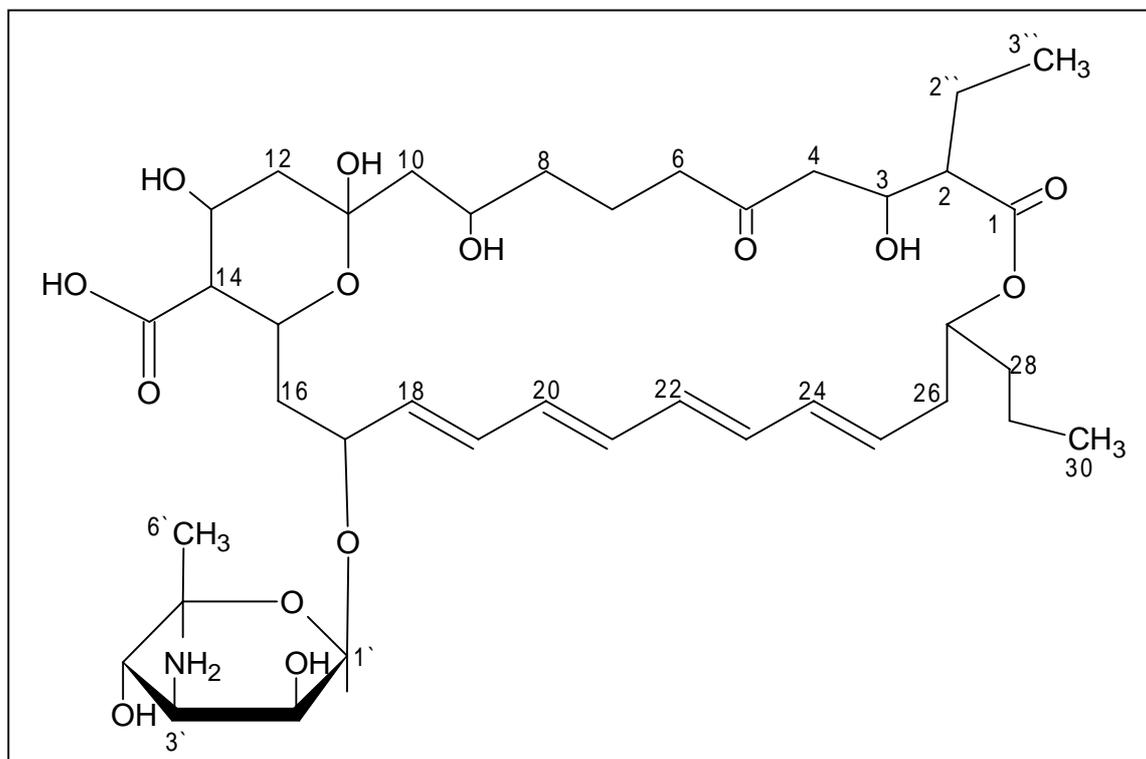
14.50 Reinigungsprogramm Acetonitril (100%)

HPLC-Retentionszeiten: Für das kleinere Molekül (32) 10.2 min

Für das größere Molekül (33) 13.7 min (Säule: Kontron Spherisorb ODS 10 µm RP-18 semipräparativ; Flussgeschwindigkeit 5 mL/min, mobile Phase 24 min Laufmittelsystem: Acetonitril/Wasser)

3.2 Rimocidin (33)

Rimocidin



MW = 767.8 g/mol. ($C_{39}H_{61}NO_{14}$)

FAB-MS: (positive Ionen) : 768 ($[M+H]^+$).

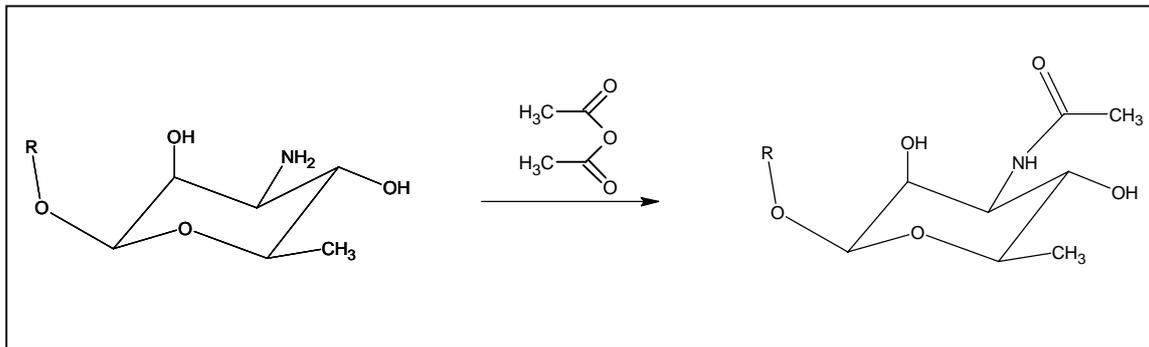
FAB-MS: (negative Ionen): 766 ($[M-H]^-$).

UV (Methanol) λ_{max} [nm] (ϵ) = 317 (7200); 302 (7800); 289 (5400)

Schmelzpunkt: Zersetzung bei 115° C

3.3 Derivatisierung der beiden Makropolyene

3.3.1 Acetylierung der Aminogruppe am Zucker



30 mg des jeweiligen Makropolyen wurden in 5 mL trockenem MeOH gelöst und auf 4° Celsius abgekühlt. Nach 5 min gab man 2 μ L Acetanhydrid zu und ließ die Lösung 10 Stunden rühren. Durch DC-Kontrolle konnte nur ein Produkt identifiziert werden. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und das resultierende Produkt konnte umgehend für die nächste Reaktion eingesetzt werden.

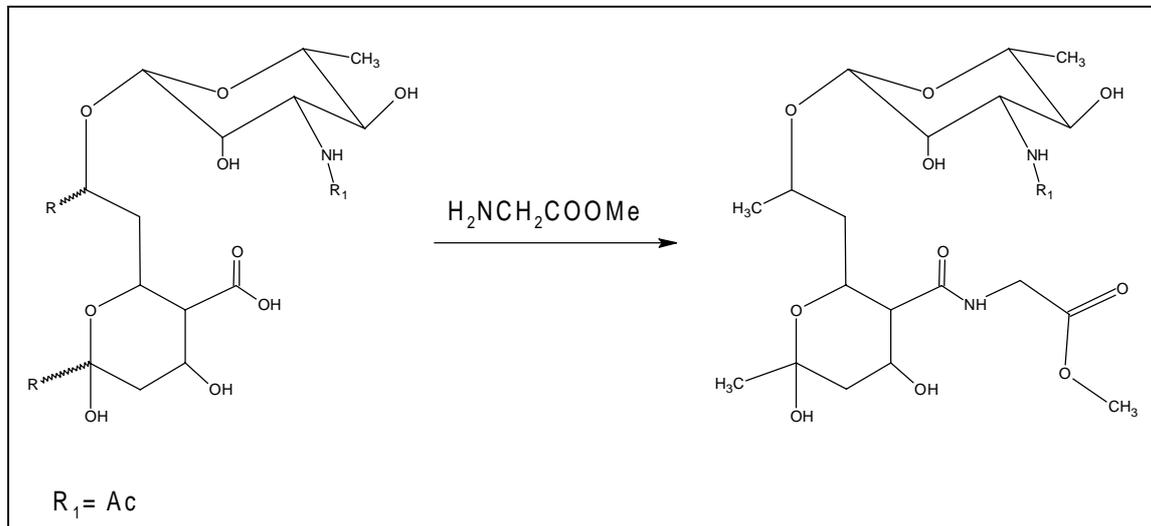
Die Ausbeuten lagen für beide Makropolyene bei 95-99%. (nach HPLC-Analyse)

Verwendetes HPLC-Program (siehe Rimocidin).

DCI-MS (negative Ionen): $m/z = 808.5$ [M-H, (100%)]

MW= 809.8 ($C_{41}H_{63}NO_{15}$)

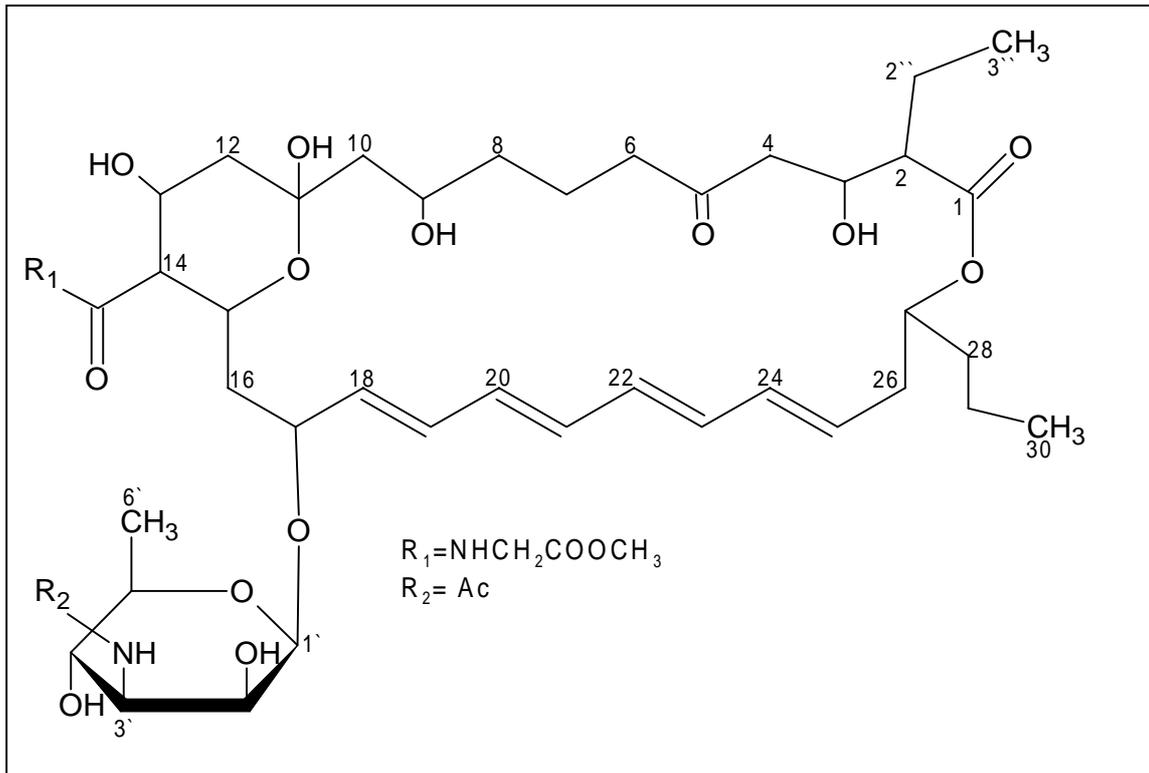
3.3.2 Amidierung der Carbonsäuregruppe zum Derivat (37)



Zu einer auf 0° Celsius gekühlten Lösung bestehend aus 30 mg Makropolyen, 100 mg Glycindimethylester Hydrochlorid in 5 mL Dimethylformamid gab man 0.1 mL Triethylamin und 0.1 mL DPPA (Diphenylphosphoramid). Die Lösung wurde 12 h bei 0 Grad gekühlt. Aufreinigung fand mittels HPLC statt. Das verwendete HPLC-Program wurde schon unter der allgemeinen Aufarbeitung beschrieben. Die Ausbeute lag, bedingt durch Verluste bei der Aufreinigung mittels HPLC, bei 60%.

3.4 Rimocidin-Derivat (37)

Rimocidin-Derivat



MW = 880.1 g/mol. ($\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{N}_2\text{O}_{16}$)

FAB-MS: (positive Ionen) : m/z 881 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

FAB-MS: (negative Ionen): m/z 879 ($[\text{M}-\text{H}]^-$).

UV (Methanol) λ_{max} [nm] (ϵ) = 319 (10300); 304 (9000); 291 (6500).

Tabelle 12: ^1H -NMR-Daten (500 MHz, d_5 -Pyridin/ d_4 -Methanol im Verhältnis 9:1)
 ^{13}C -NMR-Daten (125.7 MHz, d_5 -Pyridin/ d_4 -Methanol im Verhältnis 9:1),
 von (**37**)

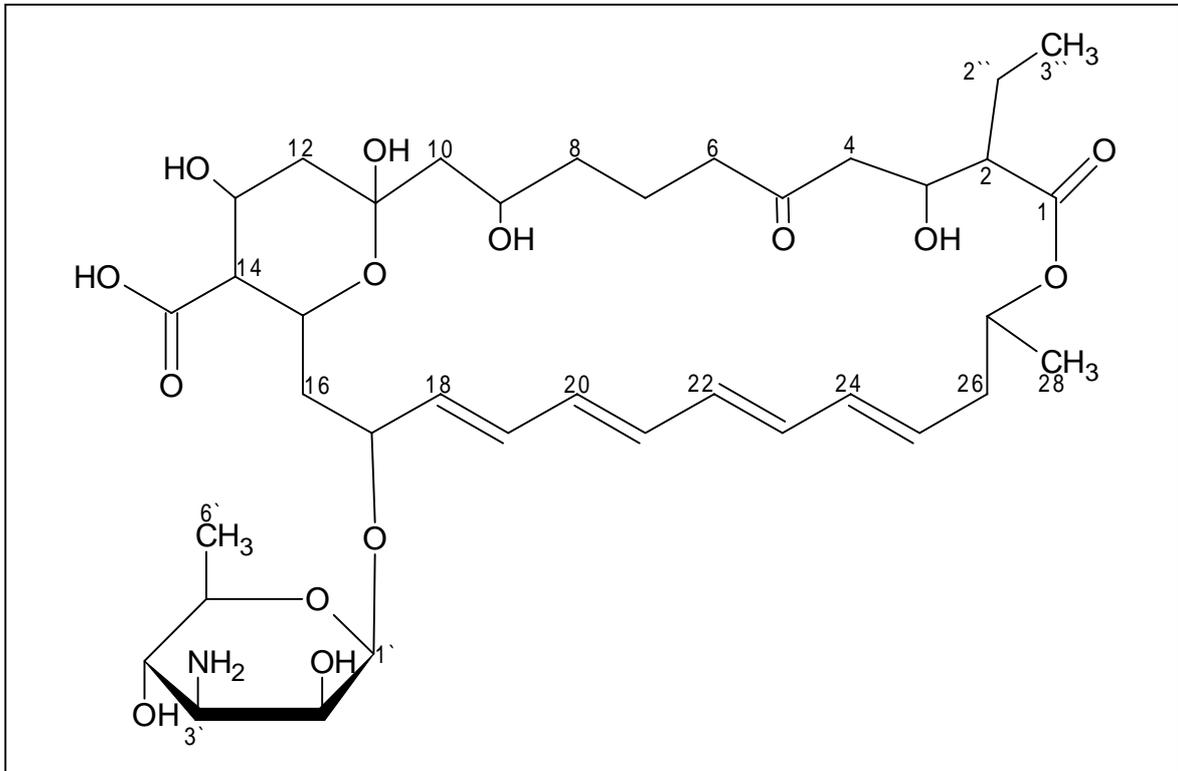
Nr.	^1H -Daten δ (ppm)	Multiplizität (J/Hz)	^{13}C -Daten δ (ppm)
1			173.57
2	2.67	1H, dt, (9.6, 3.6)	57.45
2''	2.30; 1.85	2H, ddq (12.5, 9.6, 7.2)	23.17
2''-Me	1.06	3H, t (7.2)	14.14
3	4.64	1H, m	68.84
4	2.70; 2.91	2H, m	49.59
5			210.40
6	2.70; 2.55	2H, m	45.20
7	1.75; 2.05	2H, m	20.49
8	1.40; 1.63	2H, m	38.37
9	4.54	1H, ddt (9.5, 8.2, 2.2)	68.59
10	1.78; 1.90	2H, dd (13.5, 9.5)	47.08
11			98.35
12	1.80; 2.55	2H, m	45.65
13	5.12	1H, ddd (10.8, 9.9, 4.1)	66.45
14	2.85	1H, dd (9.9)	58.10
14 -CO			174.49
15	5.23	1H, dd (9.9, 9.5)	66.90
16	2.98; 2.15	2H, ddd (14.3, 9.5, 5.9)	38.54
17	4.95	1H, dt (8.5, 5.9)	76.48
18	6.39	1H, dd (14.9, 8.5)	137.88
19	6.30	1H, m	129.28

20	6.51 ^{*2}	1H, m	134.01
21	6.21 ^{*1}	1H, m	132.21
22	6.21 ^{*1}	1H, m	132.88
23	6.21 ^{*1}	1H, m	132.54
24	6.45 ^{*2}	1H, m	134.10
25	5.75	1H, ddd (14.0, 9.5, 5.1)	131.48
26	2.30;2.45	2H, m	38.61
27	5.23	1H, ddt (10.5, 6.3, 1.9)	73.54
28	1.63; 1.51	2H, dt (14.0, 7.0)	37.40
29	1.37	2H, m	18.77
30	0.90	3H, t (7.2)	14.14
	Zucker		
1'	5.29	1H, s	98.35
2'	4.55	1H, d (2.8)	71.10
3'	4.65	1H, dd (9.0, 2.8)	56.23
4'	4.02	1H, m	72.58
5'	3.95	1H, m	74.50
6'	1.59	3H, d (5.7)	18.77
	3'-NHCOMe		
-CO			172.04
Me	2.10	3H, s	23.17
	Gly-OMe		
CH2	4.63; 3.99	2H, d (17.5)	41.45
-CO			171.04
Me	3.88	3H, s	52.53

*Zuordnung untereinander vertauschbar

3.5 Substanz 2 (32)

Substanz 2



MW: 739.77 g/mol. (C₃₇H₅₇NO₁₄)

FAB-MS: (positive Ionen): m/z 740 ([M+H]⁺).

FAB-MS: (negative Ionen): m/z 738 ([M-H]⁻).

UV (Methanol) λ_{max} [nm] (ε): 317 (54700); 302 (60300); 290 (44200).

Tabelle 13: ^1H -NMR-Daten (500 MHz, d_4 -Methanol) von **(32)**
 ^{13}C -NMR-Daten (125.7 MHz, d_4 -Methanol),

Nr.	^1H -Daten δ (ppm)	Multiplizität (J/Hz)	^{13}C -Daten δ (ppm)
1			173.4
2	2.18	1H, dt (9.6, 3.8)	56.3
2''	1.59;1.90	2H, dq (7.5, 3.8)	22.4
2''-Me	0.92	3H, t, (7.5)	10.9
3	4.11	1H, dd (9.6, 2.2)	68.5
4	2.37;2.46	2H, m	48.8
5			210.6
6	2.46;2.32	2H, m	44.3
7	1.39;1.61	2H, m	19.6
8	1.39;1.30-1.26	2H, m	37.6
9	4.12	1H, ddt (9.3, 8.2, 2.2)	68.4
10	1.61	2H, m	46.5
11			97.8
12	2.02;1.30-1.26	2H, m	44.1
13	4.29	1H, ddd (11.1, 10.5, 4.6)	66.9
14	2.03	1H, t (9.3)	60.5
-COOH			179.3
15	4.37	1H, dd (9.3, 8.2)	66.6
16	2.30;1.70	2H, dd (8.2)	38.7
17	4.45	1H, td (3.5, 8.3)	78.2
18	5.95	1H, dd (15.3,8.3)	136.0
19	6.35	1H, dd (13.8,10.7)	133.6
20	6.13 ^{*1}	1H, m	129.3
21	6.13 ^{*1}	1H, m	133.4
22	6.13 ^{*1}	1H, m	132.3

23	6.13 ^{*1}	1H, m	132.3
24	6.13 ^{*1}	1H, m	132.6
25	5.63	1H, ddd (14.0, 9.5, 5.1)	131.1
26	2.32; 2.40	2H, m	40.0
27	5.07	1H, ddq (10.5, 6.3, 1.9)	70.8
28	1.26	3H, d (6.3)	20.0
Zucker			
1'	4.62	1H, s	98.2
2'	4.03	1H, d (2.8)	68.0
3'	3.20	1H, dd (9.0, 2.8)	56.1
4'	3.37 ^a	1H, m	69.5
5'	3.35 ^a	1H, m	73.5
6'	1.31	3H, d (5.7)	16.7

a: Signale werden durch Lösungsmittelsignal teilweise verdeckt
 *: Zuordnungen untereinander vertauschbar

3.6 Test auf fungizide Wirkung

Für die Herstellung der Kolonien von *Candida Albicans* und *Cryptococcus neoformans* wurden YPD-Platten ausgestrichen und 2-3 Tage bei 30° C inkubiert. Anschließend wurden 2-3 Kolonien herausgepickt und mit 5 mL sterilen Wasser gut vermischt.

Die optische Dichte wurde bei 530 nm gemessen und die Absorption auf 0.15 eingestellt. Dies entspricht ungefähr einer Million Zellen pro mL. Von dieser Lösung wurden 100 µL abgenommen und mit 4.9 mL bidest. Wasser versetzt (1/50 Mischung) und gut durchmischt.

Es wurde eine 1:20 Lösung hergestellt aus 1 mL der oben beschriebenen 1:50 Mischung und 19 mL RMPI-Medium hergestellt.

Um die Konzentrationen der Zellen zu überprüfen, wurden 10 µL abgenommen und auf YPD-Platten ausgestrichen, wobei man nach 72 Stunden ca. 10-50 Kolonien erwartete.

Jede Öffnung der Mikrotiterplatte wurde mit 100 µL 1:20 RMPI-Lösung und mit der jeweiligen Konzentration an Makropolyen pro 100 µL sterilen Wasser bestückt. Dabei wurde eine Konzentrationsreihe von 16 µg/mL – 0.01 µg/mL ausgewählt. Die Mikrotiterplatte wurde dann für drei Tage bei 30° C in den Inkubator bei gestellt.

Zum Erhalten der Daten wurde die Mikrotiterplatte gut durchgeschüttelt und dann die optische Dichte jeder Öffnung gemessen.

RMPI-1640 Medium	YPD-Medium
10.4 g RMPI-Mischung	20 g Agar
34.53 g MOPS Puffer	10 g Peptone
auf 1 Liter dest. Wasser	10 g D-Glucose
pH=7.0 mit 5 M NaOH einstellen.	5 g Hefeextrakt
Lagerung bei 4°C	

4. Mimosin (40)

4.1 Allgemeine Isolierung von Mimosin (40) und 3,4-Dihydroxypyridin (41)

Die abgeschnittenen Zweige wurden in eine verschließbare 500 mL Pyrexflasche gegeben. Anschließend fügte man eine 1:3 Mischung aus konzentrierter Essigsäure und Wasser hinzu. Dabei war darauf zu achten, daß alle Pflanzenteile mit der Lösung in Kontakt waren.

Das Gemisch wurde für fünf Stunden auf 60° C erhitzt. Nachdem die Pyrexflasche abgekühlt war, wurden die unlöslichen Stoffe mittels eines Faltenfilter entfernt.

Man entfernte das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer. Das entstandene orangene Öl wurde mit 50 mL Wasser versetzt und erneut über einen Faltenfilter gereinigt. Die wäßrige Lösung wurde im Vakuum eingeeengt.

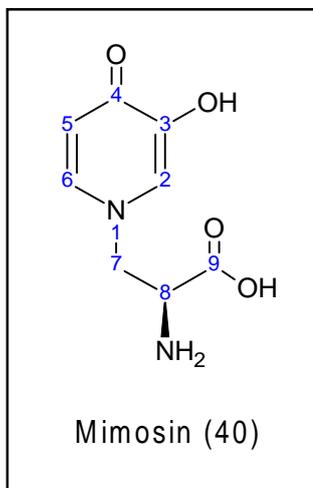
Für analytische Zwecke fand die gesamte weitere Aufreinigung an Sephadex G-10 (50 x 2.5 cm, bidest. Wasser) statt. Dieser Vorgang mußte sechs bis zu 10 mal wiederholt werden, um eine 90% Reinheit des Produkts zu erhalten.

Für die allgemeine Mimosin (40) und 3,4-Dihydroxypyridin (41) Aufreinigung wurden die Rohextrakte zuerst über HPLC RP-18 gereinigt.

HPLC-Retentionszeiten für Mimosin (40): 2.4 min

HPLC-Retentionszeiten für 3,4-Dihydroxypyridin (41): 3.5 min (Säule: Kontron Spherisorb ODS 10 µm RP-18, semipräparativ; Flußgeschwindigkeit 5 mL/min, Laufmittelsystem: Gradient Wasser + 0.2% Orthophosphorsäure/Acetonitril (100/0) -> Wasser + 0.2% Orthophosphorsäure/Acetonitril (80/20) in 3 min und anschließend Gradient zu 100% Acetonitril in 2 min).

Mimosin wurde danach zweimal über Sephadex G-10 aufgereinigt und anschließend in einem Gemisch aus H₂O/Methanol (80:20) umkristallisiert.

4.2 Mimosin (40)

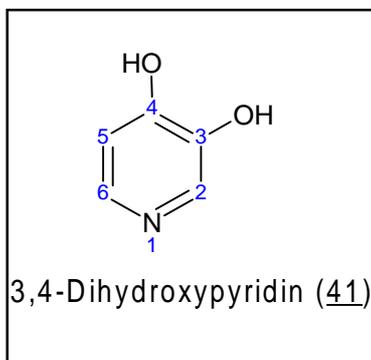
MW : 198.18 g/mol (C₈H₁₀N₂O₄)

EI-MS (positive Ionen): m/z = 199.1 [M+H; (100)]

Tabelle 14: ¹H-NMR-Daten (400 MHz, D₂O + 1 Tropfen DCI) von (40)
¹³C-NMR-Daten (100.6 MHz, D₂O + 1 Tropfen DCI),

Nr.	¹ H-Daten δ (ppm)	Multiplizität (J/Hz)	¹³ C-Daten δ (ppm)
2	7.45	1H, s	130.4
3			146.1
4			160.5
5	6.50	1H, d (7.0)	113.0
6	7.43	1H, d (7.0)	139.1
7	4.15	2H, dd (5.2, 15.1)	56.3
8	3.99	1H, t (5.2)	51.8
9			167.1

4.3 3,4-Dihydroxypyridin (41)



MW: 111.1 g/mol ($C_5H_5NO_2$)

Tabelle 15: 1H -NMR-Daten (400 MHz, D_2O) von (41)
 ^{13}C -NMR-Daten (100.6 MHz, D_2O),

Nr.	1H -Daten δ (ppm)	Multiplizität (J/Hz)	^{13}C -Daten δ (ppm)
2	7.92	1H, s	124.0
3			146.1
4			168.2
5	7.10	1H, d (7.0)	113.8
6	7.90	1H, d (7.0)	135.4

4.4 Einbauversuch mit [U-¹⁴C]-L-Lysin

Für das Fütterungsexperiment wurden 10 µL radioaktives L-Lysin (1.1µCi) in 2 mL destilliertem Wasser aufgelöst, und zu jeweils 0.33 mL auf sechs bzw. zwei Zweige verteilt. Die Flüssigkeit wurde innerhalb von 4 Stunden aufgenommen. Man gab anschließend 0.5 mL Wasser hinzu und bewahrte die Pflanze für zwei Tage auf.

Nach der Aufarbeitung wurden die Pflanzen bis zur konstanten Radioaktivität gereinigt (**siehe Theoretischer Teil: Kap. 4.11.7**), anschließend die Aktivität mit einem Flüssigkeitszintillationszähler gemessen und über einen Standard auf die spezifische Aktivitäten umgerechnet worden.

Man erhielt für 236 mg eine Aktivität von $11.79 \cdot 10^4$ dpm. Dies entspricht einen absoluten Einbau von 4.8%.

Die folgenden Fütterungsversuche fanden mit einer Mischung von unmarkierten L-Lysin mit 10µL [U-¹⁴C]-L-Lysin statt.

Nach der Aufreinigung erhielt man folgende Werte:

Tabelle 16: Einbauexperimente mit [U-¹⁴C]-L-Lysin

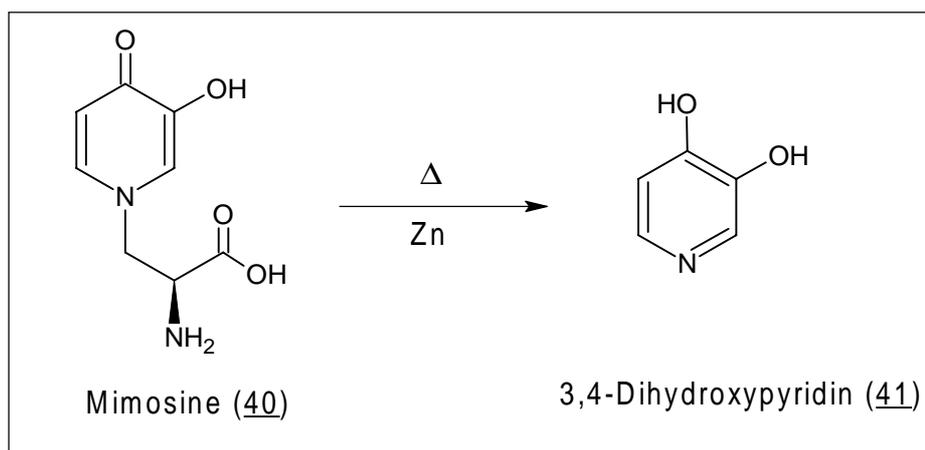
Fütterungsexperiment	Für Messung verwendete Menge an Mimosin	Spezifische Aktivität [Bq/mmol]	Spezifische Einbaurate [%]
240 mg pro 6 Blätter	6.3 mg	153	0.6%
160 mg pro 2 Blätter	5.1 mg	1006	2.7%
210 mg pro 2 Blätter	5.4 mg	2019	6.8%
125 mg pro 2 Blätter	kein Mimosin		

4.5 Einbauexperiment mit [2-¹³C]-DL-Lysin*2HCl

Für das Fütterungsexperiment wurden 210 mg [2-¹³C]-DL-Lysin * 2HCl in 1 mL dest. Wasser aufgelöst und an zwei Zweige gefüttert. Nach 3 Tagen wurden die Zweige aufgearbeitet. Die Aufarbeitung erfolgte wie in Kap.4.1 beschrieben. Dabei konnten 9.6 mg Mimosin isoliert werden.

Es konnte eine Anreicherung von 6.7% für das an Position 8 befindliche Kohlenstoffatom berechnet werden.

4.6 Abbau von Mimosin (40) nach Adams



Für die Reaktion wurden 56 mg (0.28 mol) Mimosin in einen Kolben mit 100 mg Zn gegeben und für drei Stunden auf 250° C erhitzt. Das Gemisch wurde in Methanol aufgenommen und das Zink wurde mittels Filtration entfernt. Die anschließende Isolierung von 3,4-Dihydroxypyridin fand mittels RP-18-Säule auf der HPLC statt.

Die Ausbeute lagen bei ca. 41 %. (12 mg, 0.11 mol)

4.7 Einbauexperiment von radioaktivem Lysin mit Abbau von Mimosin zu 3,4-Dihydroxypyridin

Die Fütterung wurde an den abgeschnittenen Zweigen durchgeführt. Für die Fütterung wurden 10 µL [U-¹⁴C]-L-Lysin (**42**) mit 0.5 mL Wasser verwendet und an sechs Zweigen zugeführt wurden. Die Aufnahme der Flüssigkeit fand innerhalb von einem Tag statt. Die sechs Zweige wurde noch zwei weitere Tage stehen gelassen. Die Aufarbeitung erfolgte wie in Kap. 4.1. beschrieben.

Die Mimosinfraktion wurde in 3 mL Wasser aufgelöst und 10 µL für die Messung mittels Szintillationszähler abgenommen.

Für 128 mg erhielt man dabei 489 dpm, dies würde einen Einbau von ca. 6% entsprechen.

Die Reaktion aus Kap. 4.6 nach Adams ergab 5.6 mg 3,4-Dihydroxypyridin (**41**), welches aber im Szintillationszähler keine Radioaktivität aufwies.

4.8 Einbauexperiment nach Hylin

Die Fütterung wurde nach von J.W. Hylin^[88] beschriebenen Methode durchgeführt. Für die Fütterung wurden zweimal 10 µL [U-¹⁴C]-L-Lysin mit 0.3 mL einer Mischung aus Wasser/Ethanol (80/20) verwendet und der Pflanze zugeführt. Die Aufnahme der Flüssigkeit fand innerhalb von 12 Stunden statt. Für die Isolierung von Mimosin (**40**) drei Tagen später wurden nur die Zweige genommen, die direkt mit der Flüssigkeit in Kontakt standen. Die Aufarbeitung erfolgte wie in Kap. 4.1. beschrieben.

Dabei erhielt man 56 mg Mimosin, welches in 3 mL Wasser aufgenommen wurde. Es wurden 10 µL von der Lösung abgenommen und gemessen. Man erhielt dabei folgenden Wert: 258 dpm -> absoluter Einbau von 1.8%

Nach Abbau zu 3,4-Dihydroxypyridin erhielt man 3.2 mg. Bei Messung Szintillationszähler konnte keine Radioaktivität festgestellt werden.

C. Literatur

1. Bornscheuer, U.T., "Gerichtete Evolution von Enzymen", *Angew. Chem.*, **1998**. 110(22): p. 3285-3288.
2. Verdine, G.L., "The combinatorial chemistry of nature", *Nature*, **1996**. 384: p. 11-13.
3. Scheuer, P.J., *Marine Natural Products-Discovery and Biosynthesis*. 1993, Berlin, New York, Heidelberg: Springer Verlag.
4. Nicolaou, K.C., W.-M. Dai, and R.K. Guy, "Total synthesis of Taxol", *Angew. Chem.*, **1994**. 106: p. 38-69.
5. Rohr, J., "Biosynthesis of Taxol", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1997**. 36(20): p. 2190-2195.
6. Schinzer, D., A. Limbert, and O.M. Böhm, "Studies towards the Total Synthesis of Epothilones: Asymmetric Synthesis of the Key Fragments", *Chem. Eur. J.*, **1996**. 2: p. 1477-1482.
7. Collie, J.N., "Derivatives of the multiple ketene group", *Proc. Chem. Soc.*, **1907**. 23: p. 230-231.
8. Robinson, R., *J. Roy. Soc. Arts*, **1948**. 96: p. 795.
9. Birch, A.J. and F.W. Donovan, "Studie in relation to biosynthesis I. Some possible routes to derivatives of orcinol and phloroglucinol", *Aust.J. Chem.*, **1953**. 6: p. 360-368.
10. Katz, L. and S. Donadio, "Polyketide Synthesis: Prospects for Hybrid Antibiotics", *Annu. Rev. Microbiol.*, **1993**. 47: p. 2465-2497.
11. Rohr, J., "Kombinatorische Biosynthese-eine Zukunftsstrategie?", *Angew. Chem*, **1995**. 107: p. 963-967.
12. Hopwood, D.A., "Genetic Contributions to Understanding Polyketides Syntheses", *Chem. Rev.*, **1997**. 97: p. 2465-2497.
13. Carresras, C.W., R. Pieper, and C. Khosla, "Efficient Synthesis of Aromatic Polyketides in Vitro by the Actinorhodin Polyketide Synthase", *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**. 118: p. 5158-5159.
14. McDaniel, R., D.A. Hopwood, Susanne Ebert-Khosla, and C. Khosla, "Engineered Biosynthesis of Novel Polyketides", *Science*, **1993**. 262: p. 1546-1550.

15. Fu, H., D.A. Hopwood, and C. Khosla, "Engineered biosynthesis of novel polyketides: evidence for temporal, but not regiospecific, control of cyclization of an aromatic polyketide precursor", *Chemistry & Biology*, **1994**. 1(4): p. 205-210.
16. Shen, B. and C.R. Hutchinson, "Enzymatic syntheses of bacterial polyketide from acetyl and malonyl coenzyme A", *Science*, **1993**. 262: p. 533-534.
17. Shen, Y., Tin-Wein Yu, Pall Yoon, Heinz G Floss, David Hopwood , and B.S. Moore, "Ectopic expression of the minimal whiE polyketide synthase generates a library of aromatic polyketides of diverse sizes and shapes", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1999**. 96: p. 3622-3627.
18. Johnson, P.R., H.M. Barnes, and S.M. McElvain, "Ketene Acetals. IV. Polymers of Ketene Diethylacetal", *J. Am. Chem. Soc.*, **1940**. 62: p. 964-972.
19. Khemani, K.C. and F. Wudl, "Poly(ketene) (PKT)", *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**. 111: p. 9124-9125.
20. Khemani, K., S. Askari, and F.Wudl, "High Molecular Weight Poly(ketene dihexyl acetal): Anion Effect in a Cationic Polymerization", *Macromolecules*, **1991**. 24: p. 2156-2159.
21. Harris, T.M. and C.M. Harris, "Synthesis of Polyketide-Type Aromatic Natural Products by Biogenetically Modeled Routes", *Tetrahedron*, **1977**. 33: p. 2159-2185.
22. Harris, T.M. and C.M. Harris, "Biomimetic syntheses of aromatic polyketide metabolites", *Pure & Appl. Chem.*, **1986**. 58: p. 283-294.
23. Harris, T.M. and P.J. Wittek, "Biogenetic-Type Syntheses of Polycyclic Polyketide Metabolites Using Partially Protected b-Hexa- and b-Heptaketones: 6-Hydroxymusizin, Barakol, Emodin and Eleutherinol", *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**. 97: p. 3270-3271.
24. Mahalingam, S., Peter C. Kuzma, John Y.-C. Lee, Thomas M. Harris "Synthesis of 6-Methylpreteramid, the fully Aromatic Precursor of Tetracycline", *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**. 107: p. 7760-7761.
25. Gilbreath, S.G., C.M. Harris, and T.M. Harris, "Biomimetic Syntheses of Pretetramides. 1. Synthesis of Pretetramide by Tandem Extension of a Polyketide Chain", *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**. 110: p. 6172-6179.

-
26. Chan, T.-H. and P. Brownbridge, "Biomimetic Synthesis of Sclerin", *J.C.S. Chem. Comm.*, **1981**: p. 20-21.
 27. Brownbridge, P., "Silyl Enol Ethers in Synthesis", *Synthesis*, **1983**: p. 1-104.
 28. Arai, Y., T. Kamikawa, Tadao Kamikawa, Yoshio Masuda , and R. Yamamoto, "Synthesis and Properties of Lunularic Acid", *Phytochemistry*, **1973**. 12: p. 2279-2282.
 29. Hauser, F.M. and R. Rhee, "Carboxylation of Dilithium ortho-Toluates", *Synthesis*, **1976**: p. 245-246.
 30. Huneck, S. and K. Schreiber, "Synthese der Lunularsäure", *Phytochemistry*, **1977**. 16: p. 1013-1016.
 31. Danishefsky, S.J. and T. Kitahara, "A Useful Diene for the Diels-Alder Reaktion", *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**. 96: p. 7807-7808.
 32. Chan, T.H. and P. Brownbridge, "Regio-Controlled Synthesis of Substituted Phenols", *Tetrahedron*, **1981**. 37: p. 387-391.
 33. Chan, T.-H. and P. Brownbridge, "Reaction of Electrophiles with 1,3-Bis(trimethylsiloxy)-1-methoxybuta-1,3-diene, a Dianion Equivalent of Methyl Acetoacetate", *J.C.S.Chem.Comm.*, **1979**: p. 578-579.
 34. Yamaguchi, M., K. Hasebe, and T. Minami, "A Biomimetic Synthesis of Polycyclic Polyoxygenated Aromatic Compounds Via Polyketides", *Tetrahedron Letters*, **1986**. 27: p. 2401-2404.
 35. Yamaguchi, M., M.U. Koichi Hasebe, Akme Irie , and T. Minami, "A Biomimetic Synthesis of Polycyclic Quinones", *Tetrahedron Letters*, **1987**. 28: p. 2017-2020.
 36. Yamaguchi, M., A.H. Tadashi Okuma, Chinatsu Ikeura , and T. Minami, "Total Synthesis of (-) Urdamycinone B through Polyketide Condensation", *J. Org. Chem.*, **1992**. 57: p. 1647-1649.
 37. Kramer, P.J., R. McDaniel, Robert JX Zawada, C Richard Hutchinson, David A Hopwood , and C. Khosla, "Rational Design and Engineered Biosynthesis of a Novel 18-Carbon Aromatic Polyketide", *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**. 119: p. 635-640.
 38. Fugmann, B., S.L. Fugmann, and W. Steglich, *Roempp-Lexikon Naturstoffe*, ed. J. Falbe and M. Regitz. 1997, Stuttgart, New York: Thieme. 735.

-
39. Hopwood, D.A., "Genetic Contributions to Understanding PKS", *Chemical Reviews*, **1997**. 97: p. 2400-2495.
 40. Tsoi, C. and C. Khosla, "Combinatorial biosynthesis of 'unnatural' natural products: the polyketide example", *Chemistry & Biology*, **1995**. 2: p. 355-362.
 41. Xue, Q., C.R. Hutchinson, G. Ashley, and D.V. Santi, "A multiplasmid approach to preparing large libraries of polyketides", *Proc. Natl. Acad. Sci*, **1999**. 96: p. 11740-11745.
 42. McDaniel, R., C. Gustafsson, Arinthip Thamchaipenet, Hong Fu, Melanie Betlach, Mary Betlach, and G. Ashley, "Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel 'unnatural' natural products", *Proc. Natl. Acad. Sci*, **1999**. 96: p. 1846-1851.
 43. Rex, J.M., M. Rinaldi, and M. Pfaller, "Resistance of *Candida* species to fluconazol", *Antimicrob. Agents Chemother*, **1995**. 39: p. 1-8.
 44. Beck-Sague, C.M., W.R. Jarvis, and N.N.I.S. System, "Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States", *J. Infect. Dis.*, **1993**. 167: p. 1247-1251.
 45. Gupte, T.E. and S.R. Naik, "Isolation, taxonomic and fermentation studies on a new strain of *Streptomyces arenae* var *ukrainiana* producing a tetraene antibiotic", *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **1999**. 15: p. 545-552.
 46. Ghannoum, M.A. and L.B. Rice, "Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of these Mechanisms with Bacterial Resistance", *Clin. Microbiol. Rev*, **1999**. 12: p. 501-514.
 47. Sanati, H., R.F. P. Belanger, and M. Ghannoum, "A new triazole, voriconazole (UK-109, 496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*", *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1997**. 41: p. 2492-2496.
 48. Kruijff, B.d. and R.A. Demel, "Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes", *Biochim. Biophys. Acta*, **1974**. 339: p. 57-70.

-
49. Wiebe, V.J. and M.W. DeGregorio, "Liposome-Encapsulated Amphotericin B: A Promising New Treatment for Disseminated Fungal Infections", *Reviews of Infectious Diseases*, **1988**. 10(6): p. 1097-1101.
 50. Davisson, J.W., JR. A.C.Finlay, F.W. Tanner, and I.A. Solomons, "Rimocidin, A New Antibiotic", *Antibiotics and Chemotherapy*, **1951**. 1: p. 289-290.
 51. Cope, C., U. Axen, and A.a.E.P. Burrows, "Rimocidin. II. Oxygenation Pattern of the Aglycone", *JACS*, **1966**. 88: p. 4221-4227.
 52. Pandey, R.C. and J. Kenneth L. Rinehart, "Polyene Antibiotics. VIII, Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Evidence for Cyclic Hemiketals in the Polyene Antibiotics Amphotericin B, Nystatin A1, Tetrin A, Tetrin B, Lucensomycin, and Pimaricin", *J. Antibiot*, **1976**. 29: p. 1035-1042.
 53. Sowinski, P., J. Pawlak, and E. Borowski, "Stereostructure of Rimocidin", *J. Antibiot.*, **1995**. 11: p. 1288-1291.
 54. Pawlak, J., J.G. J. Zielinski, J. Gumieniak , and E. Borowski, "The structure of lienomycin, a pentaene macrolide antitumor antibiotic. I. The structure of carbon skeleton and the location of functionalities", *J. Antibiot.*, **1980**. 33: p. 989-997.
 55. Czerwinski, A., P.S. W.A. Konig, and E. Borowski, "Amides of polyene macrolide aureofacin. Synthesis and biological properties", *J. Antibiot.*, **1987**. 40: p. 1023-1027.
 56. Radics, L. and M. Incze, "Tetramycin B, A New Polyene Macrolide Antibiotic. The Structure of Tetramycins A and B as Studied by High-Field NMR Spectroscopy", *Tetrahedron*, **1982**. 38(1): p. 183-189.
 57. Ceder, O., B. Hansson, and U. Rapp, "Pimaricin-VIII, Structural and Configurational Studies by Electron Impact and Field Desorption Mass Spectrometry, ¹³C (25.2 MHz) and ¹H (270 MHz)-NMR Spectroscopy", *Tetrahedron*, **1977**. 33: p. 2703-2714.
 58. Wolf, H. and H. Zähler, "Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen 99. Kirromycin", *Arch. Mikrobiol.*, **1972**. 83: p. 147-154.
 59. Carter, G.T., R.R.W. Mark Tischler, and A.E. Bailey, "Base-catalyzed Isomerism in Elfamycin Antibiotics; Structures of Ganefromycins ϵ and ϵ_1 ", *J. Antibiot.*, **1995**. 48(11): p. 1312-1320.

-
60. Galgiani, M.D.J.N. and M.S.M.A.G. M.S. Bartlett, M.Sc., Ph.D; A. Espinel-Ingroff, Ph.D.; M.V. Lancaster, Ph.D.; F.C. Odss, Ph.D.; M.A. Pfaller, M.D.; J.H. Rex, M.D.; M.G. Rinaldi, Ph.D.; T.J. Walsh, M.D., "Refernce Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard", **1997**. 17: p. 9-29.
 61. Thompson, J.F., C.J. Morris, and I.K. Smith, "New naturally occurring amino acids", *Annu. Rev. Biochem.*, **1969**. 38: p. 137-158.
 62. Hegarty, M.P., P.G. Schinkel, and R.D. Court, "Reaction of sheep to the consumption of *Leucaena glauca* Benth. and to its toxic principle mimosine", *Aust. J. Agric. Res.*, **1964**. 15: p. 153-167.
 63. Renz, J., "Ueber das Mimosin", *Zeitschrift fuer Physiol. Chemie*, **1936**. 244: p. 153 - 158.
 64. Bickel, A.F. and J.P. Wibaut, " The structure of leucenol (leucenine) from *Leucaena glauca* Benth", *Rec. Trav. Chim. Pay-bas*, **1946**. 65: p. 65-83.
 65. Brewbaker, J.L., *Leucaena leucocephala-a versatile nitrogen fixing tree*, in www.winrock.org/forestry/factpub/factsh/leucaena.html. 1997. p. 1-4.
 66. Garcia, G., F.N. TU. Ferguson, and K. Archibald, "The Nutritive Value and Forage Productivity of *Leucaena Leucocephala*", *Animal Feed Science & Technology*, **1996**. 60(1-2): p. 29-41.
 67. Middleton, C., *Leucaena for beef production in Queensland*, . 1995, Tropical Beef Centre: North Rockhampton. p. 1-4.
 68. Brewbaker, J.L. and C.T. Sorensson, *New Tree Crops from Interspecific Leucaena Hybrids*, in *Advances in new crops*, J.J.a.J.E. Simon, Editor. 1990, Timber Press: Portland, OR. p. 283-289.
 69. Harith, E.A.e., K.D.G. M. Szyszka, and U.t. Meulen, *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.*, **1987**. 57: p. 105-110.
 70. Allison, M.J., A.C. Hammond, and R.J. Jones, "Detection of Ruminal Bacteria that Degrade Toxic Dihydroxypyridine Compounds Produced from Mimosine", *Applied Enviromental Microbiology*, **1990**. 56(3): p. 590-594.
 71. Jones, R.R., *Agroforestry today*, **1991**. 2.
 72. Kamada, Y., H. Oku, N. Oshiro M. Miyagi, F. Hongo , and I. Chinen, "Osteopathy in broiler chicks fed toxic mimosine in *Leucaena leucocephala*", *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, **1998**. 62: p. 34-38.

-
73. Poma, A., S. Colafarina, G. Pacioni, and M. Miranda, "Effect of tyrosinase inhibitors on *Tuber borchii* mycelium growth in vitro", *FEMS Microbiology Letters*, **1999**. 180: p. 69-75.
 74. Hashiguchi, H. and H. Takahashi, "Inhibition of two Copper-Containing Enzymes, Tyrosinase and Dopamine β -Hydroxylase, by L-Mimosine", *Molecular Pharmacology*, **1977**. 13: p. 362-367.
 75. Grove, J.A., P.D. Ballata, and L.R. Hwang, J.D. Eastmo, "Studies on the metabolic effects of mimosine", *Nutr. Rep. Inter.*, **1978**. 17: p. 629-635.
 76. Tsvetkov, L.M., G.C. Russev, and B.B. Anachkova, "Effect of Mimosine on DNA Synthesis in Mammalian Cells", *Cancer Research*, **1997**. 57: p. 2252-2255.
 77. Hoffman, B.D., A. Flint, Hartmut M. Hanauske-Abel, and M. Lalande, "A New Class of Reversible Cell Cycle Inhibitors", *Cytometry*, **1991**. 12: p. 26-32.
 78. Watson, P.A., A. Flint, Hartmut H. Hanauske-Abel, and M. Lalande, "Mimosine Reversibly Arrests Cell Cycle Progression at the G1-S Phase Border", *Cytometry*, **1991**. 12: p. 242-246.
 79. Wen-Chun, H., *Study of enhancement of sensitivity of hepatoma and lung cancer cells to chemotherapeutic drugs by seeds of *Leucaena Glauca Benth.**, . 1999, Kaohsiung Medical College.
 80. Kulp, K. and P. Vulliet, "Mimosine Blocks Cell Cycle Progrssion by Chelating Iron in Asynchronous Human Breast Cancer Cells", *Toxicology & Applied Pharmacology*, **1996**. 139(2): p. 356-364.
 81. Andrus, L., R.W. Grady, P. Szabo, A.R. Hanauske, T. Huima-Byron, B. Slowinska, S. Zagulska , and H.M. Hanauske-Abel, "Antiretroviral effects of deoxyhypusyl hydroxylase inhibitors:a hypusine-dependent host cell mechanism for replication of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)", *Biochemical Pharmacology*, **1998**. 55: p. 1807-1818.
 82. Adams, R. and J.L. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1949**. 71: p. 705-708.
 83. Notation, A.D. and I.D. Spenser, "A synthesis of mimosine", *Can. J. Chem.*, **1962**. 40: p. 1374-1383.
 84. Stewart, F.H.C., *Aust. J. Chem.*, **1978**. 31: p. 1861.

-
85. Roblot, G., R. Wylder, Jean-Alain Fehrentz, and J. Martinez, "Synthesis of Peptide Derivatives of Mimosine I* L-Mimosylglycine", *Aust. J. Chem.*, **1996**. 49: p. 1345-1347.
 86. Yoshida, R., *A chemical and physiological study on the nature and properties of the toxic principle in Leucaena glauca (Kao haole)*, in *Ph.D Thesis*. 1944, University of Minnesota.
 87. Tangendjaja, B. and R.B.H. Wills, "Analysis of Mimosine and 3-hydroxy-4(1H)-pyridone by High-Performance Liquid Chromatography", *Journal of Chromatography*, **1980**. 202: p. 317-318.
 88. Hylin, J.W., "Biosynthesis of Mimosine", *Phytochemistry*, **1964**. 3: p. 161-164.
 89. Adams, R., S.J. Cristol, and A.A. Albert, "The structure of leucenol", *J. Am. Chem. Soc.*, **1945**. 67: p. 89-92.
 90. Schütte, H.R. and G. Seelig, *Z. Naturforsch.*, **1967**. 22B: p. 824-826.
 91. Kuo, M.S., S.A. Mizzak, D. A. Yurek, J. I. Cialdella, L. Baczynskyj and V.P. Marshall, "Biosynthesis of the Pipecolate Moiety of Marcfortine A", *J. Amer. Chem. Soc.*, **1999**. 121: p. 1763-1767.
 92. Tiwari, H.P., W.R. Penrose, and I.D. Spenser, "Biosynthesis of Mimosine: Incorporation of Serine and of α -Aminoadipic Acid", *Phytochemistry*, **1967**. 6: p. 1245-1248.
 93. Notation, A.D. and I.D. Spenser, "Biosynthesis of Mimosine, Incorporation of Aspartic Acid into the Pyridone Nucleus", *Canadian Journal of Biochemistry*, **1964**. 42: p. 1803-1808.
 94. Murakoshi, I., J.H. T. Kuramoto, and L. Fowden, "The Formation of S-Methylcysteine from Mimosine by *Leucaena* Seedling Extracts", *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **1970**. 41(4): p. 1009-1012.
 95. Saito, K., F.I. N. Kimura, and M. Noji, "Production of Plant Non-protein Amino Acids by Recombinant Enzymes of Sequential Reactions in Bacteria", *Biol. Pharm. Bull.*, **1997**. 20: p. 47-53.
 96. Murakoshi, I., F. Ikegami, and M. Kaneko, "Purification and Properties of Cysteine Synthase from *Spinacia Oleracea*", *Phytochemistry*, **1985**. 24(9): p. 1907-1911.

-
97. Ikegami, F., M.K. Masahiko Mizuno, and I. Murakoshi, "Enzymatic Synthesis of the Thyrotoxic Amino Acid Mimosine by Cysteine Synthase", *Phytochemistry*, **1990**. 29(11): p. 3461-3465.
 98. Tiwari, H.P. and I.D. Spenser, "Precursors of Mimosine in Mimosa Pudica", *Canadian Journal of Biochemistry*, **1965**. 43: p. 1687-1691.
 99. Saradhi, P.P. and A. Saradhi, "Production and Selection of Somaclonal Variants of *Leucaena Leucocephala* with High Carbon Dioxide Assimilating Potential", *Energy Convers. Mgmt.*, **1995**. 36: p. 759-762.
 100. Pierik, R.L.M., ed. *In Vitro Culture of Higher Plants*. . 1987, Martinus Nijhoff Publishers: Wageningen, The Netherlands. 321.
 101. Gamborg, O.L. and J.P. Shyluk, *Characteristics of Plant Cell and Tissue Culture*. Plant Tissue Culture, ed. T.A. Thorpe. 1981, Calgary, Alberta, Canada: Academic Press. 379.
 102. Normanly, J. and B. Bartel, "Redundancy as a way of life-IAA metabolism", *Current Opinion in Plant Biology*, **1999**. 2: p. 207-213.
 103. Pandey, S. and H.S.S. Astava, "Cytokinin and Nitrate Mediated Expansion of *Leucaena Leucocephala* Cotyledons", *Indian J. Plant Physiol.*, **1994**. 37(4).
 104. Schröder, F., "Induced Chemical Defense in Plants", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**. 37(9): p. 1213-1216.

Lebenslauf

Am 10.05.1970 wurde ich als erstes von zwei Kindern der Krankenschwester Christa Degenhardt geb. Perk und des Lehrers Jürgen Degenhardt in Kassel geboren.

Von August 1976 bis November 1976 besuchte ich die Grundschule in Fuldata Rothwesten und von Dezember 1976 bis August 1980 die Grundschule Fuldata Simmershausen. Anschliessend besuchte ich von August 1980 bis August 1986 die Gesamtschule Fuldata von der aus ich im Oktober 1986 auf das Friedrich List-Gymnasium wechselte, das ich im Juni 1989 mit der Allgemeinen Hochschulreife verliess.

Im Wintersemester 1989/1990 begann ich mit dem Studium der Chemie (Diplom) an der Georg-August-Universität Göttingen, wo ich im Mai 1994 mein Vordiplom ablegte. In der Zeit von Juli 1996 bis Mai 1997 fertigte ich unter Anleitung von Prof. Dr. J. Rohr meine Diplomarbeit mit dem Titel "Modellsynthesen zum Verständnis von Typ-2-Polyketidsynthasen: Intramolekulare Cyclisierungen und Oxidationen" an und bestand im Mai die Diplomprüfung.

Seit Juli 1997 arbeite ich unter Anleitung von Prof. Dr. J. Rohr an der vorliegenden Dissertation.