

**Struktur und Biosynthese von Collinolacton aus**  
*Streptomyces* sp.  
**und**  
**Beiträge zum Screening neuer Wirkstoffe**

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
**Luise Hoffmann**  
aus Berlin

Göttingen 2006

D 7

Referent: Prof. Dr. A. Zeeck

Korreferent: Prof. Dr. U. Diederichsen

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Mai 2006

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen von März 2003 bis April 2006 unter Anleitung von Prof. Dr. A. Zeeck und Dr. S. Grond durchgeführt.

Frau Dr. Stephanie Grond und Herrn Prof. Dr. Axel Zeeck danke ich für die interessante Themenstellung, das stete Interesse und viele wertvolle Diskussionen, die den Weg zu der vorliegenden Arbeit begleitet haben.



# INHALTSVERZEICHNIS

## A. THEORETISCHER TEIL

<b>I Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1. Die Quellen der Naturstoffe im Wandel der Zeit.....	1
2. Baeyer-Villiger-Monooxygenasen.....	7
3. Aufgabenstellung.....	15
<b>II Der neue Naturstoff Collinolacton aus <i>Streptomyces</i> sp.</b> .....	<b>17</b>
1. Streptomyceten als Collinolacton-Produzenten.....	17
2. Metabolitenspektrum der Stämme Tü 1892 und Gö 40/10.....	17
3. Optimierung der Kultivierungsbedingungen.....	22
4. Aufarbeitung und Isolierung.....	32
5. Spektroskopische Charakterisierung des Collinolactons (7).....	33
5.1. Auswertung der 1 D- und 2 D NMR-Spektren der Hauptkomponente.....	35
5.2. Strukturaufklärung der Minderkomponente des Collinolactons (7).....	39
5.3. Nachweis der Existenz von Collinolacton-Rotameren.....	43
<b>III Biosynthese des Collinolactons</b> .....	<b>49</b>
1. Allgemeines zur Polyketid-Biosynthese mikrobieller Sekundärstoffe.....	49
2. Fütterungsexperimente mit <sup>13</sup> C- und <sup>18</sup> O-markierten Vorläufern.....	53
2.1. Fermentationskurve.....	53
2.2. Fütterung von [1- <sup>13</sup> C]Acetat und [1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]Acetat <sup>[91]</sup> .....	55
2.3. Fütterung von [1- <sup>13</sup> C]Propionat <sup>[91]</sup> .....	57
2.4. Kultivierung in <sup>18</sup> O <sub>2</sub> -angereicherter Atmosphäre.....	59
3. Zusatz von Inhibitoren P <sub>450</sub> -abhängiger Monooxygenasen.....	62
4. Diskussion und Hypothese zur Biosynthese des Collinolactons (7).....	63
<b>IV Chemische Modifikationen des Collinolactons</b> .....	<b>69</b>
1. Reaktionen an C-4 des Collinolacton-Gerüsts.....	69
1.1. 4- <i>O</i> -Acetylcollinolacton (59).....	69
1.2. 4- <i>O</i> -Benzoylcollinolacton (60).....	70
1.3. 4- <i>O-p</i> -Brombenzoylcollinolacton (61).....	71

1.4. 4- <i>O</i> - <i>o</i> -Brombenzoylcollinolacton (62).....	72
2. Reaktionen an den Doppelbindungen des Collinolactons (7) .....	72
2.1. Epoxidierung mit <i>m</i> -CPBA zu 66 und 67 .....	72
2.2. Reduktion mit Pd/C und H <sub>2</sub> zum (6,7,8,9)-Tetrahydrocollinolacton (68) .....	82
3. Kristallisation der Derivate .....	85
4. Diskussion .....	85
<b>V Biologische Untersuchungen zum Collinolacton .....</b>	<b>90</b>
1. Molekularbiologische Arbeiten zum Stamm Gö 40/10.....	90
1.1. Hypothese zum Biosynthesegencluster des Collinolactons (7) .....	90
1.2. Kartierung von Cosmiden des Stammes Gö 40/10 .....	92
1.3. Literaturbekannte BVMO-Reaktionen.....	97
1.4. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	104
1.5. PCR mit abgeleiteten Primern.....	107
1.6. Diskussion und Ausblick.....	116
2. Biologische Aktivitäten des Collinolactons (7) und seiner Derivate (59 – 62, 66 – 68) .....	118
<b>VI 1-<i>O</i>-Benzoyl-<math>\alpha</math>-L-rhamnopyranosid aus <i>Streptomyces</i> Tü 3634 .....</b>	<b>125</b>
1. Verbindungsklasse der 1- <i>O</i> -Acylglykoside .....	125
2. Der Produzentstamm <i>Streptomyces griseoviridis</i> Tü 3634 .....	128
3. Charakterisierung des 1- <i>O</i> - $\alpha$ -L-Rhamnopyranosids (20).....	131
4. Die Biosynthese des 1- <i>O</i> -Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosids (20) .....	134
4.1. Bisherige Untersuchungen zur Biosynthese.....	134
4.2. Fütterungsexperiment mit [1,7- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]Shikimisäure.....	138
4.3. Diskussion .....	139
<b>VII Screening von extremophilen Mikroorganismen .....</b>	<b>141</b>
1. Projektbeschreibung .....	141
2. Screening der extremophilen Mikroorganismen .....	143
3. <i>Streptomyces thermonitrificans</i> Stamm 3-008 .....	148
4. <i>Saccharomonospora</i> sp. Stamm 3-009.....	152
5. <i>Streptomyces thermoviolaceus</i> Stamm 3-006 .....	156
6. Diskussion und Ausblick.....	156

## **VIII Zusammenfassung der Ergebnisse..... 159**

1. Strukturzuordnung und Biosynthese des Collinolactons (7)..... 159
2. Derivatisierungen des Collinolactons (59 – 62, 66 – 68)..... 160
3. Molekularbiologische Untersuchungen zum Collinolacton (7)..... 161
4. Cytotoxische Aktivität der Collinolacton-Familie ..... 162
5. Beiträge zur Biosynthese des 1-*O*-Benzoylrhamnopyranosids..... 162
6. Sekundärmetabolite aus extremophilen Mikroorganismen..... 163

## **IX Ausblick ..... 165**

1. Collinolacton (7) ..... 165
2. Chemisches Screening mit extremophilen Mikroorganismen ..... 166

## **B. EXPERIMENTELLER TEIL**

### **X Allgemeines ..... 167**

1. Instrumentelle Analytik..... 167
2. Chromatographie..... 168
3. Mikrobiologische Methoden und Geräte..... 170
4. Molekularbiologische Methoden und Geräte..... 172

### **XI Collinolacton aus *Streptomyces* sp. Gö 40/10 und Tü 1892 ..... 174**

1. Stammhaltung..... 174
2. Standardkultivierung ..... 174
3. Variation der Kultivierungsbedingungen zur Ausbeutesteigerung ..... 175
4. Standardaufarbeitung ..... 177
5. Charakterisierung des Metaboliten..... 179
6. Biosyntheseuntersuchung unter <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-Atmosphäre..... 181

### **XII Derivatisierungen von Collinolacton ..... 183**

1. 4-*O*-Acetylcollinolacton (59) ..... 183
2. 4-*O*-Benzoylcollinolacton (60) ..... 185
3. 4-*O-p*-Brombenzoylcollinolacton (61)..... 188
4. 4-*O-o*-Brombenzoylcollinolacton (62)..... 191

5. 14-Methylen-6,7-epoxy-15-hydroxycollinolacton (66) .....	193
6. 6,7;8,9;14,19-Triepoxy-15-hydroxycollinolacton (67) .....	195
7. 6,7,8,9-Tetrahydrocollinolacton (68) .....	196
<b>XIII Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>197</b>
1. Kartierung von Cosmiden des Stammes Gö 40/10 .....	197
2. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (DH10 $\alpha$ ) für die Transformation .....	201
3. Transformation .....	202
4. PCR-Versuche zur Baeyer-Villiger-Monooxygenase .....	202
<b>XIV Biologische Aktivität .....</b>	<b>206</b>
1. Plattendiffusionstest .....	206
2. Cytotoxizitätsuntersuchungen .....	206
3. Mikrotubulistabilitätsuntersuchungen .....	207
<b>XV 1-O-Benzoyl-<math>\alpha</math>-L-rhamnosid aus <i>Streptomyces</i> sp. Tü 3634 .....</b>	<b>208</b>
1. Stammhaltung .....	208
2. Flüssigkultivierung .....	208
3. Versuche zur Ausbeutesteigerung .....	210
4. Beschreibung des Fütterungsexperiments .....	210
5. Charakterisierung des Metaboliten .....	211
<b>XVI Sekundärmetabolite aus extremophilen Mikroorganismen .....</b>	<b>212</b>
1. Stammhaltung und Langzeitkonservierung .....	212
2. Durchführung des chemisch biologischen Screenings .....	212
3. Aufarbeitung von Fermentationsansätzen .....	213
4. <i>Streptomyces termonitrificans</i> Stamm 3-008 .....	213
5. <i>Saccharomonospora</i> sp. Stamm 3-009 .....	215
6. Biologische Aktivität .....	217
<b>C. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>219</b>

---

# A. THEORETISCHER TEIL

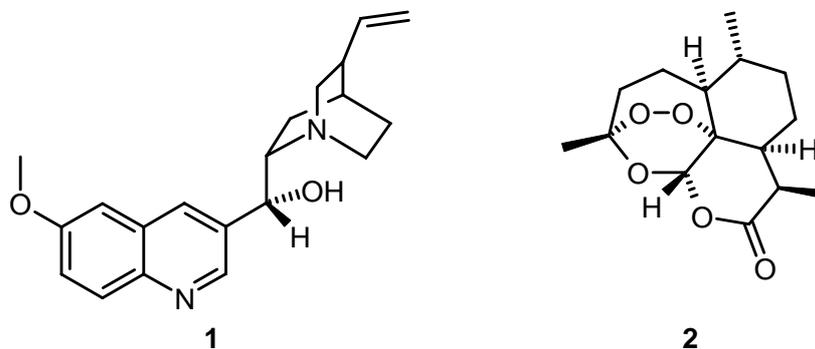
## I Einleitung

### 1. Die Quellen der Naturstoffe im Wandel der Zeit

#### 1.1. Bedarf von Naturstoffen als Wirkstoffe

Naturstoffe stellen für die medizinische Chemie aus vielerlei Hinsicht eine interessante Quelle für die Wirkstoffsuche dar. Ihre biologische Aktivität macht sie häufig zu wertvollen Medikamenten zur Bekämpfung verschiedener Krankheiten.<sup>[1]</sup> Da heute von mehr als 30000 bekannten Krankheitsbildern nur etwa ein Drittel symptomatisch und nur wenige ursächlich behandelt werden können, steht die Suche nach Leitstrukturen für die Entwicklung von neuen, hochwirksamen Medikamenten im Mittelpunkt des Interesses pharmazeutischer Unternehmen. Das bedeutet, dass chemische Verbindungen mit neuen Strukturen für ausgewählte biologische Wirkungen entdeckt werden müssen. Eine Strategie, um an interessante Substanzen zu gelangen ist das Molecular Modelling. Hierbei wird die Beschaffenheit der identifizierten Angriffspunkte im Zielmolekül mit Computern berechnet und daraus die Struktur eines optimalen Wirkstoffes abgeleitet. Diese Technik befindet sich noch in den Anfängen. Als besonders schwierig erweist sich dabei trotz bekannter Konstitutionen z. B. eines Proteins die Ermittlung der tatsächlichen Konformation in der natürlichen Umgebung innerhalb der Zelle. Eine weitere Methode zur Auffindung neuer Wirkstoffe ist die Kombinatorische Synthese.<sup>[2]</sup> Bei dieser Methode werden systematisch geeignete Edukte zur Reaktion gebracht und das Produktgemisch anschließend entsprechenden High-Throughput-Screening-Verfahren (HTS) zur biologischen Austestung zugeführt. Auch wenn diese Verfahren durch Automatisierung und Miniaturisierung eine Vielfalt an potentiell biologisch aktiven Substanzen für die pharmazeutische Industrie hervorbringt, ist der Kosten- und Zeitfaktor nicht zu vernachlässigen. Zusätzlich bleiben aufgrund der eingeschränkten Variationsmöglichkeiten die strukturelle Diversität und Komplexität der Produkte<sup>[3]</sup> hinter den von Naturstoffen deutlich zurück, woraus letztendlich ein verringertes Wirkspektrum resultiert. Mit dieser Methode ist bisher kein Durchbruch in der Arzneimittelforschung erzielt worden. Von der Kombinatorischen Chemie in den letzten Jahren zurückgedrängt erleben Naturstoffe derzeit eine Renaissance. In einem statistischen Vergleich der strukturellen Eigenschaften von synthetischen und natürlichen Substanzen kommen T. HENKEL et al. zu dem Ergebnis, dass Naturstoffe häufiger komplexe

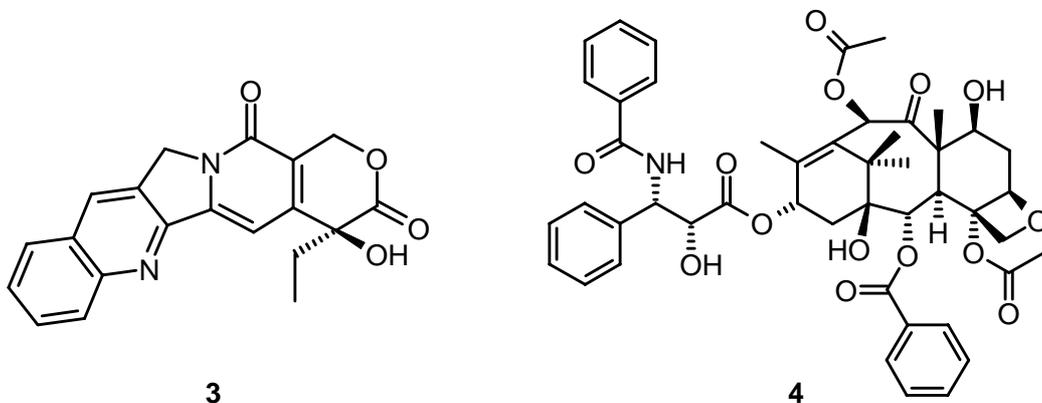
Strukturelemente aufweisen, von denen 40% in Syntheseprodukten gar nicht vorkommen.<sup>[4]</sup> Daher überrascht es nicht, dass 60% der kommerziell vertriebenen oder sich in letzter klinischer Testphase befindenden Antitumormittel und Antibiotika natürlichen Ursprungs sind.<sup>[5]</sup> Meist wird aber erst durch das Zusammenspiel von Synthese- und Naturstoffchemie ein optimaler Wirkstoff hervorgebracht: So konnte z. B. mittels Derivatisierung die Wasserlöslichkeit und damit auch die Effektivität der synergistisch wirkenden Antibiotika Pristinamycin und Virginiamycin erhöht werden.<sup>[6,7]</sup> Beide wurden aus terrestrischen Streptomyceten isoliert. Diese sporenbildenden Bakterien gehören zu den Actinomyceten, die sich neben Pilzen als besonders geeignete Quelle für komplexe Naturstoffe erwiesen haben. Bereits seit Jahrtausenden werden Heilpflanzen mit ihren natürlichen Wirkstoffen vom Menschen z. B. in der traditionellen Chinesischen Medizin zur Therapie von Krankheiten eingesetzt. Die Weidenrinde mit dem Inhaltsstoff Salicylsäure ist durch den Einsatz bei Erkältung und Grippe, die mit Fieber, Kopf- und Gelenkschmerzen einhergehen, bekannt. Chinarinde (Chinin (**1**)) und der chinesische Beifuss (Artemisin (**2**)) wurden in der traditionellen Chinesischen Medizin als Antimalariamittel eingesetzt (Abbildung 1).<sup>[5]</sup>



**Abbildung 1:** Strukturen von Chinin (**1**) und Artemisin (**2**).

Mikrobielle Stoffwechselprodukte rückten erst in den Mittelpunkt des Interesses, als der schottische Bakteriologe A. FLEMING 1928 die wachstumshemmende Wirkung des Pilzes *Penicillium notatum* auf Staphylokokken entdeckte.<sup>[8]</sup> 1940 gelang erstmals die Isolierung des für die Wirkung verantwortlichen Penicillins G. Nach S. A. WAKSMAN bezeichnete man Penicillin als Antibiotikum, weil es ein mikrobielles niedermolekulares Stoffwechselprodukt ist, das in niedrigen Konzentrationen das Wachstum anderer Mikroorganismen hemmt, ohne den Produzenten selbst zu schädigen.<sup>[9]</sup> 1952 wurden die Makrolidantibiotika mit ihrem bekanntesten Vertreter dem Erythromycin aus Streptomyceten (Bakterien) entdeckt. Durch den Einsatz von Antibiotika wurden alle Arten von Infektionen behandelbar. Doch aufgrund

der spezifischen Resistenz, die jede Mikroorganismen-Gattung gegenüber bestimmten antibiotischen Wirkstoffklassen hat, beobachtete man, dass Mikroorganismen eine Widerstandskraft innerhalb kurzer Zeit erwerben können.<sup>[10]</sup> Der große Bedarf an neuen Naturstoffen ist nicht nur erklärlich aus dem Bedarf bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten. Es hat sich gezeigt, dass Naturstoffe sowohl aus Pflanzen als auch aus Mikroorganismen auch in anderen Bereichen Wirkung zeigen, die einen hohen therapeutischen Wert haben. Neben Camptothecin (**3**) ist Taxol (**4**), das aus der Rinde der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isoliert wurde, eines der vielversprechendsten Zytostatika der letzten 20 Jahre.<sup>[11]</sup> Es hat bereits gute Therapieerfolge für fortgeschrittene Eileiterkarzinome und maligne Melanome gezeigt. Die Transplantationsmedizin konnte erst Erfolge verzeichnen, nachdem Substanzen mit immunsuppressiver Wirkung wie Cyclosporin oder FK 506, die die Abstoßung transplantiert Organe unterdrücken, zur Verfügung standen. Mit dem Fortschritt in der Medizin werden immer spezifischere, hoch wirksame Naturstoffe gesucht, die als Leitstrukturen dienen können. Zum einen wird die Suche auf neue Habitate ausgedehnt (Meer, extremophile Standorte), zum anderen kann mit Hilfe der Genomforschung neue Wirkstoffe modelliert werden (Metagenom)<sup>[12]</sup>.



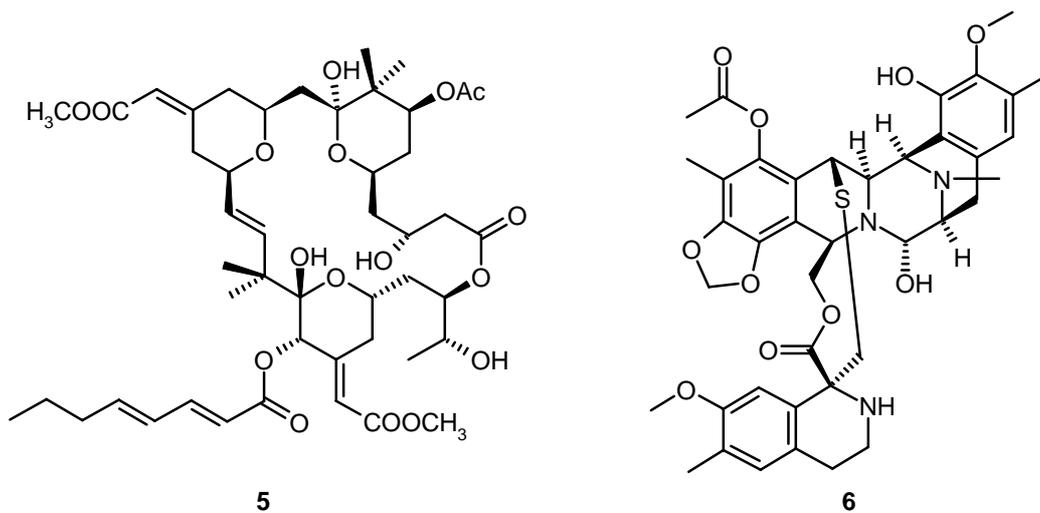
**Abbildung 2:** Camptothecin (**3**) und Taxol (**4**) zwei Sekundärmetabolite terrestrischer Naturstoffquellen.

## 1.2. Marine Habitate als Naturstoff-Lieferanten

In den letzten Jahren richtete sich die Naturstoffforschung verstärkt auf die Nutzung mariner Ressourcen als Quelle für neue Wirkstoffe. In mariner Umgebung findet man eine größere Artenvielfalt als im terrestrischen Bereich. Das Meer bedeckt 71% der Erdoberfläche und weist sehr unterschiedliche Lebensräume auf, die unter anderem von der Temperatur, Tiefe und Strömung abhängen. Im marinen Habitat sind wirbellose Tiere (Invertebraten) wie

Korallen, Schwämme, Tunikate oder Moostierchen die bedeutendsten Naturstofflieferanten. Die wirbellosen marinen Organismen leben in komplexen, bis heute kaum verstandenen Lebensgemeinschaften, unter Beteiligung diverser Mikroorganismen, die zum Teil einen beträchtlichen Anteil der Biomasse ihrer Wirte ausmachen können. Daher ist die Vermutung naheliegend, dass solche assoziiert lebenden Mikroorganismen durch eigenständige Biosyntheseleistungen zum Metabolitenspektrum des gesamten Organismus beitragen.<sup>[13]</sup>

Marine Naturstoffe zeichnen sich durch ungewöhnliche funktionelle Gruppen aus, insbesondere durch die Substitution mit den Halogenen Chlor und Brom. Weiterhin sind komplexe Heterocyklen, Ringsysteme und Terpenoide weit verbreitet. Zurzeit befinden sich die vier marinen Naturstoffe Bryostatin-1 (**5**), Halichondrin B, Didemnin B und Ecteinascidin 743 (**6**)<sup>[14]</sup> (Abbildung 3) als Antitumormittel in klinischer Prüfung. Bryostatin-1 (**5**) zum Beispiel wird zurzeit in 50 verschiedenen klinischen Studien zur Behandlung von Melanomen, Leukämie, sowie Brust- und Lungenkarzinomen untersucht.<sup>[15]</sup>



**Abbildung 3:** Bryostatin-1 (**5**) und Ecteinascidin 743 (**6**) zwei Vertreter mariner Naturstoffe mit Antitumorwirkung.

Bryostatin-1 (**5**) ist einer der bekanntesten Vertreter mariner Naturstoffe und wurde aus dem Moostierchen *Bugula neritina* isoliert. Es ist ein makrocyclisches Lacton, das an die Proteinkinase C bindet.<sup>[16,17]</sup> Mittlerweile sind mehr als 20 verschiedene Bryostatine aus dem Produzenten bekannt, die sich lediglich in den Säureresten unterscheiden. In der Mehrzahl der Fälle ist die Beschaffung ausreichender Substanzmengen mariner Naturstoffe mit enormen Schwierigkeiten verbunden. Um ein Milligramm Substanz zu isolieren, werden 500 – 1000 kg Bryozoen benötigt. Die komplexe Struktur des Naturstoffs verhindert einen ökonomisch

vertretbaren Zugang durch Totalsynthese. Inzwischen ist die Biotechnologie-Firma *CalBioMarine Technologies/USA* dabei, Kolonien von *B. neritina* in 5000 L Tanks zu kultivieren, um den Substanznachschub zu sichern und keine ökologischen Systeme zu zerstören. Zurzeit werden Struktur-Wirkungsbeziehungen an vereinfachten Bryostatin-Analoga durchgeführt.<sup>[18]</sup>

Auch im marinen Habitat sind ca. 70% Mikroorganismen am Aufbau von Sekundärmetaboliten beteiligt. Aufgrund ihrer metabolischen Vielfalt, der kurzen Generationszeit und der schnellen Anpassung an veränderte Umweltbedingungen (Salzkonzentration, Symbiosen), sind Prokaryonten eine bis heute interessante Quelle bei der Naturstoffsuche.

### 1.3. Extremophile Organismen für die Biotechnologie

Vor diesem Hintergrund geht der Trend in den letzten Jahren dahin, neue, extreme Habitate zu erschließen. Mikroorganismen befinden sich auch in extremen Biotopen, z. B. wachsen sie bei Temperaturen von über 100°C, bei einem Salzgehalt von bis zu 30% und bei pH-Werten zwischen eins und drei sowie zwölf und vierzehn. Es gelang Extremophile aus kontinentalen und submarinen Vulkangebieten, heißen Solfatarenfeldern, alkalischen Seen, Salzseen, kalten Regionen oder extrem basischen oder sauren Habitaten zu isolieren. Viele dieser Organismen gehören phylogenetisch zu den *Archaea*. Bis heute sind etwa 40 Arten hyperthermophiler (> 85°C optimale Wachstumstemperatur) *Archaea* und *Bacteria* bekannt.<sup>[19]</sup> Die Mikroorganismen werden heute nicht nur isoliert, um nach neuen Naturstoffen zu suchen, sondern auch um Enzyme zu finden, die für eine Anwendung als Biokatalysator in der Biotechnologie geeignet sind (Weiße Biotechnologie). Gegenüber konventionellen chemischen Verfahren besitzen welche mit Enzymen deutliche Vorteile z. B. bezüglich der Stereo- oder Regiospezifität. Allerdings setzen die fehlende Stabilität von Enzymen sowie ihre pH- und Wasserabhängigkeit der industriellen Nutzung Grenzen. Deshalb sind die außergewöhnlichen Eigenschaften mancher Enzyme aus Thermophilen für biotechnologische Anwendungen besonders interessant. Im Vergleich zu mesophilen Organismen, die bei moderaten Temperaturen leben, sind die essentiellen Zellkomponenten hyperthermophiler Organismen wie z. B. Proteine und Nukleinsäuren extrem stabil. So weisen sie neben extremer Thermostabilität zum Teil auch Toleranz gegenüber Detergenzien und organischen Lösungsmitteln auf. Der Einsatz von Biokatalysatoren bleibt somit nicht auf wässrige Systeme und milde Temperaturen beschränkt.

---

Eine große Anzahl extremthermophiler (65 - 85°C) und hyperthermophiler (> 85°C) *Archaea* und *Bacteria* ist in der Lage, Kohlenhydrate wie Pektin und Cellulose, Lipide und Proteine als Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen. Zur Verstoffwechslung dieser Substrate vermögen die Organismen extrem hitzestabile, extrazelluläre bzw. intrazelluläre Enzyme zu synthetisieren, die industriell als Biokatalysatoren von Interesse sind. Einige hitzestabile Enzyme aus extremophilen Mikroorganismen wurden in den letzten fünf Jahren angereichert und näher untersucht. So konnten z. B. Amylasen und Xylanasen gereinigt<sup>[20]</sup> und im Hinblick auf ihre Funktion, Substratspezifität und dreidimensionale Struktur untersucht werden. Einige dieser Enzyme weisen katalytische Aktivitäten bei Temperaturen bis zu 130°C und hohem Druck auf.

Zu den industriell interessanten Enzymen gehören auch die Proteasen. Es konnten hitzestabile Proteasen in extremthermophilen Bakterien der Ordnung *Thermotogales* nachgewiesen werden. Die Enzyme sind bei Temperaturen zwischen 50 und 110°C und pH- Werten zwischen 4 und 12 aktiv. Solche Proteasen finden als Waschmittelzusatz und in anderen Reinigungsmitteln Anwendung.

Bedeutsam sind auch die DNA-Polymerasen, ohne die die bahnbrechenden Erfolge der Genetik der letzten 25 Jahre undenkbar wären. DNA-Polymerasen sind Enzyme, die bei der Vervielfältigung des genetischen Materials (DNA) benötigt werden. In den letzten Jahren wurde eine Anzahl thermostabiler DNA-Polymerasen charakterisiert, aus *Thermococcus aggregans* findet ein Enzym (*Taq*), welches beim Ablesen der DNA eine besonders geringe Fehlerrate aufweist, Anwendung. Thermostabile DNA-Polymerasen werden heute bei der Polymerase Kettenreaktion (PCR) eingesetzt.<sup>[21]</sup>

Weitere Anwendungsbeispiele für Biokatalysatoren sind aus der Stärke-, Textil-, Zellstoff-, Papierindustrie und Umwelttechnik bekannt.<sup>[22]</sup>

Mit den Neuerungen in der Technik, hat die pharmazeutische Forschung eine gewaltige Umstrukturierung erfahren. Durch das Scheitern rein synthetischer Ansätze bei der Wirkstoffsuche zeichnet sich deutlich ab, dass die Zukunft der Pharmaindustrie von der Etablierung neuer Leitstrukturen aus der Natur abhängt. So wird es ein wichtiges Ziel sein, das Potential der Natur besser nutzbar zu machen. Derzeit gelten mehr als 95% aller Mikroorganismen als noch nicht kultivierbar<sup>[23]</sup> und nur 1 – 10% der kultivierbaren Mikroorganismen sind auf ihre Sekundärstoffproduktion hin untersucht.<sup>[24]</sup> Neben dem Rückgriff auf seltene Mikroorganismen oder marine Organismen eröffnet auch die intensive Erforschung einzelner Bakterienstämme Wege zu interessanten neuen Naturstoffen. Die vorliegende Arbeit gibt mit dem bakteriellen Sekundärstoff Collinolacton (7) ein Beispiel für

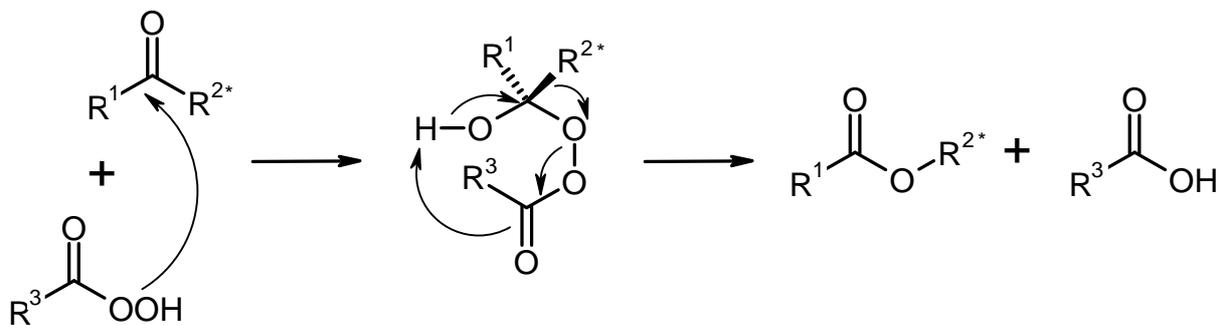
die Stärken dieses Ansatzes, da es bei geringer Molmasse (360 g/mol) eine neuartige polyzyklische Grundstruktur aufweist, die zur Untersuchung der Chemie und Biosynthese einlädt. Dies Molekül könnte sich zu einer interessanten Leitstruktur in der Pharmaforschung entwickeln.

## 2. Baeyer-Villiger-Monooxygenasen

Oxygenasen sind Enzyme, die reduktiv Sauerstoff aktivieren und diesen in Substrate einbauen. Sie werden in Mono- und Dioxygenasen eingeteilt, je nachdem, ob ein oder zwei Atome des molekularen Sauerstoffs in das Substrat eingehen.

### 2.1. Baeyer-Villiger-Oxidation

Im Jahr 1899 entdeckten A. VON BAEYER und V. VILLIGER die chemisch-synthetische Umwandlung von Ketonen in Ester oder cyclischen Ketonen in Lactone.<sup>[25]</sup> In diesen Reaktionen wird das Carbonyl-C-Atom von einer Peroxysäure nukleophil angegriffen (Abbildung 4). Es bildet sich das tetraedrische, so genannte Criegee-Intermediat.<sup>[26]</sup> Diese instabile Verbindung unterliegt einer Umlagerung, bei der die Carbonsäure abgespalten wird. Es bilden sich Ester und Säure.



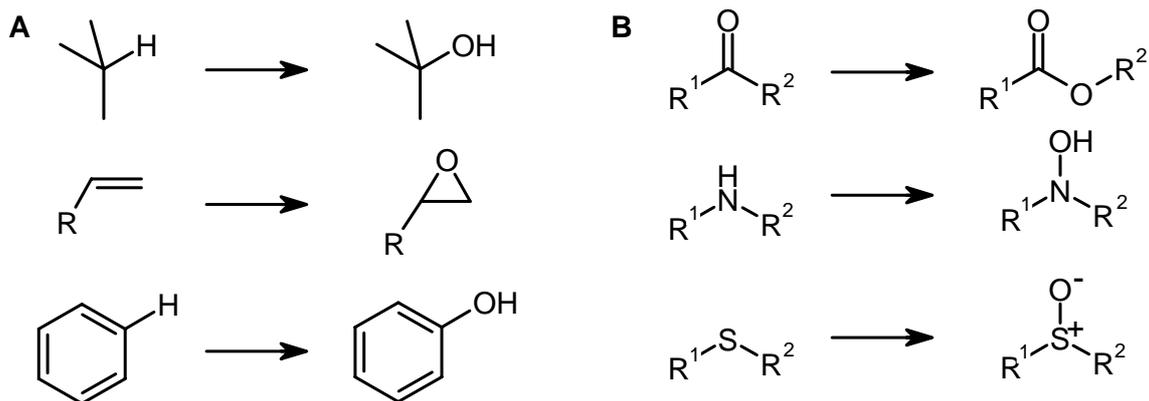
**Abbildung 4:** Mechanismus der Baeyer-Villiger-Oxidation von Ketonen zu Estern. Die Reaktion verläuft nach einem konzertierten Mechanismus, so dass die Stereochemie am wandernden Kohlenstoffatom von  $R^2$  erhalten bleibt ( $R^{2*}$  = chiraler Substituent).

Im Allgemeinen wandert der am höchsten substituierte Rest und zwar unter Retention der Konfiguration am direkt involvierten C-Atom. Sterische, konformationelle und elektronische Faktoren haben einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Umlagerung und auf die Wanderungstendenz.<sup>[27]</sup> Auch die Art der Peroxysäure beeinflusst die Wanderungstendenz.

Diese Merkmale machen die Baeyer-Villiger-Reaktion zu einem äußerst interessanten Werkzeug für die Synthese von Lactonen und Estern. Ebenso macht sich die Natur diese Reaktion unter Einsatz von Enzymen zu Nutze.

## 2.2. Monooxygenasen

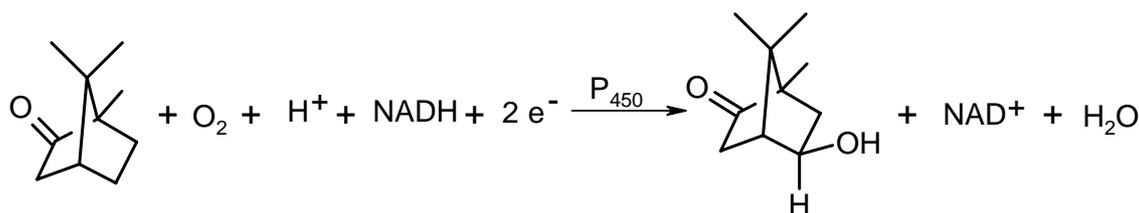
Monooxygenasen katalysieren eine Vielzahl von Oxidationsreaktionen: Hydroxylierung von aliphatischen oder aromatischen Substraten, Epoxidierung von Alkenen, Heteroatom-Oxidationen und Baeyer-Villiger-Transformation. Der Oxidationstyp hängt im Allgemeinen von der prosthetischen Gruppe innerhalb des betreffenden Enzyms ab; Hydroxylierungen und Epoxidierungen werden durch metallabhängige Monooxygenasen vom Typ Cytochrom P<sub>450</sub> katalysiert,<sup>[28]</sup> wohingegen Heteroatom- und Baeyer-Villiger-Oxidationen Flavin-abhängige Enzyme benötigen.



**Abbildung 5:** Reaktionen, die von P<sub>450</sub>-abhängigen (A), sowie Flavin-abhängigen (B) Monooxygenasen katalysiert werden.

Monooxygenasen bauen aus molekularem Sauerstoff O<sub>2</sub> ein Sauerstoffatom in das Substrat ein, während aus dem zweiten Sauerstoffatom Wasser entsteht. Die Sauerstoffaktivierung geschieht bei allen Monooxygenasen auf gleiche Art und Weise: Sauerstoff wird reduktiv durch Elektronen eines Donors (NADH oder NADPH) aktiviert. Die Erzeugung der eigentlich aktiven, sauerstoffübertragenden Spezies wird bei den Monooxygenasen unter Beteiligung von Redoxmediatoren bewerkstelligt, die zu Zweielektronenübertragungen fähig sind. Dies sind Übergangsmetalle (Fe, Cu) oder gebundene organische Cofaktoren (Pteridine und Flavine).<sup>[29]</sup> Die Bildung von Oxometallverbindungen oder anderen oxidierten Intermediaten

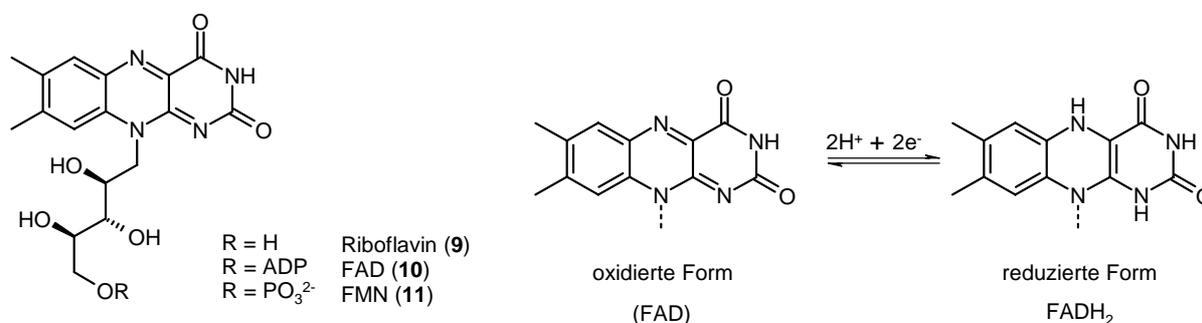
wird durch die sukzessive Übertragung von insgesamt zwei Elektronen auf O<sub>2</sub> möglich. In Abbildung 6 ist die Gesamtreaktion exemplarisch an der Campherhydroxylierung dargestellt.



**Abbildung 6:** Grundgleichung für Monooxygenasen am Beispiel der Campherhydroxylierung mittels einer P<sub>450</sub>-Monooxygenase aus *Pseudomonas putida*.

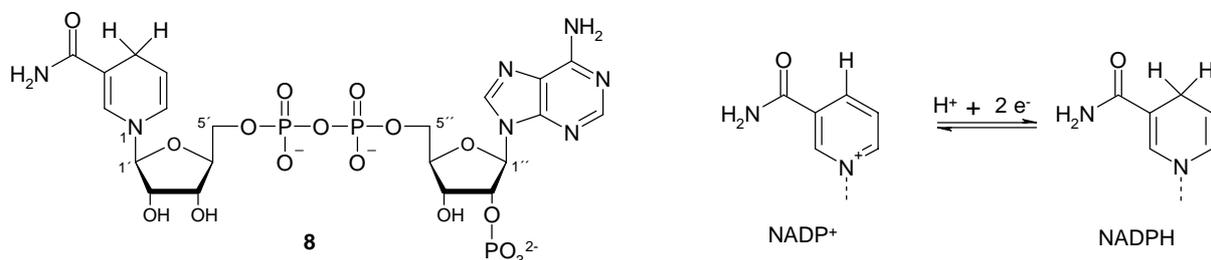
### 2.3. Baeyer-Villiger-Monooxygenasen

Die Biotransformation von Steroiden in Pilzen, welche als erstes Beispiel einer biologischen Baeyer-Villiger-Reaktion gilt, wurde 1948 von G. E. TURFITT entdeckt.<sup>[30]</sup> Seither wurden Baeyer-Villiger-Oxidationsschritte in biosynthetischen Abläufen, wie der Aflatoxinbiosynthese in Pilzen, der Synthese von Iridoiden und Steroiden in Pflanzen, und der Toxinsynthese in Schalentieren gefunden. Baeyer-Villiger-Oxidationsschritte werden häufig in mikrobiologischen Abbauprozessen angetroffen. So nutzen Mikroorganismen Baeyer-Villiger-Monooxygenasen (BVMO), um in Gegenwart von aliphatischen Methylketonen, alicyclischen Kohlenwasserstoffen, aromatischen Verbindungen und Terpenen wachsen zu können. Alle heute bekannten bakteriellen BVMOs sind NADPH- (8) oder NADH-abhängige Flavoproteine. In Abbildung 7 (links) sind die coenzymatisch aktiven Formen von Riboflavin (9), Flavinadenindinukleotid (10) (FAD) (= 5'-ADP-Ester des Riboflavins) und dessen 5'-Phosphat (11) (FMN) dargestellt.



**Abbildung 7:** Riboflavin (9) und seine coenzymatisch aktiven Formen (10, 11). Redoxgleichung von FAD/FADH<sub>2</sub> (rechts). Als Abkürzung für die oxidierte und reduzierte Form verwendet man die Symbole FAD und FADH<sub>2</sub>.

FAD (**10**) und FMN (**11**) sind die Coenzyme in Flavin-abhängigen Monooxygenasen. Sie sind fest, aber meist nicht-kovalent an das aktive Zentrum gebunden. Ihr reaktiver Teil, der Isoalloxazinring, dient als Elektronen-Carrier (Abbildung 7, rechts). Dieser kann zwei Elektronen und zwei Protonen aufnehmen. Das BVMO-gebundene Flavin-Coenzym kann nur in seiner reduzierten Form molekularen Sauerstoff aktivieren. Die zur Reduktion von FAD (**10**) bzw. FMN (**11**) benötigten Reduktionsäquivalente werden von NADPH (**8**) bzw. NADH bereitgestellt (Abbildung 7). Im Gegensatz zum Flavin fungiert das Nicotinamid-System ausschließlich als Hydridakzeptor bzw. -donor.



**Abbildung 8:** Strukturformel von NADPH (**8**) mit der dazugehörigen Redoxgleichung (rechts).

Die Baeyer-Villiger-Monooxygenasen können in zwei Gruppen unterteilt werden:

Typ I BVMOs enthalten Flavinadenindinukleotid (**10**) (FAD) als Coenzym, benutzen NADPH (**8**) als Elektronenquelle und bestehen aus identischen Untereinheiten.

Typ II BVMOs nutzen Flavinmononukleotid (**11**) (FMN) als Coenzym, NADH als Elektronendonator und bestehen aus  $\alpha_2\beta$ -Trimeren. Typ II BVMOs wurden bisher nicht kloniert, ihre Gene nicht isoliert und nicht sequenziert. Somit konnten sie molekularbiologisch bislang nicht untersucht werden.

An Typ I BVMOs hatten molekularbiologische Arbeiten schon Kontroversen über deren konservierte Regionen zur Folge, d. h. welche Gensequenz spezifisch für die BVMO codiert.<sup>[31]</sup> Es gibt zwei unterschiedliche Forschungsansätze, die sich in der Anwendung und Herkunft der BVMOs unterscheiden.

- 1) Enzyme aus katabolischen Reaktionen werden zur Anwendung in der organischen Synthese, z. B. der Umsetzung kleiner organischer Moleküle zum oxidierten Produkt genutzt. Zum anderen beschäftigen sie sich mit der mechanistischen Untersuchung der Baeyer-Villiger-Oxidation. Somit sind sie die „BVMOs der organischen Synthese“

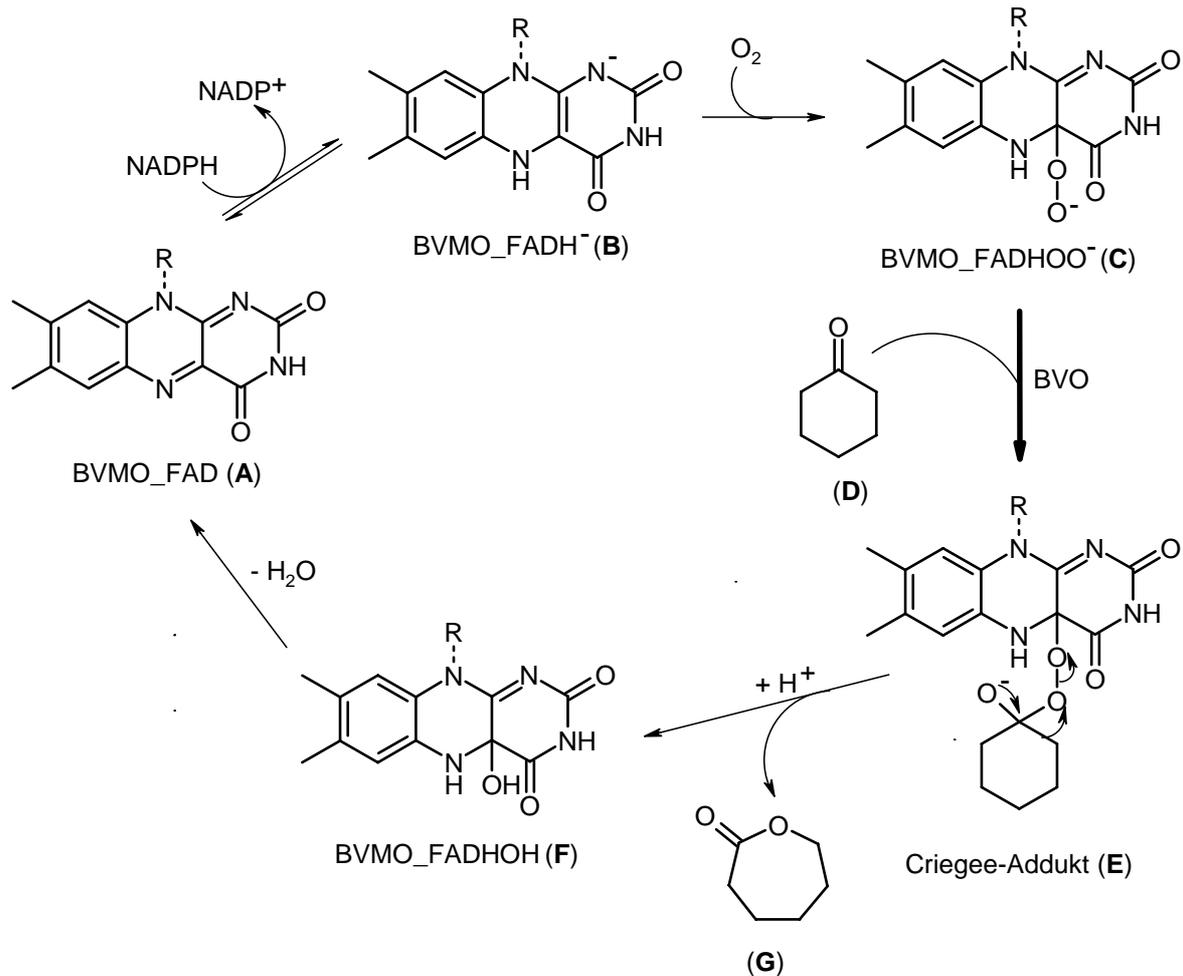
- 2) Enzymaktivitäten aus anabolischen Reaktionen, die eingehend untersucht wurden, sind vor allem solche aus Biosynthesewegen pilzlicher und bakterieller Sekundärstoffe. Besonders für Sekundärstoffe aus Streptomycceten sind wegen der gut etablierten genetischen Methoden einige BVMOs aufgrund von Sequenzhomologien postuliert worden. Das sind die „*BVMOs der Sekundärstoffe*“

Aus detaillierten Studien zu den „*BVMOs der organischen Synthese*“ ist bislang hervorgegangen, dass es ein Sequenzmotiv gibt, das für Dinukleotid-bindende Domänen im Protein codiert. Diese Sequenz wird Rossmann-Schleife genannt und beinhaltet das Motiv GxGxxG, das für die Bindung des ADP-Restes von FAD (**10**) und NADPH (**8**) verantwortlich ist.<sup>[31,32]</sup>

J. ROHR und Mitarbeiter beschäftigen sich vornehmlich molekularbiologisch mit den „*BVMOs der Sekundärstoffe*“, vor allem mit Sequenzen aus Streptomycceten. Sie schlagen für den Adenosin-bindenden Teil des FADs (**10**) ebenfalls das Rossmann-Motiv vor, stellen aber weitere konservierte Regionen heraus, wie beispielsweise eine Asparaginsäure, die fünf Aminosäuren *N*-terminal vor der Rossmann-Schleife lokalisiert ist. Eine zweite Rossmann-Schleife wird von J. ROHR identifiziert, ihre Funktion jedoch nicht beschrieben.<sup>[33,34,35]</sup>

#### **2.4. Mechanismus der enzymatischen Baeyer-Villiger-Reaktion**

Der allgemein akzeptierte Mechanismus für die enzymatische Baeyer-Villiger-Reaktion basiert auf den Untersuchungen der Cyclohexanon-Monooxygenase (CHMO), welche aus *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871 isoliert wurde (Abbildung 9).<sup>[36,37]</sup> Das Enzym besitzt ein Flavinadenindinukleotid (**10**) (FAD) als prosthetische Gruppe, ist NADPH- (**8**) und sauerstoffabhängig, und gehört zu den Typ I BVMOs. Erster Schritt des biokatalytischen Prozesses ist die Reduktion des fest am Enzym gebundenen FAD (**10**) mittels NADPH (**8**) (**A** → **B**). Die nachfolgende schnelle Oxidation durch molekularen Sauerstoff liefert das Flavin *4a*-Peroxidation (**C**). Dieses Intermediat stellt die oxygenierende Spezies in der nachfolgenden Baeyer-Villiger-Oxidation dar.<sup>[38]</sup> Das Peroxidation greift die Carbonylgruppe des Substrates (**D**) nukleophil an. Es bildet sich das tetraedrische Criegee-Addukt (**E**). Die Umlagerung dieser Spezies erfolgt unter Eliminierung des Lactons (**G**) und des *4a*-Hydroxyflavons (**F**). Der katalytische Zyklus schließt mit der Eliminierung von Wasser unter Rückbildung von FAD (**10**).



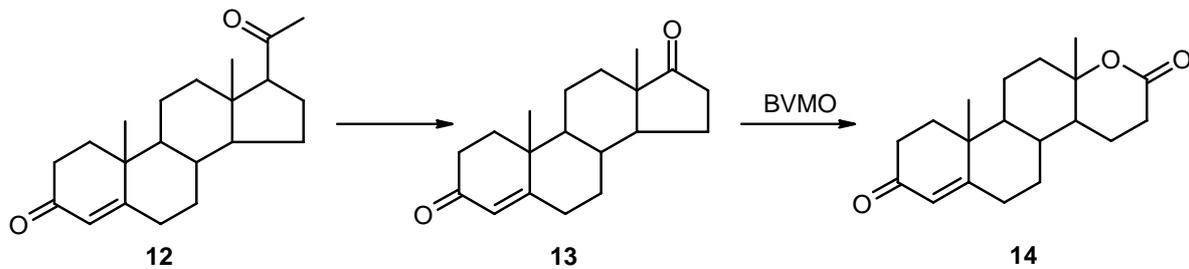
**Abbildung 9:** Mechanismus von Flavin-abhängigen Monooxygenasen.

Es wird angenommen, dass die Umlagerung durch die gleichen stereoelektronischen Effekte wie in der nicht-enzymatischen Baeyer-Villiger-Oxidation gesteuert wird.<sup>[39]</sup> Für eine erfolgreiche Alkylwanderung und *4a*-Hydroxyflavon-Abspaltung müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein: Zum einen muss die C-C Bindung antiperiplanar zur Peroxybindung stehen und zum anderen muss ein freies Elektronenpaar am Sauerstoffatom *anti* zur wandernden Alkylgruppe stehen. Über isotopenmarkierte Substrate bestätigten J. SCHWAB und Mitarbeiter, dass die Fragmentierung des tetraedrischen Intermediats in Analogie zur chemischen Oxidation unter Retention der Konfiguration am wandernden Kohlenstoffzentrum erfolgt.<sup>[40]</sup>

Die Cyclohexanon-Monooxygenase kann die regio- und enantioselektive Oxidation katalysieren, indem es nur einer C-C Bindung ermöglicht, sich antiperiplanar zur O-O Bindung im Criegee-Intermediat (E) anzuordnen. Da FAD (10) fest am Enzym gebunden ist, bestimmen die Wechselwirkungen zwischen dem Substrat und den Aminosäuren im aktiven Zentrum die Ausrichtung und die Auswahl der wandernden Gruppe.

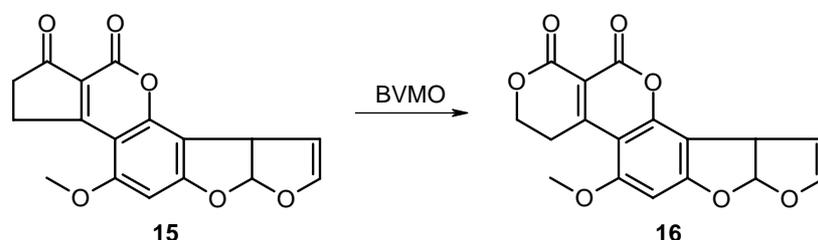
## 2.5. Baeyer-Villiger Monoxygenasen in Sekundärstoff-Biosynthesen

Die Beteiligung von Baeyer-Villiger-Monoxygenasen wurde ebenso bei biosynthetischen Abläufen von Sekundärstoffen gefunden. Ein Pilzmetabolit des Fadenpilzes *Penicillium lilicium*, das Progesteron (**12**), wird nach Demethylierung zu 4-Androsten-3,17-dion (**13**) durch eine BVMO zum Testosteronlacton (**14**) oxidiert, wie aus Abbildung 10 ersichtlich.<sup>[41]</sup>



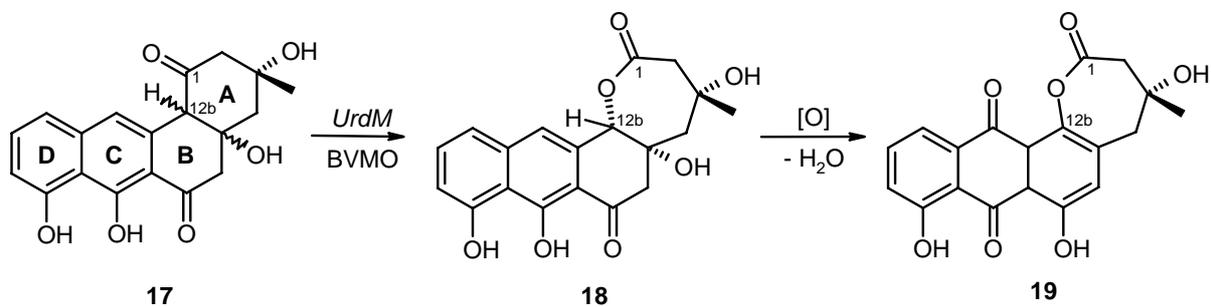
**Abbildung 10:** Transformation von Progesteron (**12**) zu Testosteronlacton (**14**) bei *Penicillium lilicium*. Die Baeyer-Villiger-Monoxygenase katalysiert den Schritt von 4-Androsten-3,17-dion (**13**) zu Testosteronlacton (**14**).

Ein weiteres Beispiel für die Beteiligung von Baeyer-Villiger-Monoxygenasen am Aufbau von Sekundärstoffen ist in der Aflatoxin-Biosynthese zu finden. Aflatoxine sind stark cytotoxisch wirkende Pilzmetabolite, die ausschließlich von den pathogenen Pilzen *Aspergillus flavus* oder *Aspergillus parasiticus* gebildet werden. In den letzten Jahrzehnten haben sich viele Arbeitskreise der Aufklärung der Aflatoxin-Biosynthese gewidmet. Dabei wurde die Biosynthese der Mycotoxine *via* Decaketid-Intermediate etabliert.<sup>[42]</sup> Baeyer-Villiger-Monoxygenasen sind an mehreren Schritten an der Aflatoxin-Biosynthese beteiligt. Da die Biosynthese äußerst komplex ist, soll hier nur ein Schritt beispielhaft skizziert werden. Aus Aflatoxin B1 (**15**) wird über eine BVMO das Aflatoxin G1 (**16**) gebildet.<sup>[41]</sup>



**Abbildung 11:** Baeyer-Villiger-Reaktion bei der Transformation von Aflatoxin B1 (**15**) zu Aflatoxin G1 (**16**).

Nicht nur an der Sekundärstoffbildung aus Pilzen sind Baeyer-Villiger-Monooxygenasen beteiligt, sie ist auch in die bakterielle Sekundärstoffproduktion involviert, beispielsweise gibt es bei Streptomyceten Enzyme mit Baeyer-Villiger-Monooxygenase-Aktivität. Nach dem oben beschriebenen Mechanismus überführen sie ein Keton unter Einbau von molekularem Sauerstoff FAD- (**10**)/NADPH- (**8**) abhängig in ein Lacton. Beispiele hierfür findet man in der Familie der Angucycline, die von A. ZEECK et al. klassifiziert wurden.<sup>[43]</sup> Die Vertreter dieser Klasse zeigen ein breites biologisches Wirkungsspektrum wie z. B. cytostatische, antivirale, antibakterielle und enzyminhibierende Wirkung. Die Angucyclin-Antibiotika besitzen ein tetracyclisches angulares Benzanthracengerüst.

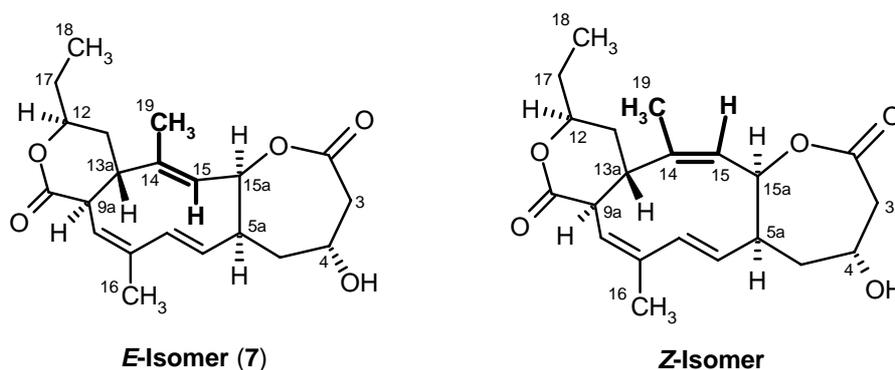


**Abbildung 12:** Die Biosynthese von Urdamycin L (**19**) unter Beteiligung einer BVMO (*UrdM*).

Der instabile Vorläufer UWM 6 (**17**) wird mittels einer BVMO (*UrdM*) in **18** umgewandelt. Molekularer Sauerstoff wird dabei über eine Baeyer-Villiger-Oxidation zwischen C-12b und C-1 unter Bildung eines Siebenring-Lactons **18** eingeführt. Durch weitere Oxidation und Wasserabspaltung wird das Urdamycin L (**19**) gebildet.

### 3. Aufgabenstellung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die chemische und biologische Untersuchung von Collinolacton (7) aus dem Stamm *Streptomyces* sp. Gö 40/10, der im chemischen Screening durch die Bildung zahlreicher Sekundärmetabolite auffiel. Die vorliegenden Untersuchungen knüpfen an die Dissertation von H.-J. SCHIEWE an, der Collinolacton (7) isolierte (Ausbeute: 0.25 mg/L) und die Struktur und Biosynthese untersuchte. Da sowohl das  $^1\text{H}$ - als auch das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum einen doppelten Satz an Signalen mit einem Intensitätsverhältnis von 4:1 aufwiesen, wurde vorgeschlagen Collinolacton (7) als *E/Z*-Isomerengemisch an der Doppelbindung C-14/C-15 zu beschreiben (Abbildung 13).<sup>[44]</sup> H.-J. SCHIEWE konnte erste Biosynthese- und Aktivitätsuntersuchungen durchführen. Auf dieser Basis wurde für einen Polyketidvorläufer im Verlauf der späten Biosynthese eine Baeyer-Villiger-Oxidation vorgeschlagen. Collinolacton (7) zeigte eine cytotoxische und cytostatische Aktivität. Im Verlauf der Arbeiten von H.-J. SCHIEWE stellte sich heraus, dass auch R. KIND Collinolacton aus einem Stamm Tü 1892 isoliert hatte.<sup>[46]</sup>



**Abbildung 13:** Strukturhypothese zum Collinolacton (7) von H.-J. SCHIEWE: *E/Z*-Isomerengemisch an C-14/C-15.

Um Collinolacton (7) aus Kulturen von Gö 40/10 und Tü 1892 zuverlässig isolieren zu können galt es zunächst, eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen auszuarbeiten. Mit Fütterungsexperimenten unter  $^{18}\text{O}_2$ -angereicherter Atmosphäre sollte die Herkunft der Sauerstoffatome untersucht werden, um eine abschließende Biosynthesehypothese ausarbeiten zu können. Auf analytischer Seite sollten Methoden entwickelt werden, das vorliegende Isomerengemisch zu trennen. Dabei war an die Anwendung moderner chromatographischer Methoden eventuell nach vorheriger Derivatisierung gedacht. Ziel war es die Struktur der Haupt- und Minderkomponente aufzuklären. Semisynthetische chemische Derivatisierungen sollten durchgeführt werden, die die Einführung neuer Substituenten ins Collinolacton (7)

sowohl in 4-OH Position als auch im zehngliedrigen Trien des Collinolactons zugänglich machen. Diese Derivate sollten sowohl zu Kristallisation für die Röntgenstrukturanalyse als auch zur Prüfung ihres Bioaktivitätsprofils in Cytotoxizitätstests verwandt werden. Zusätzlich sollten Derivate erzeugt werden, die nicht das Phänomen des doppelten NMR-Signalsatzes aufweisen. Dieser Teil der Arbeit wurde im Rahmen des SFB 416 Teilprojekt B 14 „*Biosynthese und Synthese von Collinolacton, Spirodionsäure und Iromycin, Analyse und Generierung neuer Strukturdiversität*“ durchgeführt. Im Rahmen eines BMBF-Projektes sollte mit Arbeiten zum Auffinden des Biosynthesegenclusters begonnen werden. Firma *Combinature* stellte dafür eine Cosmidbank des Stammes Gö 40/10 zur Verfügung. Unter Verwendung moderner molekularbiologischer Arbeitstechniken sollten Vorarbeiten zur Generierung einer Baeyer-Villiger-Monooxygenase-Sonde geleistet werden.

In einem zweiten Projekt sollte die Biosynthese von 1-*O*-Acylrhamnopyranosiden weiter untersucht werden. Von S. GROND konnten aus Kulturextrakten von *Streptomyces griseoviridis* (Stamm Tü 3634) das mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> intensiv grün anfärbende 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**20**) isoliert werden. Im Rahmen ihrer Dissertation wurde eine Biosynthesehypothese aufgestellt, die davon ausgeht, dass die Startereinheit, in diesem Falle Benzoessäure, direkt aus Shikimat hervorgeht und nicht wie bei Pflanzen bereits bewiesen über Prephenat und Phenylalanin.<sup>[45]</sup> Diese Biosynthesehypothese sollte durch Fütterung von <sup>13</sup>C-markiertem [1,7-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Shikimat überprüft werden. Dies erforderte zunächst die Optimierung der Kultivierungsbedingungen, so dass 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnosid (**20**) in hoher und reproduzierbarer Ausbeute entsteht, und <sup>13</sup>C-Fütterungsexperimente aussichtsreich werden.

Ein drittes Teilprojekt wurde im Rahmen des DBU-Projektes „*Effiziente Produktion Neuartiger Wirkstoffe aus extremophilen Mikroorganismen (Archaea und Bakterien) durch Einsatz heterologer Expressionssysteme*“ (AZ 13142) durchgeführt. Es wurden extremophile Bakterien, die entweder im chemischen oder biologischen Screening auffielen, hinsichtlich ihrer Sekundärstoffbildung untersucht. Stämme, die sich durch ein auffälliges Metabolitenmuster oder biologische Aktivität auszeichneten, sollten in größerem Maßstab kultiviert werden, um so ausreichende Rohproduktmengen für die Isolierung des aktiven Prinzips zu erhalten. Mit Hilfe chromatographischer Trennverfahren sollten die bioaktiven Stoffe als Reinsubstanzen isoliert und durch moderne spektroskopische Methoden in ihrer Struktur aufgeklärt werden.

---

## II Der neue Naturstoff Collinolacton aus *Streptomyces* sp.

### 1. Streptomycceten als Collinolacton-Produzenten

In der Stammsammlung von A. ZEECK sind zwei Streptomycceten Stämme (Tü 1892 und Gö 40/10) vorhanden, die Collinolacton (7) produzieren.

#### 1.1. Stamm Tü 1892

Der Stamm Tü 1892 (*Streptomyces collinus* ssp. *collinus* (LINDENBEIN)) wurde aus einer Bodenprobe bei Kamakura (Japan) isoliert. Bei einem Screening auf abnormes Hyphenwachstum bei Pilzen fanden H. ZÄHNER und W. WEBER farblose und gelbe Komponenten, die eine breite antifungische Aktivität zeigten. R. KIND beschäftigte sich während seiner Dissertation eingehend mit dem Stamm Tü 1892.<sup>[46]</sup>

#### 1.2. Stamm Gö 40/10

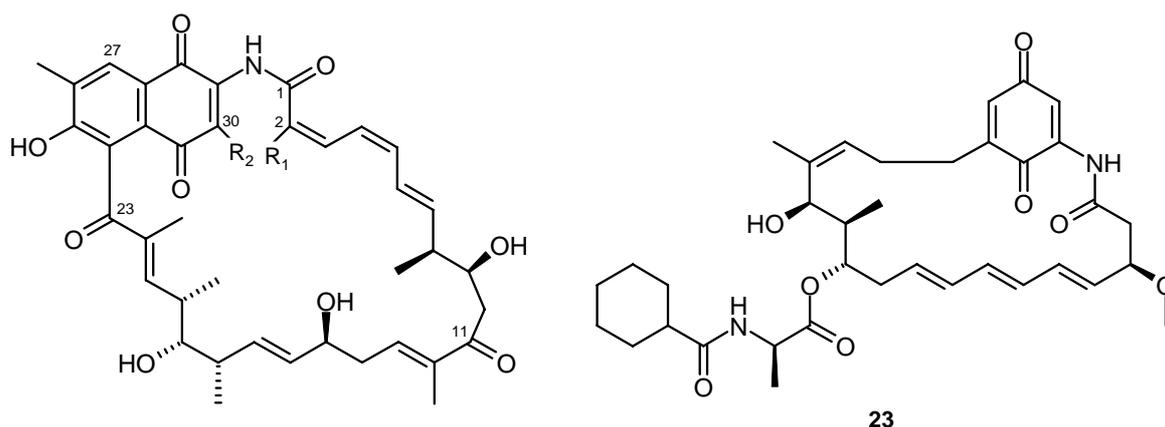
Der Stamm Gö 40/10 stammte aus einer Stammsammlung (ca. 110 Stämme) eines Screenings auf anti-HIV-wirksamen Naturstoffe von G. BACH.<sup>[47]</sup> Er wurde aus einer bolivianischen Bodenprobe isoliert und zeigte keine antivirale oder toxische Wirkung im MT-4 Zelltest<sup>[48,49]</sup> des Deutschen Primatenzentrums (Göttingen). In einem chemischen Screening und einem HPLC-Screening, das von B. BETHE im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt wurde, zeigte Gö 40/10 jedoch ein besonders auffälliges, vielfältiges Metabolitenmuster.<sup>[50]</sup> Bisher wurde keine taxonomische Bestimmung des Stammes Gö 40/10 durchgeführt.

### 2. Metabolitenspektrum der Stämme Tü 1892 und Gö 40/10

B. BETHE<sup>[50]</sup>, R. KIND<sup>[46]</sup> und H.-J. SCHIEWE<sup>[44]</sup> beschäftigten sich während ihrer Dissertationen unter verschiedenen Fragestellungen mit den genannten Stämmen und stellten eine große Ähnlichkeit im Muster der produzierten Sekundärmetabolite fest. Die aus den beiden *Streptomycceten* isolierten Sekundärmetabolite lassen sich in drei bekannte Gruppen (Ansamycine, 14-gliedrige Makrolide und  $\gamma$ -Butyrolactone) einordnen.

## 2.1. Die Gruppe der Ansamycine

Der 1973 von V. PRELOG und W. OPPOLZER geprägte Begriff „Ansamycine“ bezeichnet eine Gruppe von mikrobiellen Sekundärstoffen, die ein gemeinsames Strukturmerkmal verbindet, ein Chinon oder benzanilliertes Chinon, das wie ein Henkel (griech.: *ansa*) von einer aliphatischen Kohlenstoffkette überbrückt wird.<sup>[51]</sup> Die Ansamycine, die eine charakteristische orange/rote Eigenfarbe besitzen, gehören zu der großen Klasse der Makrolactam-Antibiotika und haben eine biologische Aktivität gegen gram-positive Bakterien. Dieser Verbindungsklasse, die heute mehr als 70 Vertreter umfasst, sind Diastovaricine (**21**), Naphtomycine (**22**), Ansatrienine (**23**) und Rifamycin SV (**24**) zuzuordnen (Abbildung 14, Abbildung 15). Sie werden strukturell je nach der Art ihres aromatischen Chromophors als Naphthalen- oder Benzen-Typ bezeichnet, eine weitere Unterteilung erfolgt anhand der Länge der aliphatischen Kette.

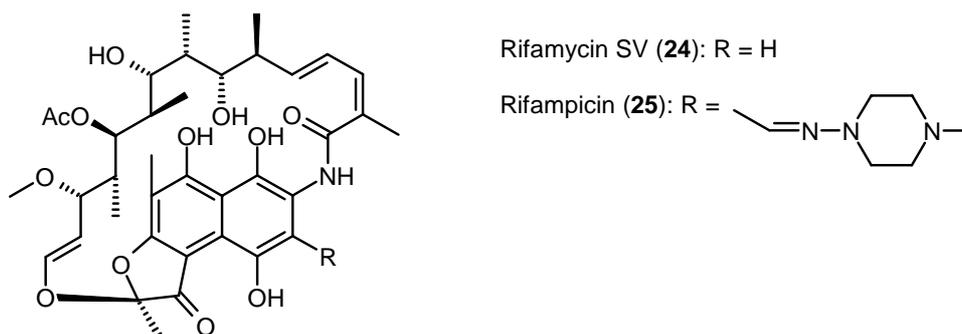


Diastovaricin I (**21**):  $R_1 = H$ ,  $R_2 = OH$

Naphtomycin A (**22**):  $R_1 = CH_3$ ,  $R_2 = Cl$

**Abbildung 14:** Drei Verbindungsklassen der Ansamycine: Diastovaricin I (**21**), Naphtomycin A (**22**) und Ansatrien (**23**).

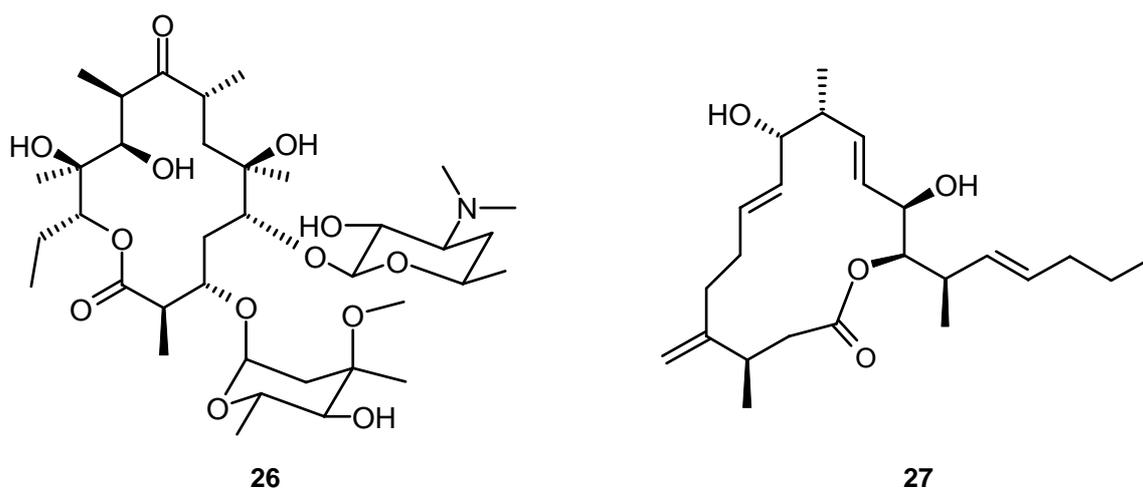
Durch die großen Erfolge des aus *Amycolatopsis mediterranei* isolierten Rifamycin SV (**24**) und seines semisynthetischen Derivates Rifampicin (**25**) bei der Bekämpfung der Tuberkulose haben die Ansamycine große Aufmerksamkeit auf sich gezogen.<sup>[52]</sup>



**Abbildung 15:** Biologisch aktives Rifamycin SV (**24**) mit seinem semisynthetischen Derivat Rifampicin (**25**).

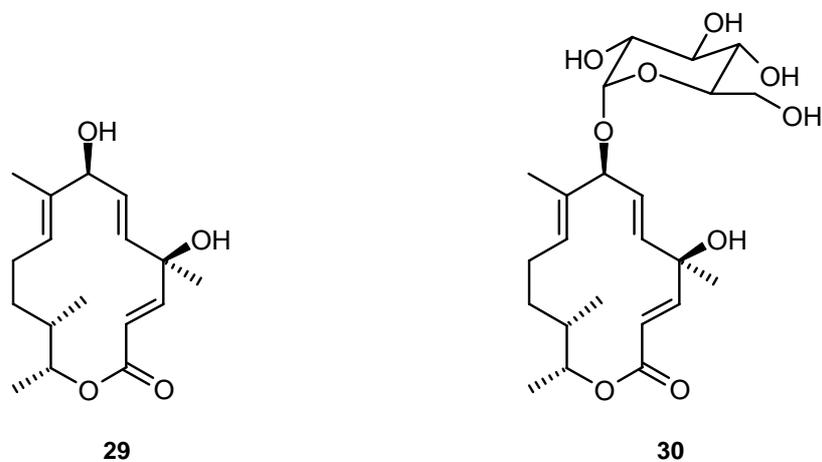
## 2.2. Die Gruppe der 14-gliedrigen Makrolide

Die Gruppe der Makrolide wird ebenso wie die der Ansamycine nach strukturellen Merkmalen in verschiedene Untergruppen eingeteilt, wobei das Hauptunterscheidungsmerkmal die Ringgröße des Lactons darstellt. Die „klassischen“ Makrolide sind 12-, 14- oder 16-gliedrig. Der wohl am besten untersuchte und bekannteste Vertreter ist das 14-gliedrige Makrolid Erythromycin A (**26**), das als Antibiotikum gegen Gram-positive Bakterien eine breite Anwendung findet. Erythromycin A (**26**) hemmt die Proteinbiosynthese der Bakterienzelle und macht sie damit unschädlich. Ungradzahlige Makrolide weisen spezifische cytotoxische Eigenschaften auf, wie das Amphidinolid J (**27**) (Abbildung 16)<sup>[53]</sup>, das aus einem marinen Dinoflagellaten (*Amphidinium* sp.), der ein Symbiont des Plattwurms *Amphiscolops* sp. ist, isoliert wurde.



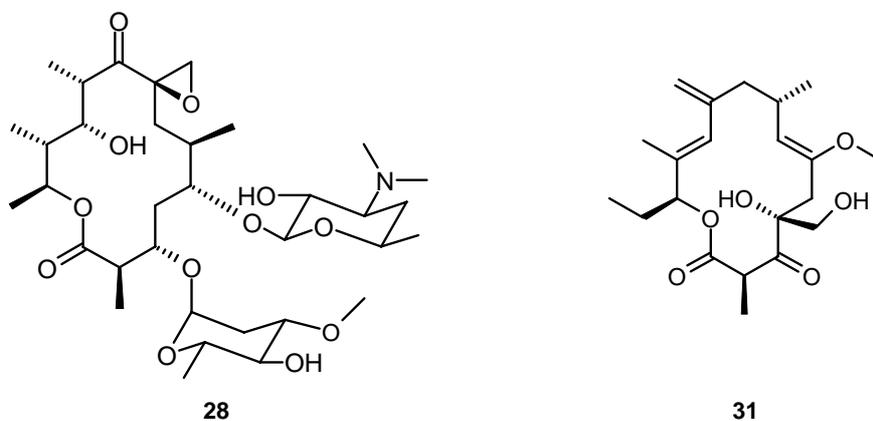
**Abbildung 16:** Das 14-gliedrige Makrolid Erythromycin A (**26**) und das 15-gliedrige Amphidinolid J (**27**).

1957 führte R. WOODWARD den Begriff „Makrolide“ für makrocyclische Lactone ein.<sup>[54]</sup> Inzwischen umfasst allein die Gruppe der 14-gliedrigen Makrolide mehr als 80 Vertreter, die cytotoxische Wirkung oder antibakterielle Eigenschaften gegen gram-positive und einige gram-negative Bakterien, Spirochäten, Pilze und verschiedene Viren zeigen. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass bei Erythromycinen und dem ebenfalls in der klinischen Anwendung befindlichen Oleandomycin (**28**) die Glykosylierung des Makrolidringes für die biologische Wirkung zwingend erforderlich ist (Abbildung 18). Die beiden bearbeiteten Stämme Gö 40/10 und Tü 1892 produzieren hingegen sowohl das nicht glykosylierte (**29**) und das glykosylierte (**30**) Cineromycin B-Derivat (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Aus den *Streptomyces* isoliertes Cineromycin B (**29**) und 7-O-( $\alpha$ -Glucosyl)-Cineromycin B (**30**).

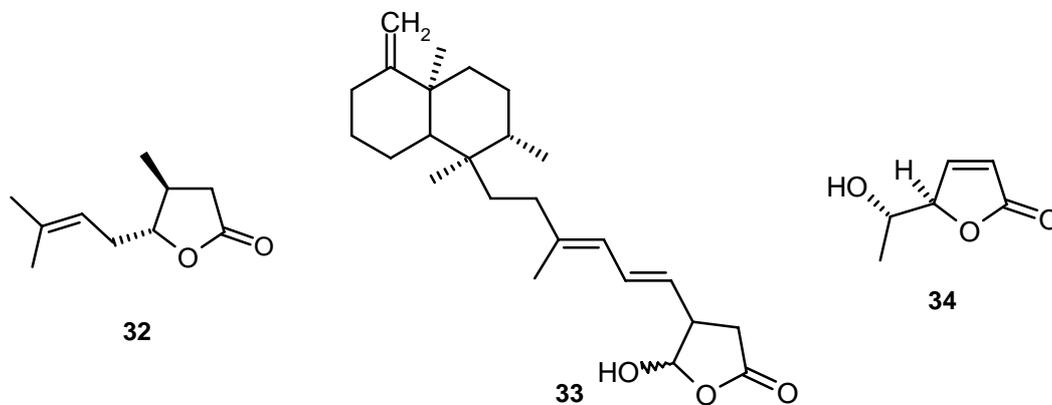
Wie das aus *Streptomyces galbus* isolierte antifungisch wirksame Galbonolid A (**31**) zeigt, können jedoch auch nicht glykosylierte 14-gliedrige Makrolide eine biologische Aktivität besitzen (Abbildung 18).<sup>[55,56]</sup>



**Abbildung 18:** Glykosylierte und nicht-glykosylierte 14-gliedrige Makrolide: Oleandomycin (**28**) und Galbonolid A (**31**).

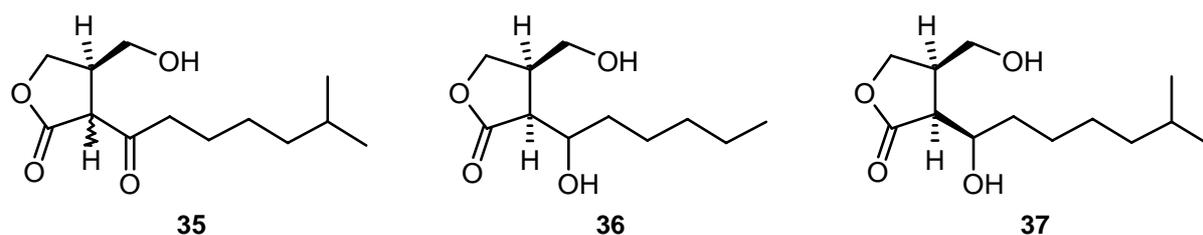
### 2.3. Die Gruppe der $\gamma$ -Butyrolactone

Das Strukturelement eines fünfgliedrigen Lactons ist in der Natur sowohl unter den Metaboliten von Pro- wie auch Eukaryonten weit verbreitet. Aus Käfern (*Eldana saccharina*) konnte das ausschließlich Alkylgruppen tragende terpenoide Butyrolacton Eldanolid (**32**)<sup>[57]</sup> isoliert werden, das als Sexualhormon wirkt. Das Butyrolacton Palauolid (**33**)<sup>[58]</sup> aus einem *Palauan*-Schwamm zeigt antibiotische Aktivität. Aus einem Pilz (*Paxillus atromentosus*) ließ sich das Osmundalacton (**34**) isolieren, das fraßhemmende Wirkung gegenüber Larven von Schmetterlingen besitzt (Abbildung 19).<sup>[59]</sup>



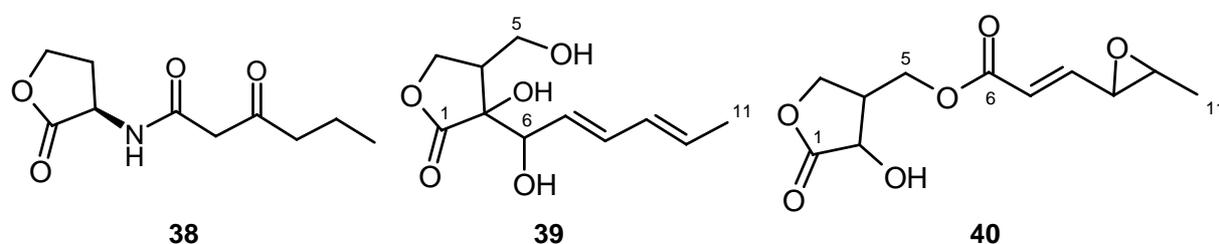
**Abbildung 19:**  $\gamma$ -Butyrolactone aus dem Tierreich und Pilzen. Eldanolid (**32**), Palauolid (**33**) und Osmundalacton (**34**).

In Streptomyceten findet man häufig  $\gamma$ -Butyrolactone, die stoffwechselregulierende Eigenschaften haben. Sie spielen als pleiotrope Effektoren im Wachstumsverlauf eine wichtige Rolle, indem sie mehrere nachgeordnete Genfunktionen stimulieren. Weiterhin dienen sie als Induktionsfaktoren, Differenzierungsfaktoren oder Signalstoffe und werden als „mikrobielle Hormone“<sup>[60]</sup> angesehen. Es ist jedoch bisher nicht geklärt, ob es sich um ein Wirkstoffprinzip handelt, das allgemeingültig ist. Einige Butyrolactone scheinen für bestimmte Regulationsvorgänge im Sekundärstoffwechsel der Streptomyceten essentiell zu sein. Der die Streptomycin-Biosynthese in *Streptomyces griseus* stimulierende A-Faktor (**35**) (2-Isocaproyl-3*R*-hydroxymethyl-butyrolacton (Abbildung 20)) ist bisher am intensivsten untersucht worden. Sein Fehlen in Blockmutanten verhindert die Expression der Biosynthesegene des Streptomycins und die Sporenbildung. Zugabe von synthetischem A-Faktor (**35**) induziert diese Fähigkeiten wieder.<sup>[61]</sup> Virginaebutanolid C (**36**) stimuliert die Virginiamycin-Biosynthese, und ein Dihydroderivat des A-Faktors (**36**) die Antracyclin-Biosynthese.<sup>[62,63]</sup>



**Abbildung 20:** Der A-Faktor (**35**) und zwei biologisch wirksame Derivate Virginaebutanolid C (**36**) und ein Dihydroderivat des A-Faktors (**37**).

Die beschriebenen Funktionen der verschiedenen mikrobiellen  $\gamma$ -Butyrolactone ist eine Klasse von Signalstoff-Molekülen. Es ist jedoch anzumerken, dass einige taxonomisch eng mit  $\gamma$ -Butyrolacton-Produzenten verwandte Organismen von Vertretern dieser Substanzklasse unbeeinflusst bleiben. D. h. es handelt sich bei den  $\gamma$ -Butyrolactonen nicht um Mediator-Moleküle eines universellen Regulationsprinzips. Interessanterweise übernehmen die dem  $\gamma$ -Butyrolacton strukturell sehr ähnlichen Homoserinlactone (**38**) bei gram-negativen Bakterien ebenfalls eine kommunikative Aufgabe.<sup>[64,65]</sup> Die in den Stämmen Tü 1892 und Gö 40/10 isolierten Verbindungen gehören zu der Substanzklasse der 2,3-disubstituierte  $\gamma$ -Butyrolactone (**39** und **40**) (Abbildung 21). Ihre Funktion als Signalstoff-Moleküle wurde bisher nicht weiter untersucht.



**Abbildung 21:** Homoserinlacton (**38**) und zwei aus *Streptomyces* sp. Gö 40/10 isolierte  $\gamma$ -Butyrolactone (**39** und **40**).

### 3. Optimierung der Kultivierungsbedingungen

Für die Isolierung ausreichender Mengen des interessierenden Sekundärstoffs Collinolacton (**7**) für spektroskopische Untersuchungen, Kristallisationsversuche, Derivatisierungsexperimente und die Durchführung von Biosyntheseuntersuchungen ist ein verlässliches Wachstum und hinreichende Produktion von *Streptomyces* Gö 40/10 und Tü 1892 eine

notwendige Voraussetzung. Deshalb mussten zuerst die Kultivierungsparameter mit dem Ziel einer größtmöglichen Produktion des Sekundärmetaboliten **7** optimiert werden.

Die Stämme wurden als Stickstoff-Einlagerung aus der Stammsammlung der Abteilung PROF. DR. A. ZEECK entnommen. Die in Stickstoff eingelagerten Agarstückchen wurden auf Soja-Mannit (SM) Agarplatten mit einer sterilen Impföse ausgestrichen und fünf Tage bei 28°C inkubiert. Während dieser Zeit verfärbte sich der Agar dunkelbraun bis schwarz und es bildete sich weißes, gut versportetes Luftmycel aus, das sich bei Lagerung (4°C) grau verfärbte. Für eine kurzzeitige Konservierung der Stämme wurden SM-Agarplatten gewählt, die bis zu drei Monate bei 4°C gelagert werden konnten. Zur Langzeitkonservierung wurden Stickstoff-Einlagerungen hergestellt (B. XI1.2). Vom Wachstum her konnte kein Unterschied zwischen den beiden Stämmen festgestellt werden. Beide Stämme zeigten nach 5 Tagen Inkubation bei 28°C ein weißes gut versportetes Luftmycel, das sich während einer Lagerung bei 4°C grau verfärbte, und eine dunkelbraune Verfärbung des Agars.

Bei Streptomyceten ist eine gute Produktion von Sekundärstoffen in der Regel in Flüssigkulturen (Schüttelkolben oder Fermenter) möglich. Zur Ausbeuteoptimierung sollten Fermentationen durchgeführt werden, die in der Länge der Inkubationszeit, der Art des Nährmediums, der Art der Kultivierungsgefäße und den Zusatz Amberlite® XAD-2 zum Nährmedium variierten. Die daraus gewonnenen Rohprodukte sollten nicht nur im Hinblick auf die Menge des gebildeten Collinolactons (**7**) ausgewertet werden, sondern auch Erkenntnisse darüber liefern, ob durch die Variation der Kultivierungsbedingungen Vorstufen des Sekundärmetaboliten erhalten werden können.

R. KIND konnte einmalig das Collinolacton (**7**) nach Versuchen zur Vorläufer-dirigierten Biosynthese am Stamm Tü 1892 in einer Ausbeute von 7 mg/L isolieren. Die Vorläufer-dirigierte Biosynthese wurde angewendet, um neue Ansamycin-Analoga zu erhalten. Daher wurde 3-Aminobenzoesäure in einer Konzentration von 2 g/L (15mmol/L) zu einem 50 L-Fermenter (Soja-Mannit (SM)-Medium) gefüttert.<sup>[46]</sup>

H.-J. SCHIEWE, der sich mit der Biosyntheseleistung des Stammes Gö 40/10 während seiner Dissertation beschäftigte, konnte 0.25 mg/L Collinolacton (**7**) aus einer Fermentation in Hafer-Medium im 50 L-Maßstab isolieren.<sup>[44]</sup>

### **3.1. Variation der Kultivierungszeit und Kultivierungsgefäße**

Aufbauend auf die bisherigen Daten zu den Fermentationen von Collinolacton (**7**) wurden die Stämme Tü 1892 und Gö 40/10 in 300 mL Erlenmeyerkolben (drei Schikanen) mit 100 mL

SM-Medium und in 1 L Erlenmeyerkolben (EMK) mit 150 mL Soja-Mannit (SM)-Medium durchgeführt. Die Vorkulturen, je ein Kolben, wurden mit einem Achtel einer gut bewachsenen SM-Agarplatte des jeweiligen Stammes angeimpft und 36 h bzw. 48 h bei 28°C und 180 rpm bzw. 250 rpm (Rundschüttler) inkubiert. Mit 5 mL der Vorkulturen wurden die Hauptkulturen, je zwei Kolben, angeimpft und jeweils 72 h bzw. 96 h unter gleichen Bedingungen inkubiert. Zusätzlich wurde der Querschüttler mit 120 spm in die Experimente zur Ausbeuteoptimierung mit einbezogen. Grundlage dieses Ansatzes war die Erfahrung, dass die Stämme einen sehr hohen Sauerstoffbedarf hatten. Die Ansätze wurden unter standardisierten Bedingungen mittels Ethylacetatextraktion des Kulturfiltrates (s. B. XI4.1) aufgearbeitet. Die Collinolactonproduktion wurde mittels HPLC-MS-Analyse (Integrale des Produktpeaks) der erhaltenen Extrakte bewertet. Aufgrund der Effizienz wurde auf eine Quantifizierung mittels zusätzlicher Eichkurve verzichtet (Tabelle 1).

Fermentationsdauer der Vor- und Hauptkultur	300 mL EMK 100 mL Medium		1 L EMK 150 mL Medium		1 L EMK* 150 mL Medium
	180 rpm	250 rpm	180 rpm	250 rpm	120 spm
<b><u>Stamm Tü 1892</u></b>					
36 h VK 72 h HK	+	+	+	+	+
36 h VK 96 h HK	+	++	+	+	+
48 h VK 72 h HK	++	++++	+	+++	+
48 h VK 96 h HK	+	++	+	++	+
<b><u>Stamm Gö 40/10</u></b>					
36 h VK 72 h HK	+	+	+	+	+
36 h VK 96 h HK	+	+	+	+	+
48 h VK 72 h HK	+	+++	+	++	+
48 h VK 96 h HK	+	++	+	+	+

**Tabelle 1:** Variation der Fermentationsparameter bei der Kultivierung mit beobachteter Collinolactonproduktion. (+ nachweisbare Produktion, ++ mäßige Produktion, +++ gute Produktion, ++++ sehr gute Produktion). EMK\* = Erlenmeyerkolben ohne Schikane.

Anhand der durchgeführten Variationsexperimente, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind, wird deutlich, dass die Kultivierung in 300 mL EMK eine reproduzierbare Menge an Collinolacton (7) zulässt. In Schüttelkulturen zeigen beide Stämme eine olivgrüne Verfärbung der Kulturbrühe mit sehr starker Mycelbildung. Der Stamm Tü 1892 ist in der Collinolactonproduktion potenter als der Stamm Gö 40/10. Beide Stämme haben ihr Produktionsoptimum an Collinolacton (7) unter der Fermentationslänge von zwei Tagen Vorkultur und drei Tagen Hauptkultur. Die Kultivierung in 300 mL EMK auf einem

Rundschtüttler bei 250 rpm, d. h. bei hohem Sauerstoffangebot, erbrachte die höchste Menge an Collinolacton (7).

### 3.2. Nährmedienvariation

Der Literatur zufolge zeigt eine Untersuchung von 760 Mikroorganismen besonders deutlich, dass der Einfluss der Nährmedienzusammensetzung auf die Produktivität eines Stammes sehr entscheidend ist. Diese wurden jeweils in vier verschiedenen Nährmedien kultiviert und die Extrakte biologischen Testsystemen zugeführt. Demnach findet sich das aktive Prinzip bei 75% der Stämme in nur einem Medium.<sup>[66]</sup> Nährmedien für Streptomyceten enthalten allgemein neben Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphatquellen auch Spurenelemente wie z. B. Mg-, Ca-, Na-, K-, Fe-, Mn-, Zn-, Co-, Cu- und Mo-Ionen, die sich für das Wachstum<sup>[67]</sup> und die Bildung<sup>[68]</sup> von Sekundärmetaboliten als wichtig herausgestellt haben. Der Einfluss einzelner Komponenten auf die Sekundärstoffproduktion ist für ausgewählte Beispiele gut untersucht.<sup>[69]</sup> Als C-Quelle finden Glycerin oder in komplexen Medien meist einfache Kohlenhydrate wie Glucose oder Stärke Verwendung. Eiweißhydrolysate (Peptone) oder Sojamehl dienen in komplexen Medien als N-, S- und P-Quelle, in synthetischen Medien verwendet man dazu Ammoniumphosphat und -sulfat oder Aminosäuren. Für jede Fragestellung, d. h. für jeden Produzentenstamm und den interessierenden Sekundärmetaboliten müssen neue Arbeiten zur Optimierung durchgeführt werden. Denn es gibt bis heute kein allgemein gültiges Verfahren, um die Ausbeute an Sekundärstoff gezielt zu erhöhen.

Die Untersuchung zur Optimierung des Nährmediums wurden mit den Stämmen Tü 1892 und Gö 40/10 in 300 mL Erlenmeyerkolben (drei Schikanen) mit 100 mL des zu testenden Nährmediums durchgeführt. Um dem Stamm möglichst alle notwendigen Nährstoffe bereitzustellen, wurden ausschließlich komplexe Nährmedien verwendet. In Soja-Mannit-Medium ist neben Mannit als C-Quelle Sojamehl Hauptbestandteil, welches als Stickstoff-, Schwefel- und Spurenelementquelle dient. Das Hafermedium besteht neben Hafer, das als C-, N- und S-Quelle dient aus einer Spur 11-Lösung, die die notwendigen Spurenelemente zum Aufbau von Sekundärmetaboliten liefert. Im GPDX-Medium werden drei verschiedene C-Quellen zugesetzt. Neben Glycerin und Glucose als schnell verstoffwechselbare C-Quellen wird außerdem Prolin eingesetzt, so dass auch in einem späten Zeitpunkt der Fermentation, in der der Sekundärstoffwechsel am ausgeprägtesten ist, noch ausreichend Nährstoff zur Bildung der Sekundärmetaboliten vorhanden sind. Ergänzt wird dieses Medium durch Zugabe

verschiedener Salze (z. B. NaCl, CaCO<sub>3</sub>), Hefeextrakt als N- und S-Quelle, sowie Prolin als Stickstoffquelle. Die Vorkulturen, je ein Kolben, wurden mit einem Achtel einer gut bewachsenen Agarplatte angeimpft und 48 h bei 28°C und 250 rpm inkubiert. Die Hauptkulturen wurden mit 5 mL der Vorkultur angeimpft und 72 h bei 28°C und 250 rpm inkubiert. Mit den Hauptkulturen wurden je zwei Kolben beschickt, die nach Ende der Fermentation unter standardisierten Bedingungen (s. B. XI4.1) aufgearbeitet wurden. Die Collinolactonproduktion wurde mittels HPLC-MS-Analyse (Integrale des Produktpeaks) der erhaltenen Extrakte bewertet (Tabelle 2).

Medium	Tü 1892	Gö 40/10
Soja/Mannit (SM)	++	+
Hafer	+	+
GPDx	-	-

**Tabelle 2:** Variation des Nährmediums bei der Kultivierung und beobachtete Collinolactonproduktion (- keine Produktion, + mäßige Produktion, ++ sehr gute Produktion).

Anhand von Tabelle 2 ist deutlich, dass der Stamm Tü 1892 in dem Soja-Mannit-Medium am stärksten produziert hat. Die Produktion belief sich auf ca. 3 – 5 mg/L, was jedoch noch nicht ausreichte, die notwendige Menge an Collinolacton (7) zu erhalten, um die in der Aufgabenstellung vorgestellten Experimente durchzuführen. Der Stamm Gö 40/10 produzierte weder im Hafermedium noch im Soja-Mannit-Medium in ausreichenden Mengen (~ 2 mg/L). Das GPDx-Medium erbrachte keine Produktion von Collinolacton (7).

### 3.3. Variation des Kultivierungsgefäßes und des Sauerstoffpartialdrucks

Der Sauerstoffpartialdruck in einer Kulturlösung kann einen enormen Einfluss auf das Metabolitenspektrum eines Stammes ausüben.<sup>[70]</sup> Durch Variation der Art des Fermentationsgefäßes bzw. einzelner Fermentationsparameter wie Füllhöhe, Drehzahl oder Rührergeschwindigkeit und durch die damit verbundenen Unterschiede in den Belüftungsverhältnissen, lässt sich die Variation dieses Parameters einfach realisieren. Eine besondere Situation hoher Durchlüftung liegt beispielsweise in einem 10 L Airlift-Fermenter (ohne Rührblätter, Durchlüftung vom Fermentationsboden) vor, der eine besonders gute Durchlüftung der Kulturbrühe erlaubt und bei bis zu 5 bar Überdruck betrieben werden kann. Aufgrund der Aufgabenstellung wurden zwei Anforderungen an die Produktion von Collinolacton (7) gestellt. Für Biosyntheseuntersuchungen sollte der Stamm in kleinem

Maßstab eine verlässliche Produkton zeigen. Der große Bedarf an Collinolacton (7) für spektroskopische Untersuchungen, Kristallisationsversuche und Derivatisierungsexperimente war ausschlaggebend dafür, dass die Collinolactonproduzenten Tü 1892 und Gö 40/10 auch in großen Kultivierungsgefäßen kultiviert werden sollten. Die Variation der Kultivierungsgefäße erstreckte sich von Kultivierungen in unterschiedlich großen Schüttelkolben (300 mL, 1 L) über unterschiedliche Arten der Erlenmeyerkolben (mit und ohne Schikane) bis hin zu Fermentern unterschiedlicher Größe (1 – 50 L). Alle Kultivierungen zur Ausbeutesteigerung durch Variation der Kultivierungsgefäße wurden mit dem Stamm *Streptomyces collinus* Tü 1892 im Nährmedium Soja/Mannit (SM) durchgeführt. Die Vorkulturen wurden mit einem Achtel einer gut bewachsenen Agarplatte angeimpft und 48 h bei 28°C und 250 rpm inkubiert. Die Fermenter (Hauptkulturen) wurden mit 10% des Fermentervolumens aus Vorkulturen beimpft. Die detaillierten Fermentationsbedingungen zu den einzelnen Fermentern sind im Experimentellen Teil (Kapitel B. XI3) zusammengefasst. Nach Filtration über Hyflocelite wurde das Kulturfiltrat mit Ethylacetat extrahiert.

Die Kultivierung des Stammes Tü 1892 in Fermentern stellte sich als experimentell herausfordernd heraus. Um starke Schaumbildung während der Fermentation zu unterdrücken wurde den Fermentationen in großen Maßstäben ein Entschäumer (NIAX) beigelegt. Der Stamm reagierte sehr stark auf die Zugabe des Entschäumers NIAX. Wurde der Fermentation zuviel NIAX beigelegt, schlug der pH-Wert der Kultur ins alkalische um und die Bakterienkultur zeigte keine detektierbaren Mengen an Collinolacton (7). Dem Stamm durfte nicht mehr als ein Tropfen NIAX pro Fermentationsliter zugefügt werden. Ein weiteres Problem stellte das starke schnelle Wachstum der Bakterienkultur dar. Es wurde so viel Biomasse und Schaum produziert, dass es die Kulturbrühe ab der 36. Fermentationsstunde aus den Fermentern herausdrückte. Diesem Problem konnte weder mit einer größeren Menge an NIAX oder mit einer Fermentation in einem größeren Fermentationsgefäß (30 L Kulturbrühe auf 50 L Fermenter) noch mit Verminderung der Rührgeschwindigkeit entgegen gewirkt werden. Die Fermentationen in großen Maßstäben (10 – 50 L) zeigten weiterhin leider nicht den gewünschten additiven Effekt an Collinolactonproduktion.

Aufgrund der beschriebenen Probleme und enormen Produktionseinbußen in Fermentern und einer wenig effektiven Kultivierung von großen Mengen (5 – 10 L) in Schüttelkulturen wurde als letzte Gefäßvariation die Fermentation in einem Airlifter unter Druck durchgeführt. Durch die 5 bar Überdruck wurde der Stamm an starker Schaumbildung gehindert, so dass es nicht nötig war, der Fermentationsbrühe NIAX hinzu zufügen. Dass diese Fermentation sehr

erfolgreich war, ist durch den Vergleich der Ausbeuten aus allen Ansätzen der Fermentationsgefäßvariationen, zusammengefasst in Tabelle 3, zu erkennen.

Kultivierungsgefäß	Ausbeute von 7 in mg/L
250 mL EMK	5.3
1 L EMK mit Schikane	2.6
1 L EMK ohne Schikane	2.8
1 L Fermentation	4.1
10 L Fermentation	0.4
50 L Fermentation	1.5
10 L Airlifter	7.0

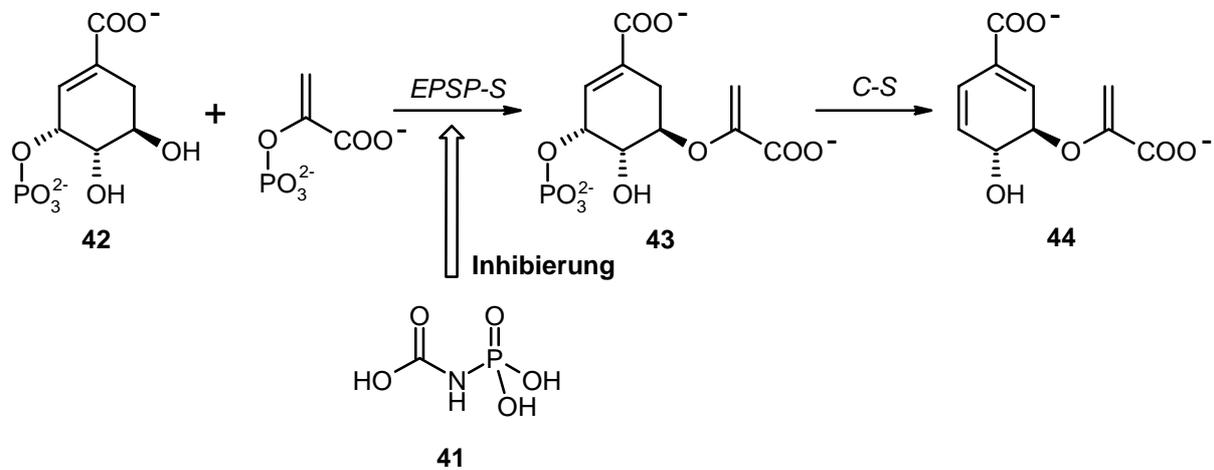
**Tabelle 3:** Variation des Fermentationsgefäßes bei der Kultivierung des Stammes Tü 1892 und beobachtete Collinolactonproduktion in mg/L.

Tabelle 3 ist zu entnehmen, dass die Eigenschaften des Airlift-Fermenters die Collinolactonproduktion von Tü 1892 positiv beeinflussten. Die starke Durchlüftung vom Fermenterboden stellt eine hohe Sauerstoffzufuhr bereit. Die Fermentation unter Druck lässt ein Schäumen der Fermentationsbrühe nicht zu und so kann der Zusatz von NIAX vermieden werden. Mit einer Produktion von 7 mg/L Collinolacton (**7**) konnten verlässliche Mengen an Sekundärmetabolit **7** produziert werden. Eine weitere Steigerung war dennoch wünschenswert, da für Derivatisierungsversuche und Kristallisationsexperimente ein hoher Bedarf an Collinolacton (**7**) vorhanden war.

### 3.4. Zugabe des Enzyminhibitors Glyphosat und Fütterung von Acetat

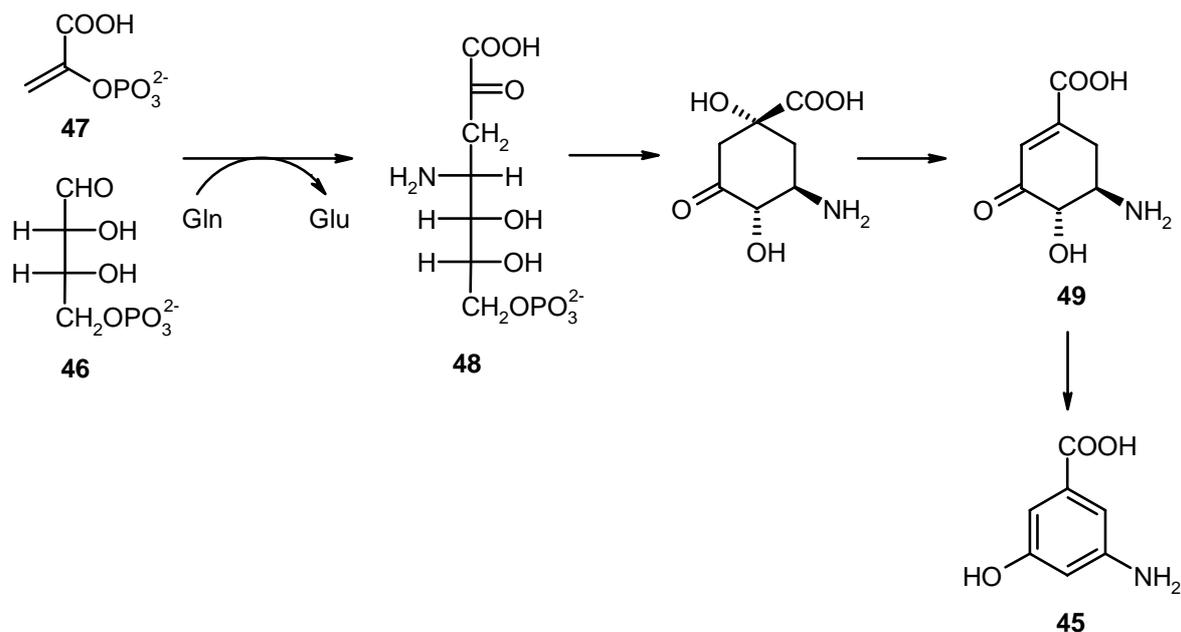
Glyphosat (**41**) ist ein Inhibitor der 5-Enolpyruvyl-shikimat-3-phosphat-Synthase (EPSP-S), welche die Umwandlung von Shikimat-3-phosphat (**42**) (Shikimat-3-P) zu 5-Enolpyruvyl-shikimat-3-phosphat (**43**) (EPSP) katalysiert, das durch die Chorismat-Synthase (C-S) weiter zu Chorismat (**44**) umgesetzt wird (Abbildung 22).<sup>[71]</sup> Glyphosat (**41**) (Markenname u. a. Roundup<sup>®</sup>) wird im Pflanzenschutz als Totalherbizid eingesetzt. Die Aufnahme erfolgt ausschließlich über grüne Pflanzenteile, wobei eine Aufnahme über die Wurzel nicht möglich ist.<sup>[72]</sup> Bei Pflanzen wird eine Inhibierung des Shikimisäureweges bei Konzentrationen an Glyphosat (**41**) von < 1 mM erreicht, bei Bakterien bei ca. 2 mM. Es sind aber auch Mikroorganismen beschrieben, die eine höhere Toleranz gegenüber Glyphosat (**41**)

aufweisen. Bei Cyanobakterien zum Beispiel wurde bei Zugabe von 20 mM Glyphosat (41) keine Veränderung im Wachstumsverhalten beobachtet.<sup>[73]</sup>



**Abbildung 22:** Enzymatische Reaktionen von Shikimat-3-Phosphat (42) zu Chorismat (44) über EPSP.

Die Zugabe von Glyphosat (41) zu Tü 1892 und Gö 40/10 sollte die Biosynthese der großen Familie der Ansamycine (s. A. II2.1), die einen erheblichen Anteil der Metaboliten der beiden Stämme ausmachen, hemmen. Damit sollte mehr Biosynthesekapazität aus dem Carbonsäurepool für die Bildung des Collinolactons (7) zur Verfügung stehen. Zusätzlich sollte bei einer Fermentation durch die Fütterung von Acetat der Polyketid-Biosyntheseweg unterstützt werden. Als Biosynthese-Startereinheit aller Ansamycine dient die 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (AHBA) (45). Sie wird auf einem der Bildung der Shikimisäure ähnlichen, aminoanalogen Weg, aus Erythrose-4-Phosphat (46) (E4P) und Phosphoenolpyruvat (47) (PEP) über 3,4-Didesoxy-4-amino-D-arabino-heptulosat-7-phosphat (48) (AminoDAHP) und 5-Desoxy-5-amino-3-dehydroshikimat (49) (AminoDHS) aufgebaut und auch als *m*-C<sub>7</sub>N-Einheit bezeichnet (Abbildung 23). Die analogen Desamino-Verbindungen DAHP und DHS werden von den entsprechenden Enzymen nicht umgesetzt. Außerdem gibt es bisher keine Anhaltspunkte aus der Literatur, ob die Inhibition des Shikimat-Chorismat-Biosyntheseweges eine regulatorische Wirkung auf die AHBA-Produktion hat. Unklar ist auch, ob Glyphosat (41) auf die AHBA-Biosynthese direkt regulatorisch wirken kann, da hier keine EPSP-Synthase-Analoge Reaktion beteiligt ist.



**Abbildung 23:** Bildung von 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure (45).

Der Versuch, die Collinolactonproduktion von Gö 40/10 und Tü 1892 durch die Unterdrückung der Ansamycinbiosynthese und durch zusätzliche Fütterung des Polyketidbausteins Acetat (nur an Tü 1892) zu erhöhen, fand wegen der einfachen Handhabung und der konstanten Ausbeuten parallel in 1 L Rührblattfermentern statt. Die Vorkulturen wurden in Schüttelkulturen (100 mL SM-Medium, 250 rpm, 28°C und 48 h) angezogen. 100 mL einer 48 Stunden alten Vorkultur dienten als Inokulum der Hauptkultur. Die Rührgeschwindigkeit wurde auf 600 rpm heruntergeregelt, um eventuellem Schäumen vorzubeugen. Nach dem Anwachsen der Stämme wurde Glyphosat (41) (10 mg/L, 0.06 mM) in 40 mL sterilem Wasser in der 40. Inkubationsstunde der Kulturlösung hinzugefügt. Dem Stamm Tü 1892 wurde zusätzlich ab der 48. Inkubationsstunde über 16 Stunden Acetat (615 mg/L, 7.5 mM) kontinuierlich mittels Pumpe hinzugefüttert. Nach 72 Stunden wurden beide Fermenter geerntet und nach standardisiertem Protokoll aufgearbeitet (B XI4.1).

Der Stamm Gö 40/10, dem ausschließlich Glyphosat (41) in der 40. Inkubationsstunde zugefügt wurde, wuchs auffällig gut. Der Stamm Tü 1892 dem sowohl einmalig Glyphosat (41) als auch Acetat über 16 Stunden kontinuierlich zugefüttert wurde, wuchs ebenso gut wie der Stamm Gö 40/10. Im Vergleich zu Kulturen unter Normalbedingungen konnte keine Wachstumshemmung der Ansamycinfamilie und keine Produktionssteigerung an Collinolacton (7) festgestellt werden.

### 3.5. Zusatz von Oberflächenmaterial

Am Beispiel des Adsorberharzes XAD ist der günstige Einfluss von Materialien mit großen Oberflächen und adsorbierenden Eigenschaften auf das Metabolitenmuster in früheren Studien mehrfach gezeigt worden. So wurde festgestellt, dass es unter Gegenwart von XAD in der Kulturlösung zu einer Ausbeutesteigerung der bekannten Sekundärstoffe sowie zur Bildung neuer Sekundärmetaboliten kommen kann.<sup>[74]</sup> Die Ursache für diesen Effekt ist bisher ungeklärt. Eine mögliche Interpretation ist, dass XAD als Stressfaktor wirkt.<sup>[75]</sup> Als Beispiel für einen Naturstoff, der erst nach Zugabe von XAD gebildet wurde, sei Exfoliamycin genannt.<sup>[76]</sup>

Als Zusatz für die Fermentation des Stammes Tü 1892 wurde Amberlite® XAD-2 in einer Konzentration von je 20 g/L gewählt. Die Kultivierung des Stammes erfolgte in Schüttelkolben (300 mL mit 100 mL SM-Medium, 28°C, 250 rpm). Die Hauptkultur wurde mit einer 48 h alten Vorkultur, von Agarplatte angeimpft, inokuliert. Das sterile, mit Wasser angefeuchtete XAD-2 wurde der Fermentation nach Anwachsen des Stammes in der 12. Inkubationsstunde hinzugefügt. Die Aufarbeitung der Kulturbrühe erfolgte standardmäßig nach 72 Stunden. Alle gebildeten Metabolite, die dem Polaritätsfester des Harzes entsprachen, so auch Collinolacton (7), befanden sich nach Filtration im XAD-haltigen Rückstand. Man extrahierte das XAD mit MeOH. Die Ausbeute an Collinolacton (7) konnte in Schüttelkultur von 3.7 mg/L um 100% auf 7.4 mg/L gesteigert werden. Aus diesem Grund wurde auch eine Airlift-Fermentation durchgeführt, der XAD-2 zugesetzt wurde, um eine möglichst große Menge an Collinolacton (7) zu gewinnen, und die gewünschten Experimente zur Isolierung und Derivatisierung für die Strukturaufklärung durchführen zu können. Tabelle 4 ist zu entnehmen, dass der Zusatz von XAD-2 zur Fermentation im Airlifter eine weitere Produktionssteigerung an Collinolacton (7) zur Folge hatte (11.4 mg/L).

Kultivierungsgefäß	Ausbeute von 7 ohne XAD-Zusatz in mg/L	Ausbeute von 7 mit XAD- Zusatz in mg/L
Schüttelkultur	3.7	7.4
Airliftfermenter	7.0	11.4

**Tabelle 4:** Vergleich der Ausbeuten an Collinolacton (7) in mg/L bei Kultivierung des Stammes Tü 1892 mit und ohne Zusatz von Amberlite® XAD-2.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für eine optimale Kultivierung von *Streptomyces* sp. Gö 40/10 und Tü 1892 zur Produktion von Collinolacton (7) die Vorkultur 48 h inkubiert werden muss und für die Hauptkultur eine Inkubation von 72 h optimal ist. Die gute

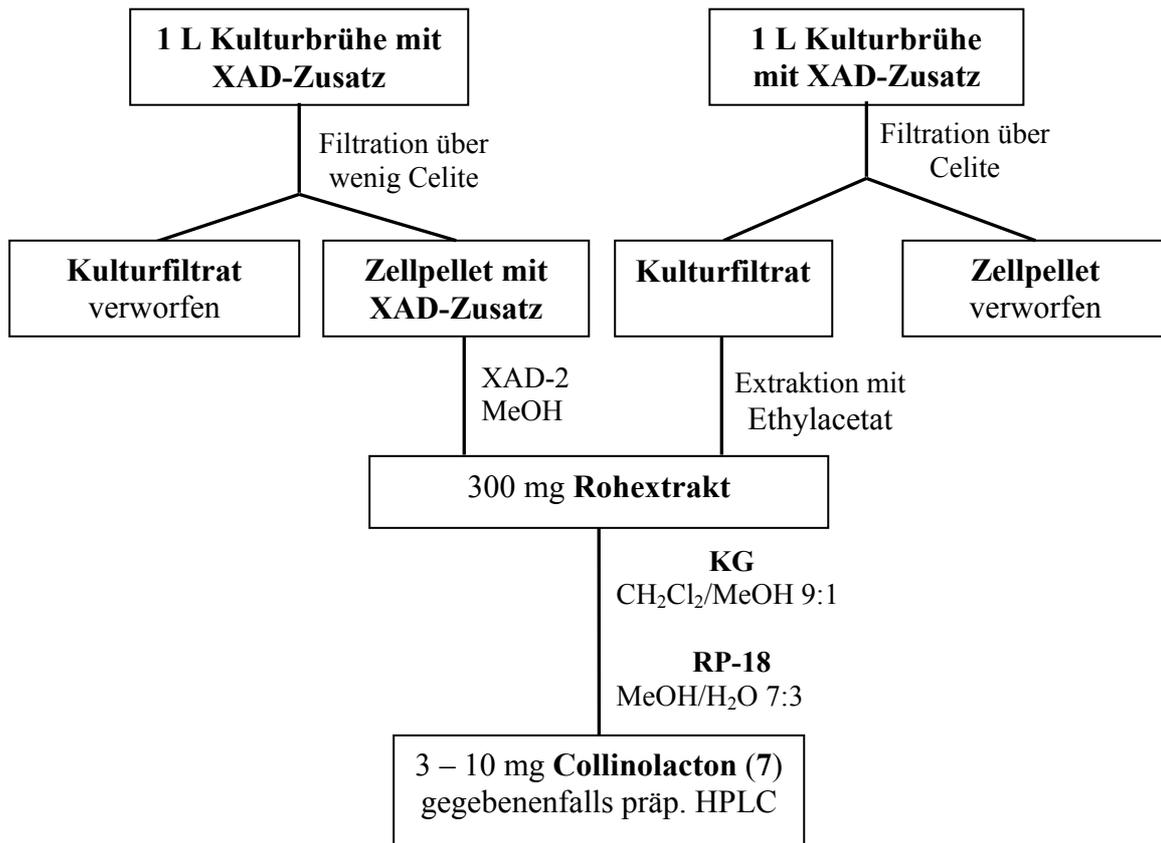
Sekundärstoffproduktion bei 250 rpm lässt darauf schließen, dass der Stamm eine gute Belüftung bevorzugt. Deshalb ist eine Fermentation im 1 L Maßstab mit maximaler Belüftung angeraten. Die Auswertungen mehrerer Testreihen ergab, dass der Stamm *Streptomyces collinus* Tü 1892 unter diesen Voraussetzungen größere Mengen Collinolacton (7) produziert. Nur geringe Mengen Entschäumer NIAX können zur Fermentation des Stammes Tü 1892 zugefügt werden. Durch die Fütterung von Glyphosat (41) und Acetat zusätzlich zur Fermentation konnte keine Ausbeutesteigerung erzielt werden. Im Gegensatz dazu kann durch Zugabe von Amberlite® XAD-2 (Adsorberharz) zur Fermentation eine erhebliche Produktionssteigerung von 100% des Collinolactons (7) erzielt werden.

Die Ausbeute an Collinolacton (7) konnte verglichen mit Vorarbeiten von H.-J. SCHIEWE von 0.25 mg/L (50 L, Hafermedium) auf 11.4 mg/L aus Ansätzen im 10 L Airlift-Fermenter (5 bar) unter Zugabe von XAD-2 gesteigert werden.

#### 4. Aufarbeitung und Isolierung

Zur Isolierung von Collinolacton (7) wurde die tief olivgrüne Kulturbrühe zunächst mit 0.5 M HCl bzw. 0.5 M NaOH auf pH ~ 5.0 eingestellt. Die Zugabe von reichlich Hyflocelite erleichterte die Trennung der Kulturbrühe in Mycel und Kulturfiltrat durch Filtration. Bei einer Fermentation ohne XAD-Zusatz, brauchte nur das Kulturfiltrat weiterbearbeitet zu werden. Das Mycel wurde verworfen, da es nachweislich per DC kein Collinolacton (7) enthielt. Es wurde dreimal mit gleichen Kulturfiltrat-Volumina Ethylacetat ausgeschüttelt. Enthielt die Fermentation als Zusatz Amberlite® XAD-2, so wurde das vom Kulturfiltrat durch Filtration abgetrennt und verworfen, da es keine Metabolite mit der Polarität des Collinolactons (7) enthielt (DC-Kontrolle). Das Mycel-XAD-Gemisch wurde mit MeOH (300 mL pro Liter Kulturbrühe) im Ultraschallbad extrahiert (15 min).

Die Chromatographie der Rohextrakte (ca. 300 mg/L) erfolgte an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1) und an RP-18 (MeOH/H<sub>2</sub>O, 7:3) (Abbildung 24).



**Abbildung 24:** Flussdiagramm zur Aufarbeitung und Isolierung von Collinolacton (7).

## 5. Spektroskopische Charakterisierung des Collinolactons (7)

Wie in der Aufgabenstellung beschrieben (vgl. A I3) ist ein erster Strukturvorschlag von H.-J. SCHIEWE im Rahmen seiner Dissertation entstanden (Abbildung 25). Bei der Betrachtung der NMR-Spektren des Collinolactons (7) ergab sich, dass sowohl das <sup>1</sup>H- als auch das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum doppelte Signalsätze zeigten, die sich wie ein Isomerengemisch im Verhältnis 4:1 verhalten. H.-J. SCHIEWE führte diese Beobachtung darauf zurück, dass sich das Collinolacton (7) als *E/Z*-Isomerengemisch, der nicht-konjugierten Doppelbindung (C-14/C-15) vorliegt. Diese Annahme begründete er damit, dass die Signallagen von C-14 und C-15 um  $\Delta\delta_C = 15.3$  bzw.  $12.3$  ppm unterscheiden und die von 15-H um  $\Delta\delta_H = 1.63$  ppm. Die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Signale der Methylgruppe an Position 19 erfahren eine starke Tieffeldverschiebung, um  $\Delta\delta_C = 11.1$  ppm und  $\Delta\delta_H = 0.45$  ppm.

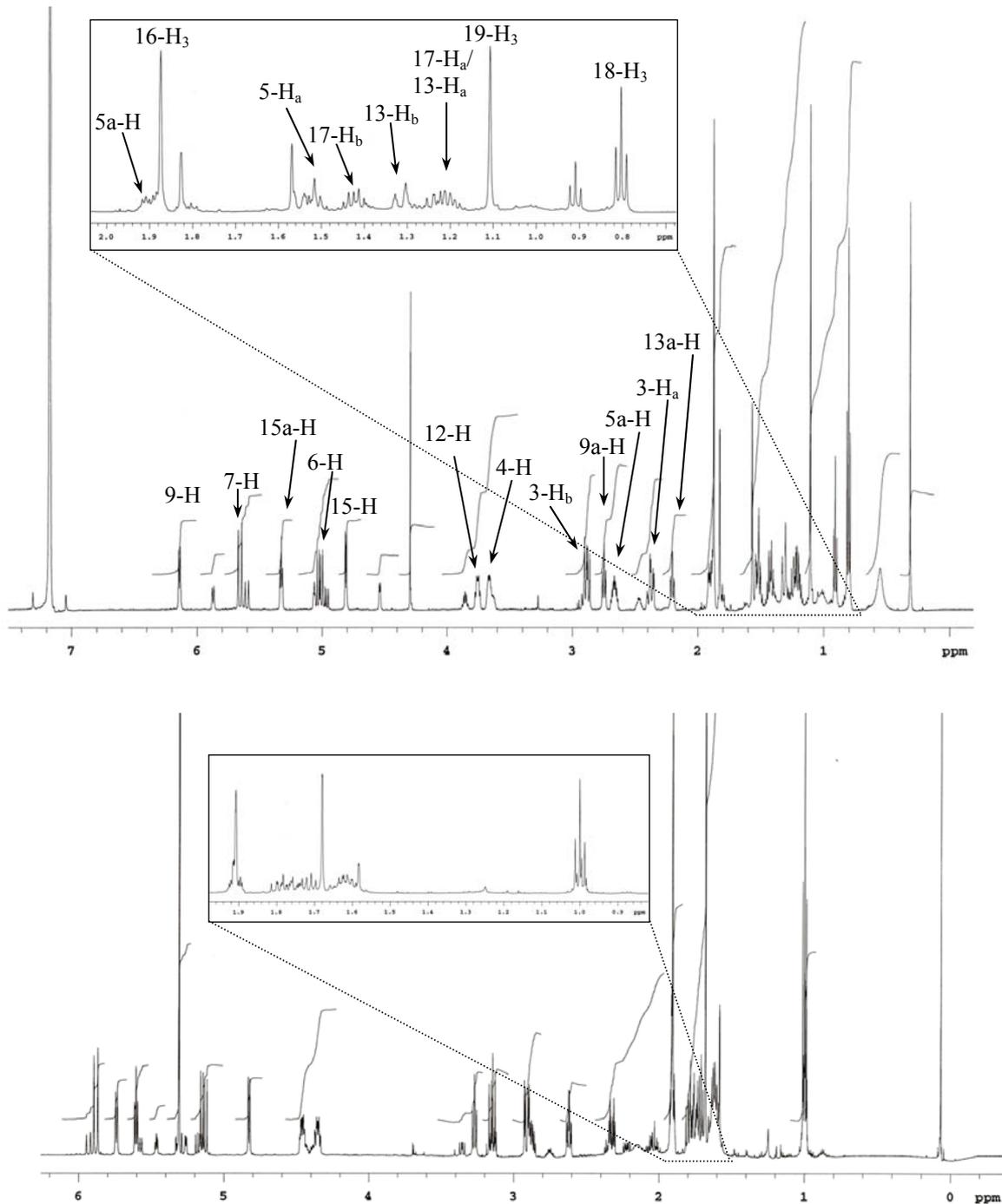


zur Summenformel  $C_{21}H_{28}O_5$ , woraus sich acht Doppelbindungsäquivalente ergaben. Im IR-Spektrum waren intensive Banden bei  $\tilde{\nu}_{\max} = 3428, 1725$  und  $1638\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen, die auf eine Hydroxylgruppe, ein Säurederivat und eine C-C-Doppelbindung schließen ließen. Des Weiteren wurden für den Sekundärmetaboliten im Fingerprint-Bereich Schwingungsbanden bei  $\tilde{\nu}_{\max} = 2959, 2362, 1450, 1381, 1266, 1200, 1143, 1019\text{ cm}^{-1}$  gefunden. Das UV-Spektrum (MeOH) zeigte ein für den Naturstoff charakteristisches Absorptionsmaximum bei 240 nm.

### 5.1. Auswertung der 1 D- und 2 D-NMR-Spektren der Hauptkomponente

Da die Strukturaufklärung des Collinolactons (**7**) mit seiner Minderkomponente von Grund auf neu erarbeiten werden sollte, wurde versucht, NMR-Spektren mit verbesserter Separierung der Signalmuster zu erhalten. 1 D- und 2 D-NMR-Spektren in  $C_6D_6$  ergaben Signalsätze, die es zuließen, den kompletten Daten-Satz für die Minderkomponente zu erhalten und diese für eine unabhängige Strukturaufklärung heranzuziehen. Man kann vermuten, dass durch den Einfluss des Anisotropiekegels des Benzols auf das Collinolacton (**7**) die hohe Signaldichte ( $^1H$ ) zwischen 1 – 2 ppm, die bei Messungen in  $CD_2Cl_2$  zu beobachten war, gedehnt werden konnte (Abbildung 26).

Die  $^1H$ -NMR-Spektren von **7** zeigten unter den Messbedingungen (25°C, 600 MHz) sowohl in  $CD_2Cl_2$  als auch in  $C_6D_6$  ein Integralverhältnis von 4:1 für die beiden Collinolacton-Komponenten. Zur Charakterisierung der Hauptkomponente von **7** wurden alle Signale großer Intensität ausgewertet. Im  $^1H$ -NMR-Spektrum ließen sich 27 Wasserstoffatome detektieren. Es zeigte drei Methyl-, vier Methylen- und zehn Methingruppen. Eine Methylgruppe ( $\delta_H = 0.81$ ) konnte als Teil einer Ethylgruppe identifiziert werden, da sie zum Triplett aufspaltete. Die beiden anderen Methylgruppen ( $\delta_H = 1.12, 1.81$ ) zeigten sich als Singulets und konnten so als an quartäre Kohlenstoffatome gebunden gelten. Sechs Protonen zwischen 1 – 2 ppm waren drei diastereotope Methylengruppen zuzuordnen. Das  $^1H$ -NMR-Spektrum zeigte sieben Wasserstoffatome in dem Bereich von 2 – 4 ppm und fünf weitere zwischen 4.8 – 6.2 ppm. Letztere konnten als Protonen von Doppelbindungen zugeordnet werden.



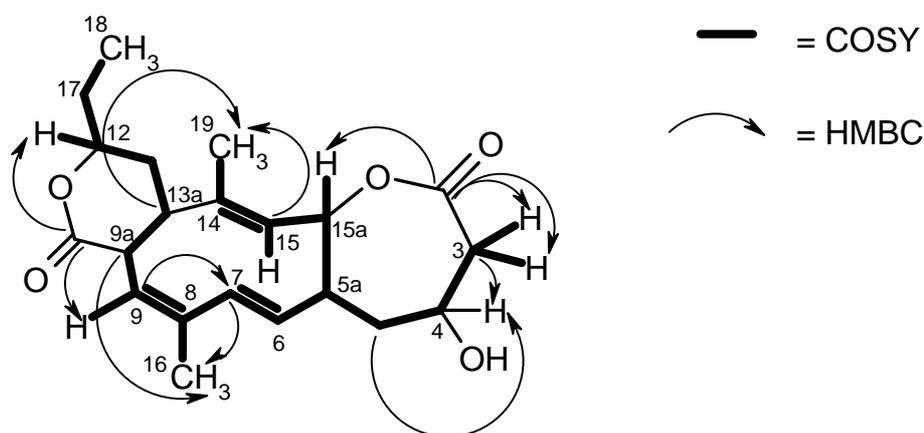
**Abbildung 26:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektren (600 MHz) des Collinolactons (7) in zwei unterschiedlichen Lösungsmitteln: C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> mit gut separierten Signalen in dem Bereich  $\delta_{\text{H}} = 0.8 - 2.0$  ppm (oben) und CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mit dem Bereich der <sup>1</sup>H-NMR-Signale bei  $\delta_{\text{H}} = 0.8 - 2.0$  ppm (unten).

Das <sup>13</sup>C-NMR Spektrum zeigte 21 Kohlenstoffatome. Zwei Kohlenstoffatome konnten als Carbonyl-Kohlenstoffatome von Estergruppen ( $\delta_{\text{C}} = 170.2, 172.2$ ) identifiziert werden. Zwei quarternäre olefinische C-Atome ( $\delta_{\text{C}} = 133.1, 135.0$ ), vier olefinische Methingruppen ( $\delta_{\text{C}} = 124.4, 126.5, 134.0, 139.0$ ) waren spezifisch für drei Doppelbindungen. Desweiteren waren

sechs aliphatische Methingruppen, von denen drei in Nachbarschaft zu Sauerstoffatomen standen, vier Methylengruppen und drei Methylgruppen, zu erkennen. Eine Zuordnung der Protonen zu den an sie gebundenen Kohlenstoffatomen erfolgte mittels eines HSQC-Experiments (150.8 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>).

Von den aus der Summenformel abgeleiteten acht Bindungsequivalenten wurden zwei den Carbonylgruppen und drei den Doppelbindungen zugeordnet. Die drei verbleibenden Doppelbindungsequivalente und die Konnektivitäten zwischen den protonen tragenden Gruppen, die durch die Auswertung eines COSY-Experiments erfasst wurden, führten zu einem tricyclischen Kohlenstoffgerüst für die Struktur des Collinolactons (7).

Da das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> nur 27 Protonen zeigte, und die Summenformel aus der hochauflösenden Massenspektrometrie 28 Protonen, sowie ein weiteres Sauerstoffatom aufwies und das IR-Spektrum eine breite Bande bei 3428 cm<sup>-1</sup> zeigte, konnte man davon ausgehen, dass die Struktur eine Hydroxylfunktion trägt. Über die Auswertung des HMBC-Experiments konnte die Position der Hydroxylfunktion in β-Stellung zur Carbonylgruppe (δ<sub>C</sub> = 170.2) bestimmt werden. Abbildung 27 zeigt die Struktur des Collinolactons (7), die aus den <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-COSY Konnektivitäten und <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HMBC Korrelationen abgeleitet wurde. Die Struktur der Hauptkomponente 7 stimmte mit den Literaturdaten<sup>[44]</sup> des vorgeschlagenen *E*-Isomers von H.-J. SCHIEWE überein.

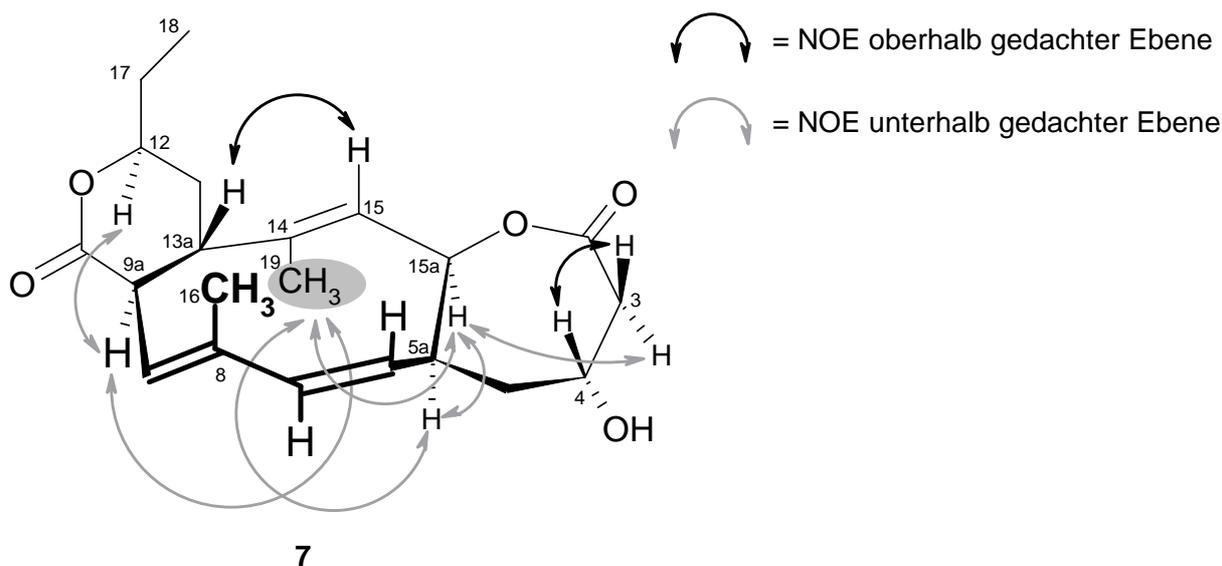


**Abbildung 27:** <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H (fett) und <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C (Pfeile) Konnektivitäten des Collinolactons (7) aus COSY- und HMBC-Experimenten (ausgewählte HMBC Korrelationen).

Der Doppelbindung C-6/C-7 wurde die *E*-Konfiguration ( $J_{6-7} = 16.5$  Hz) zugeordnet. Bei den methylsubstituierten Doppelbindungen lässt sich die Konfiguration mit Hilfe der chemischen Verschiebung des Signals der Methylgruppe zuordnen. So erscheinen Methylgruppensignale *Z*-konfigurierter Doppelbindungen gegenüber den entsprechenden *E*-konfigurierten

Verbindungen im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum deutlich tieffeldverschoben. Die Methylgruppe an C-16 liegt bei  $\delta_{\text{C}} = 19.0$ , was für eine *Z*-Konfiguration der Doppelbindung C-8/C-9 spricht, während die Methylgruppe an C-19  $\delta_{\text{C}} = 12.5$  eine *E*-Anordnung für die Doppelbindung C-14/C-15 anzeigt.

Zur Aufklärung der relativen Stereochemie des tricyclischen Systems wurde ein 2 D NOESY-Experiment durchgeführt. Durch NOE-Effekte kann sich die Magnetisierung eines Protons auf andere, räumlich nahestehenden Protonen übertragen. Diese Übertragung erfolgt nicht über Bindungen, sondern durch den Raum über eine Distanz zwischen den  $^1\text{H}$ -Atomen von maximal 5 Å. In Abbildung 28 sind ausgewählte NOE Korrelationen gekennzeichnet, die sowohl die Konfiguration aller drei Doppelbindungen, als auch die relative Stereochemie der sechs Chiralitätszentren bestätigen. Eine Schlüsselrolle bei der Auswertung dieses Spektrums spielte 19-H<sub>3</sub>, das im Modell der Verbindung auf der Unterseite einer durch den zehngliedrigen Ring gedachten Ebene liegt.



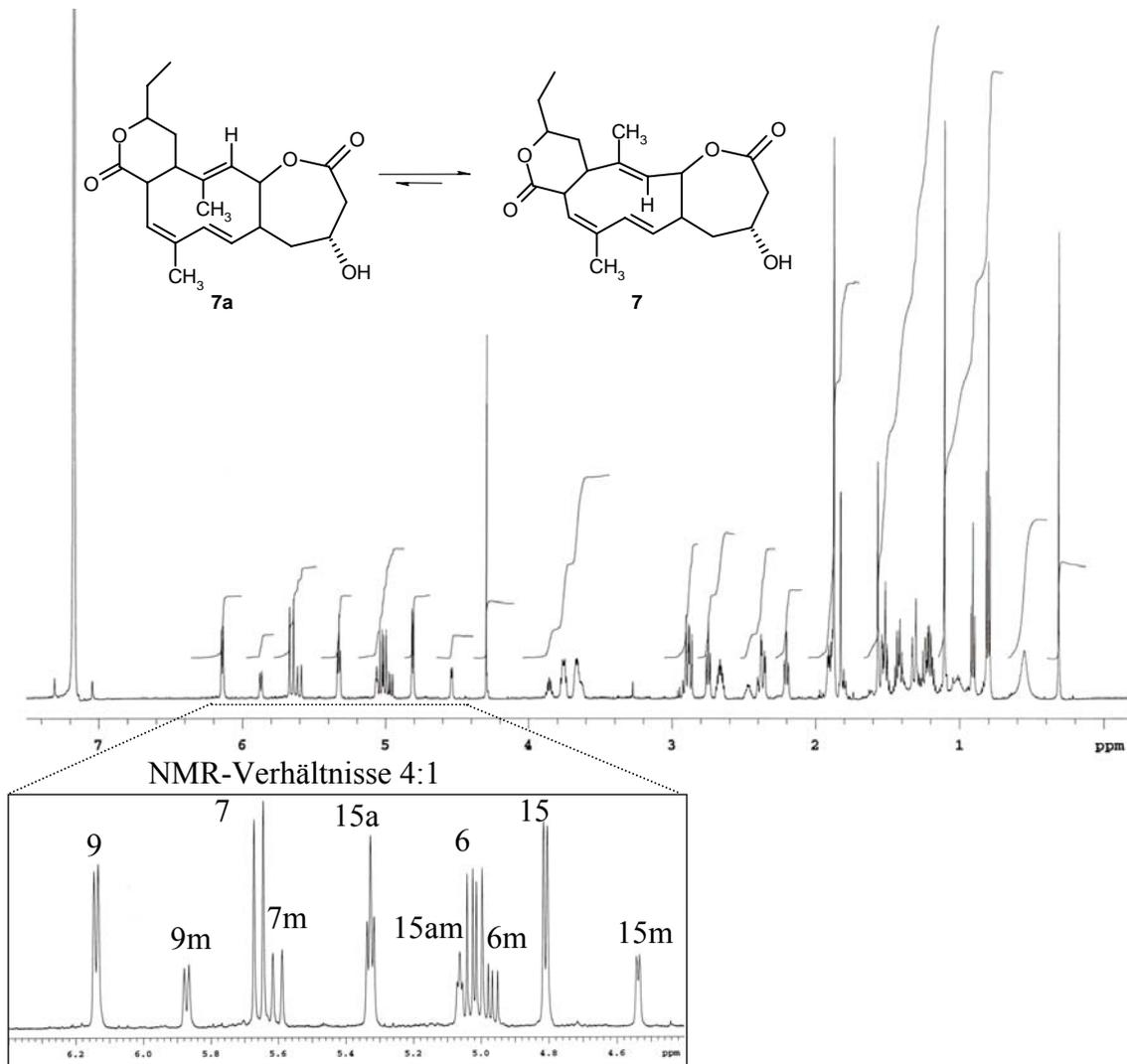
**Abbildung 28:** Relative Stereochemie des Collinolactons (7) gezeigt an fünf charakteristischen NOE-Korrelationen (Pfeile gestrichelt, unterhalb der gedachten Ebene und Pfeile durchgehend, oberhalb der gedachten Ebene).

Die Korrelationen mit 5a-H, 9a-H, 12-H und 15a-H zeigten, dass diese ebenfalls unterhalb der Ebene liegen. Das Proton 15a-H korreliert mit 3-H<sub>a</sub>, welches somit auch unterhalb der gedachten Ebene liegt. 3-H<sub>b</sub>, welches sich damit oberhalb der gedachten Ebene befindet zeigte ein Kreuzsignal zu 4-H, das sich demnach oberhalb befindet. Weiterhin war ein Kreuzsignal zwischen 13a-H und 15-H zu sehen, was die *E*-Konfiguration der isolierten Doppelbindung

sowie die Lage der beiden Protonen oberhalb der gedachten Ebene beweist, so dass sich daraus die in Abbildung 28 gezeigte relative Konfiguration des Moleküls ergab.

## 5.2. Strukturaufklärung der Minderkomponente des Collinolactons

Neben den 21  $^{13}\text{C}$ -NMR Signalen mit großer Intensität zeigte das NMR-Spektrum (150.8 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) auch einen Signalsatz von 21 Kohlenstoffatomen relativ niedriger Intensität. Die meisten Signale waren nur wenig von den Signalen hoher Intensität verschoben. Auch das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (600 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) zeigte einen doppelten Signalsatz (Abbildung 29) mit zweimal 27 Protonen mit relativ ähnlichen chemischen Verschiebungen und identischem Signalmuster.



**Abbildung 29:**  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) des Collinolactons (7/7m). Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigt einen doppelten Signalsatz an Protonen im Verhältnis von 1:4.

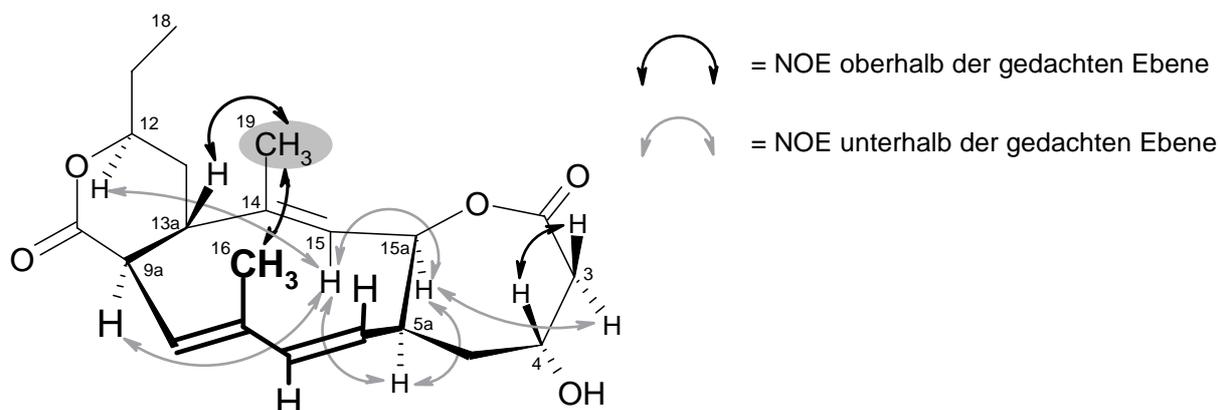
Nur an einer Stelle im Molekül unterschieden sich die Datensätze der Haupt- (**7**) und Minderkomponente (**7m**) wesentlich. Die Kohlenstoffatome C-14, C-15 und C-19 mit den dazugehörigen Protonen unterscheiden sich signifikant in ihren Daten der  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, HMBC- und NOESY-Experimente. Der Strukturunterschied zwischen der Haupt- (**7**) und Minderkomponente (**7m**) war daher an der Doppelbindung C-14/C-15 zu suchen. Besonders der Tieffeldshift für **7m** von C-19 ( $\Delta\delta_{\text{C}} = + 11.1$  ppm) und der Hochfeldshift von 15-H ( $\Delta\delta_{\text{H}} = - 0.30$  ppm) bekräftigten diese Vermutung. Ebenso erfuhr das quartäre Atom C-14 einen Tieffeldshift ( $\Delta\delta_{\text{C}} = + 15$  ppm). Diese Daten ließen H.-J. SCHIEWE vermuten, dass die Doppelbindung C-14/C-15 als *E/Z*-Isomerengemisch vorliegt.<sup>[44]</sup> Eine sorgfältige Auswertung der Spektren aus den 2 D-NMR-Experimenten sollte zeigen, ob sich diese Strukturhypothese halten ließ.

Die Auswertung des COSY-Experiments zeigte für die Komponente **7m** ausschließlich dieselben Konnektivitäten wie die der Hauptkomponente (**7**). Eine zweifelsfreie Zuordnung der Protonen zu den benachbarten Kohlenstoffatomen gelang durch ein HSQC-Spektrum.

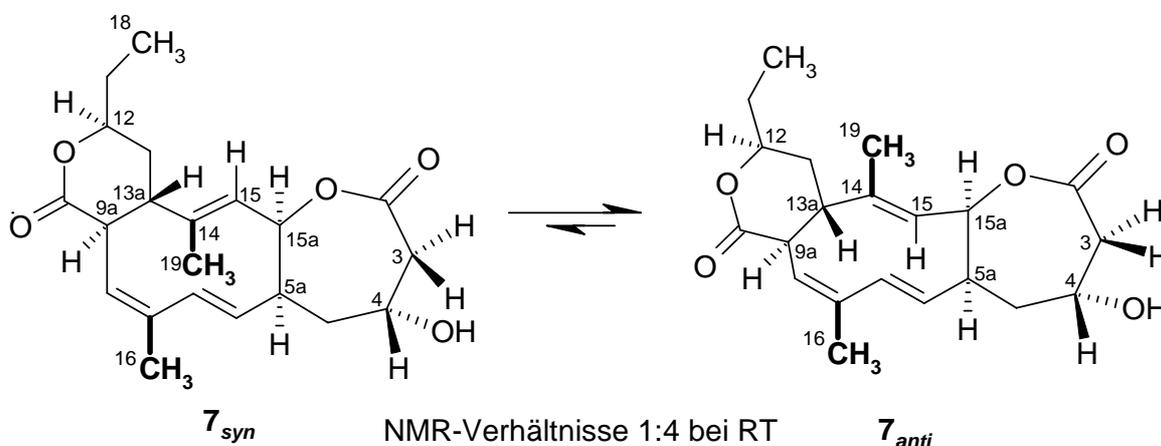
Das HMBC- und das NOESY-Experiment zeigten deutliche Unterschiede für die Molekülregion der Doppelbindung C-14/C-15. Ausgewählte  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -Korrelationen des NOESY-Experiments wurden in Abbildung 30 zusammengefasst. Für die räumliche Zuordnung haben die NOE-Kreuzsignale von 15-H und 19-H<sub>3</sub> eine Schlüsselfunktion. Zeigte in der Hauptkomponente (**7**) 15-H ausschließlich Kreuzsignale zu Protonen oberhalb der gedachten Ebene, so zeigt es jetzt ausschließlich Korrelationen zu Protonen unterhalb der Ebene, namentlich 5a-H, 9a-H, 12-H, 15a-H. Das sind genau jene Protonen, zu denen die Methylgruppe 19-H<sub>3</sub> der Hauptkomponente (**7**) Korrelationen zeigte. Das sich an der Konfiguration der übrigen Protonen nichts verändert hat, ließ sich anhand des Protons 15a-H, das mit 3-H<sub>a</sub> korreliert, die sich somit beide unterhalb der gedachten Ebene befinden wie in der Hauptkomponente (**7**), zeigen. 3-H<sub>b</sub>, welches sich damit oberhalb der gedachten Ebene befindet zeigte ein Kreuzsignal zu 4-H, das sich oberhalb befindet. Die zweite Schlüsselfunktion übernimmt die Methylgruppe 19-H<sub>3</sub>, die in der Minderkomponente (**7m**) Kreuzsignale zu 13a-H und 16-H aufweist, die beide in der Minderkomponente (**7m**) ebenso oberhalb der gedachten Ebene liegen, wie in der Hauptkomponente (**7**).

An Abbildung 30 ist deutlich zu erkennen, dass C-15 zweifelsfrei in der unteren Molekülebene lokalisiert sein muss, um sich in der Nachbarschaft der Protonen 5a-H, 9a-H, 12-H und 15a-H zu befinden. Somit zeigten sich im HMBC-Experiment die gegensätzlichen Korrelationen im Vergleich zur Hauptkomponente (**7**). Ebenso hat C-19 eine andere Stellung im Molekül eingenommen und befindet sich in der Nähe von 13a-H und 16-H<sub>3</sub> also

zweifelsfrei oberhalb der Molekülebene. Dies widerlegt die Annahme von H.-J. SCHIEWE, dass es sich bei der Minderkomponente um das *Z*-Isomer des Collinolactons (**7**) handelt.<sup>[44]</sup> In diesem Fall müssten 19-H<sub>3</sub> und 15-H entweder beide unterhalb oder beide oberhalb der Molekülebene liegen.



**Abbildung 30:** Relative Stereochemie und ausgewählte NOE-Korrelationen zur Verifizierung der Konformation der Minderkomponente des Collinolactons (**7m**). (Pfeile gestrichelt, unterhalb der gedachten Ebene und Pfeile durchgehend, oberhalb der gedachten Ebene)



**Abbildung 31:** Hauptkomponente (*anti*), Minderkomponente (*syn*) des Collinolactons (**7**).

Es handelt sich bei der Minderkomponente um ein Rotamer des Collinolactons (**7<sub>syn</sub>**), eine Verbindung gleicher Stereokonfiguration, die durch Rotation des Molekülfragments C14/C15/C19 um die Bindungen 13a/14 und 15a/15 mit der Hauptkomponente im dynamischen Gleichgewicht steht. Folglich liegt die Doppelbindung C-14/C-15 um 180° gekippt, aber weiterhin in *E*-Konfiguration, vor (Abbildung 31). Im Folgenden wird die Hauptkomponente des Collinolactons (**7**) folgerichtig als *anti*-Collinolacton (**7<sub>anti</sub>**) und die Minderkomponente als *syn*-Collinolacton (**7<sub>syn</sub>**) bezeichnet. Die Bezeichnung *anti* und *syn*

bezieht sich auf die Methylgruppen C-16 und C-19 und ihre relative Stellung zueinander (Abbildung 31, fett). Das Collinolacton (**7**) liegt also in *anti*- und *syn*-Konformation vor, die in NMR-Experimenten im Verhältnis 4:1 beobachtet wurden, aber in der Chromatographie als einheitliche Verbindung erschienen.

Position C-Atom	Mult.	$\delta_C$		$\delta_H$	
		$\tau_{anti}$	$\tau_{syn}$	$\tau_{anti}$	$\tau_{syn}$
2	C	170.3	170.2	-	-
3	CH <sub>2</sub>	42.7	42.9	2.40 2.90	2.40 2.90
4	CH	62.3	62.2	3.62	3.61
5	CH <sub>2</sub>	34.6	35.2	1.55 1.91	1.41 1.91
5a	CH	43.1	44.2	2.65	2.47
6	CH	126.5	123.9	5.00	4.89
7	CH	139.0	138.4	5.62	5.60
8	C	135.0	137.0	-	-
9	CH	124.4	121.4	6.18	5.84
9a	CH	40.3	46.2	2.78	2.91
10	C	172.4	172.2	-	-
12	CH	77.0	77.2	3.78	3.85
13	CH <sub>2</sub>	32.4	34.8	1.22 1.32	1.52 1.52
13a	CH	46.3	45.1	2.20	1.78
<b>14</b>	<b>C</b>	<b>133.1</b>	<b>148.0</b>	-	-
<b>15</b>	<b>CH</b>	<b>134.0</b>	<b>121.6</b>	<b>4.80</b>	<b>4.50</b>
15a	CH	81.7	79.5	5.30	5.10
16	CH <sub>3</sub>	19.0	20.2	1.88	1.80
17	CH <sub>2</sub>	28.2	28.5	1.20 1.43	1.27 1.53
18	CH <sub>3</sub>	9.2	9.9	0.81	0.95
<b>19</b>	<b>CH<sub>3</sub></b>	<b>12.5</b>	<b>23.6</b>	<b>1.12</b>	<b>1.57</b>

**Tabelle 5:** <sup>13</sup>C- und <sup>1</sup>H-NMR-Daten (600 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) des *anti* und *syn* Isomers des Collinolactons (**7**) im Vergleich. Hervorgehoben (fett) die chemischen Verschiebungen der Doppelbindung C-14/C-15 und der benachbarten Methylgruppe C-19.

Ein Naturstoff oder eine synthetische Verbindung mit der Kombination der Strukturelemente: 7-10-6 tricyclisches Kohlenstoffgrundgerüst, sechs Chiralitätszentren und die beschriebenen Funktionalitäten, ist bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Damit wurde nicht nur ein neuer Naturstoff aufgeklärt sondern auch eine neue Substanzklasse beschrieben.

### 5.3. Nachweis der Existenz von Collinolacton-Rotameren

#### *NMR-Experimente bei unterschiedlichen Temperaturen*

In den NMR-Experimenten bei Raumtemperatur (RT) waren beide Komponenten  $7_{anti}$  und  $7_{syn}$  des Collinolactons einzeln beobachtbar und ihre Signale waren nicht gemittelt. Da in der HPLC-Analyse eine einheitliche Verbindung gefunden wurde, wurde die These aufgestellt, dass ein im Vergleich zur NMR-Zeitskala langsamer Übergang zwischen *anti*- und *syn*-Collinolacton (**7**) stattfindet. Um dies näher zu untersuchen wurde eine temperaturabhängige Serie von  $^1\text{H}$ -NMR-Experimenten von  $-50^\circ\text{C}$  bis  $+100^\circ\text{C}$  durchgeführt. Im Rahmen der Dissertation von H.-J. SCHIEWE wurden NMR-Experimente bei  $+25^\circ\text{C}$ ,  $+50^\circ\text{C}$  und  $+75^\circ\text{C}$  durchgeführt. Es wurden keine Veränderungen der Integrale beobachtet, so dass lange an der These der *E*-/*Z*-Isomerie festgehalten wurde. In der Versuchsreihe im Rahmen dieser Arbeit wurden die Integrale der  $^1\text{H}$ -NMR-Signale der Protonen von 9-H, 7-H, 15a-H und 6-H in Bezug auf ihr *anti/syn*-Verhältnis hin untersucht. Die Signale dieser Protonen liegen voneinander getrennt vor und sind ausreichend separiert, so dass ihre Integrale auch bei höherer Temperatur stets getrennt ausgewertet werden konnten. Das Lösungsmittel musste innerhalb der Versuchsreihe gewechselt werden, da es kein geeignetes Lösungsmittel gibt, das über den gesamten Temperaturbereich angewendet werden konnte. Da aber bei Raumtemperatur in allen bisher getesteten Lösungsmitteln ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ,  $\text{d}_6$ -DMSO) das Verhältnis der Integrale immer 4:1 war, konnte davon ausgegangen werden, dass der Lösungsmittelwechsel keinen bedeutenden Einfluss auf das Rotamerenverhältnis nehmen sollte. Wie für das Vorhandensein von Rotationsisomeren zu erwarten war, zeigten die Integralintensitäten kein signifikantes temperaturabhängiges Verhalten (Tabelle 6). Eine Tendenz wurde jedoch deutlich. Das Verhältnis von *anti*- zu *syn*-Collinolacton wurde mit steigender Temperatur ausgeglichener. Die Experimente ergaben Verhältnisse von 4.48:1 bei  $-50^\circ\text{C}$  bis zu 1.88:1 bei  $+75^\circ\text{C}$ . Bei  $100^\circ\text{C}$  trat langsame Zersetzung ein, so dass dieser Wert eventuell fehlerbehaftet war. Ebenso muss der Wert bei  $-50^\circ\text{C}$  kritisch beurteilt werden, da bei niedrigen Temperaturen die Umwandlung verlangsamt wird und das Verhältnis eingefroren wird. Die Ergebnisse der Temperaturreihe von  $-50^\circ\text{C}$  –  $+100^\circ\text{C}$  sind in Tabelle 6 dargestellt.

Temperatur in °C	Lösungsmittel	Verhältnisse von $K_{anti/syn}$ -Collinolacton
100	$d_6$ -DMSO	(1.94:1) Zersetzung
75	$d_6$ -DMSO	1.88:1
50	$d_6$ -DMSO	2.98:1
22	$CD_2Cl_2$	3.93:1
-20	$CD_2Cl_2$	4.77:1
-50	$CD_2Cl_2$	4.48:1

**Tabelle 6:** Integralverhältnisse von *anti/syn*-Collinolacton (7) temperaturabhängiger  $^1H$ -NMR-Experimente.

Obwohl die temperaturabhängigen NMR-Experimente aufgrund der thermischen Instabilität nicht über einen wünschenswert großen Temperaturbereich durchgeführt werden konnten, soll an dieser Stelle eine thermodynamische Betrachtung angestellt werden. Bei einem Isomerengleichgewicht von *syn*- und *anti*-Produkten setzt sich die auftretende freie Gibbsenthalpie aus der Wärmetönung  $\Delta H$  und dem entropischen Anteil  $-T \cdot \Delta S$  zusammen. Gleichung 1 beschreibt den Zusammenhang zwischen der freien Bindungsenergie  $\Delta G$  (formuliert als Gibb'sche Energie) und Temperatur  $T$  und Gleichgewichtskonstante  $K_{anti/syn}$ , die in der Thermodynamik als Verhältnis von Produkt zu Edukt definiert ist, sowie die Aufteilung in enthalpischen und entropischen Anteil ( $T \cdot \Delta S$ ).  $R$  entspricht dabei der universellen Gaskonstante.

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln K = \Delta H - T \cdot \Delta S \Rightarrow \ln K = \frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} - \frac{T\Delta S}{RT}$$

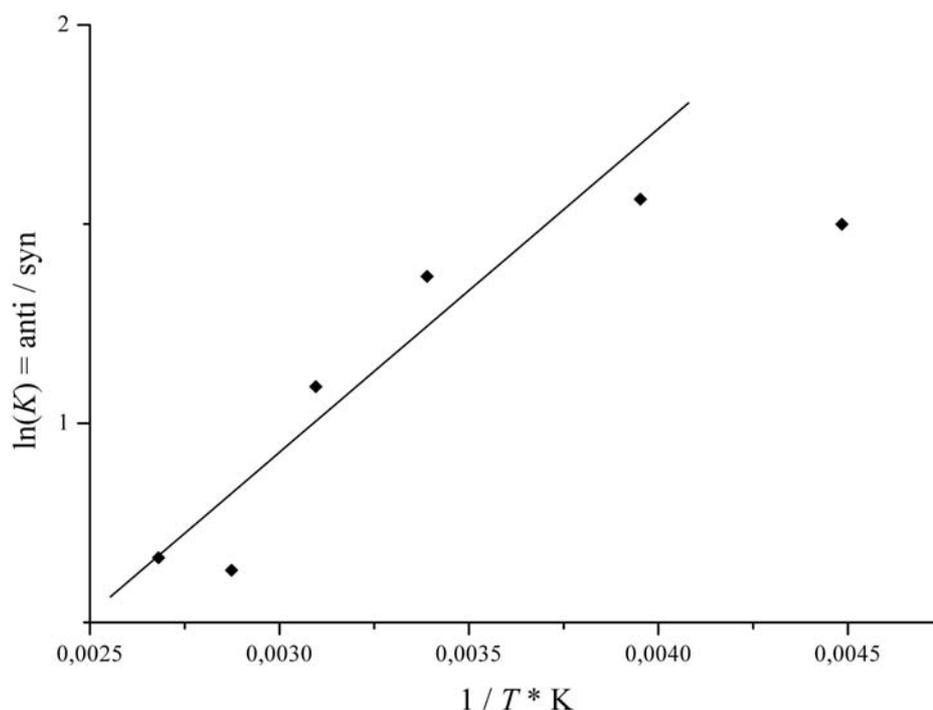
**Gleichung 1:** Zur Berechnung der thermodynamischen Größen aus der van't Hoff-Auftragung.

Die Wärmetönung  $\Delta H$  wurde aus dem Anstieg ( $\Delta H/R$ ) der angepassten Gerade der Auftragung von  $\ln K$  gegen  $1/T$  (van't Hoff-Auftragung, Abbildung 32) bestimmt.  $\Delta G$  konnte direkt aus der Gleichgewichtskonstante  $K$  bei 298 K bestimmt werden (Gleichung 1). Der entropische Anteil wurde nach  $T \cdot \Delta S = \Delta H - \Delta G$  berechnet ( $T = 298$  K).

Substanz	$\Delta G$ in kJ/mol	$\Delta H$ in kJ/mol	$\Delta S$ in J/K · mol
<i>anti/syn</i> -Collinolacton (7)	- 6.8	- 3.4	- 11.3
<i>syn/anti</i> -[3.3]Metacyclophan	8.4	6.0	- 8.0
<i>E/Z</i> -Stilben	10.7 – 23.8	19.2	4.4

**Tabelle 7:** Vergleich berechneter thermodynamischer Größen des Collinolacton-Rotamers (7) mit Literaturwerten für ein *syn/anti*-Konformer<sup>[78]</sup> und ein *E/Z*-Isomer<sup>[79]</sup>.

Die Analyse der Temperaturabhängigkeit des Verhältnisses von *anti*- zu *syn*-Collinolacton (7) zeigte das typische Verhalten für Rotamere in einem dynamischen Gleichgewicht. Bei Zunahme der Temperatur wurde die energetische ungünstigere Minderkomponente gemäß der Boltzmannverteilung zunehmend besetzt und die Gleichgewichtskonstante konvergierte gegen 1.



**Abbildung 32:** Van't Hoff-Auftragung: Logarithmus der Gleichgewichtskonstante  $K$  gegen  $1/T$  (Tabelle 6). Achsenabschnitt  $A = -1.51$ ; Steigung  $B = 812$  K.

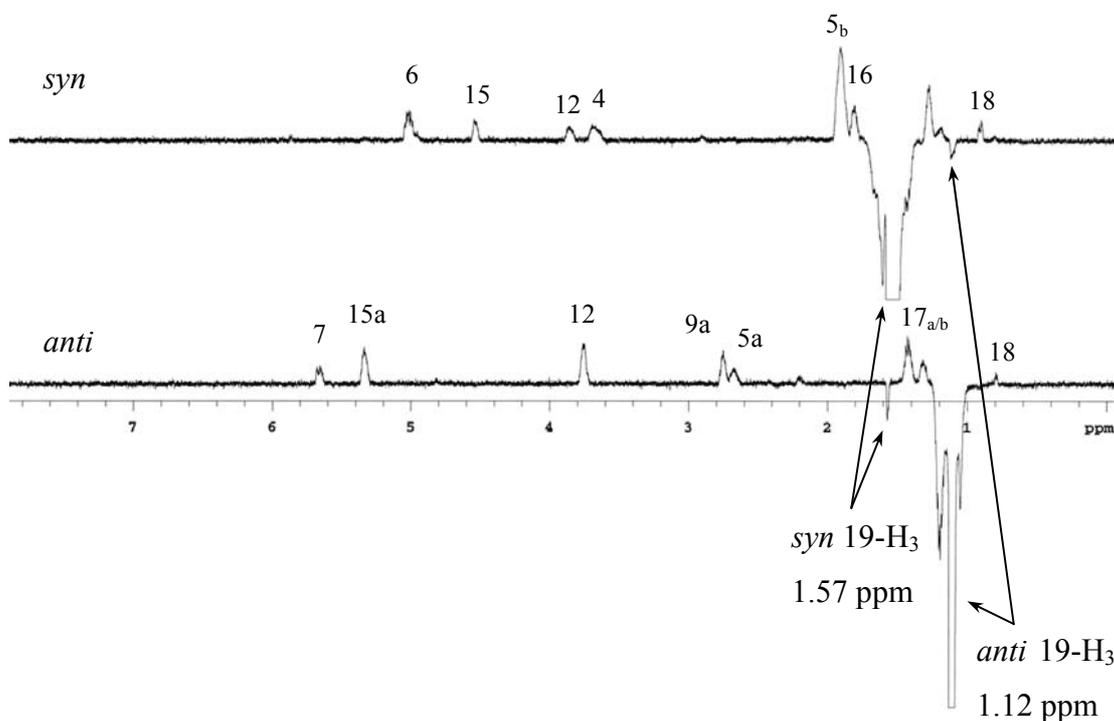
Die van't Hoff-Auftragung der Gleichgewichtskonstante ergab im zulässigen Temperaturbereich zwischen  $-20^\circ\text{C}$  und  $75^\circ\text{C}$  annäherungsweise ein lineares Verhalten, aus dem Werte für die Umwandlungsenthalpie  $\Delta H = -3.4$  kJ/mol und die Umwandlungsentropie

$\Delta S = -11.3 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$  errechnet werden konnten. Wenngleich die absoluten thermodynamischen Werte nicht als zuverlässig gelten können, so zeigt doch der Vergleich mit Beispielen aus der Literatur, dass sie sich im üblichen Bereich für Rotationsisomerie befinden. Insgesamt deutete die gefundene Temperaturabhängigkeit stark auf die postulierte dynamische Umwandlung zwischen *syn*- und *anti*-Collinolacton (**7**) im Bereich der NMR-Zeitskala hin.

#### *1 D- und 2 D-NOESY-Experimente*

In NOESY-Experimenten eines Moleküls von der Molmasse des Collinolactons (**7**) sind alle Diagonalpeaks von negativer Phase. Alle Crosspeaks, die durch Korrelationen hervorgerufen werden, haben hingegen eine positive Phase. Crosspeaks wiederum, die durch einen chemischen Austausch hervorgerufen werden, haben wie die Diagonalpeaks eine negative Phase.<sup>[80]</sup> Dieser Nachweis des chemischen Austauschs konnte für das Collinolacton (**7**) verwandt werden, um die Existenz einer dynamischen Rotationsisomerie zu belegen. Da viele Protonen der Haupt- und Minderkomponente sehr dicht beieinander lagen, wurde im 1 D NOESY-Spektrum nur auf solche Protonen selektiv eingestrahlt (19-H<sub>3</sub> bei  $\delta_{\text{Hanti}} = 1.12$  und bei  $\delta_{\text{Hsyn}} = 1.57$  ppm) die isoliert angeregt werden konnten. Die Methylgruppe 19-H<sub>3</sub> eignete sich für dieses Experiment ( $\Delta\delta_{\text{H}} = 0.45$  ppm). Nach Einstrahlung auf die *anti*-19-H<sub>3</sub> Methylgruppe wurde neben den erwarteten NOEs in der *anti*-Komponente bei positiver Phase ein Signal negativer Phase für *syn*-19-H<sub>3</sub> gefunden. Dieses Signal kam durch Umwandlung von *anti*- zu *syn*-Collinolacton (**7**) während der Mischzeit zustande und entspricht damit formal einem chemischen Austausch.

Die selektive Einstrahlung auf die *syn*-19-H<sub>3</sub>-Methylgruppe ergab das analoge Ergebnis mit NOEs positiver Phase in der Minderkomponente und einem einzigen NOE negativer Phase für *anti*-19-H<sub>3</sub>. Damit unterstützte auch das NOESY-Experiment die postulierte dynamische Rotationsisomerie zwischen *syn*- und *anti*-Collinolacton (**7**).



**Abbildung 33:** 1 D-NOESY-Experiment am Collinolacton (**7**): Einstrahlung auf  $\delta_{\text{H}} = 1.57$  ppm (*syn* 19- $\text{H}_3$ ) mit Austauschsignal bei  $\delta_{\text{H}} = 1.12$  (*anti* 19- $\text{H}_3$ ) (oben). Einstrahlung bei  $\delta_{\text{H}} = 1.12$  (*anti* 19- $\text{H}_3$ ) mit Austauschsignal bei  $\delta_{\text{H}} = 1.57$  ppm (*syn* 19- $\text{H}_3$ ) (unten).

#### Quantenchemische Berechnungen

Als dritte Stütze zur Beweisführung, dass das Collinolacton (**7**) als *anti*-/*syn*-Konformerengemisch vorliegt, wurden quantenchemische Berechnungen als experimentell unabhängige Methode herangezogen. Dazu wurden die chemischen Verschiebungen aller Kohlenstoffatome eines C-14/C-15-*E-anti*-, C-14/C-15-*E-syn*- und eines C-14/C-15-*Z-syn*-Collinolactons, und damit aller bisherigen Strukturvorschläge, nämlich die der *syn*-/*anti-E*-Konformere und des *Z*-Isomers gemäß des Strukturvorschlags von H.-J. SCHIEWE, computergestützt mit Hilfe des Programmpaketes Spartan `04 berechnet.\* Thermodynamische und NMR-Daten wurden auf der Grundlage von HF/6-31G\* sowie Geometrien basierend auf B3Lyp/6-31G\* berechnet. Die berechneten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten, wobei die Doppelbindung von C-14/C-15 von besonderem Interesse war, wurden mit den gemessenen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten des isolierten *anti*/*syn*-Collinolactons (**7**) verglichen.

Wie der Tabelle 8 zu entnehmen ist, wichen die berechneten  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von den gemessenen NMR-Verschiebungen um  $\Delta\delta = 1$  bis 7 ppm ab. Die gemessenen NMR-Daten

\* An dieser Stelle sei HEIKO SCHILL (AG A. DE MEIJERE) gedankt, der die Berechnungen durchgeführt hat.

zeigten einen starken Tieffeldshift für C-19 und C-14 und einen starken Hochfeldshift für C-15 beim Vergleich von der Hauptkomponente mit der Minderkomponente. Dieser Trend wurde nach den Rechnungen sowohl für das postulierte Rotamer *E-syn* als auch für das Stereoisomer *Z-syn* gefunden.

Konformer	C-14 in ppm	C-15 in ppm	C-19 in ppm
NMR-Daten C-14/C-15- <i>E-anti</i>	133.1	134.0	12.5
berechnet C-14/C-15- <i>E-anti</i>	131.5	138.7	14.9
NMR-Daten C-14/C-15- <i>E-syn</i>	147.9	121.6	23.6
berechnet C-14/C-15- <i>E-syn</i>	155.8	122.6	23.8
berechnet C-14/C-15- <i>Z-syn</i>	144.3	124.7	30.5

**Tabelle 8:** Vergleich der berechneten NMR-Daten mit den gemessenen NMR-Daten (grau unterlegt) für drei Kohlenstoffatome (C-14, C-15 und C-19).

Leider konnte aufgrund der Rechnungen keine der beiden *syn*-Spezies ausgeschlossen werden, wengleich die gemessenen Daten für *E-syn* näher an den berechneten Daten liegen, aufgrund des großen Fehlers aller berechneten Daten, nimmt man die Daten der gemessenen und berechneten *anti*-Spezies als Referenz. Zumindest entkräfteten die Rechnung H.-J. SCHIEWES Argumentation für das Vorliegen eines *E/Z*-Isomerengemisches aufgrund von  $^{13}\text{C}$ -NMR-Verschiebungen.

Die Auswertung temperaturabhängiger NMR-Experimente, NOESY-Experimente und berechneter  $^{13}\text{C}$ -NMR Daten belegten die Richtigkeit des Postulats, dass das Collinolacton (7) im  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum aufgrund einer dynamischen Rotationsisomerie einen doppelten Spektrensatz aufweist. Damit konnte die von H.-J. SCHIEWE vorgeschlagene Strukturhypothese des Collinolactons (7) als *E/Z*-Isomere widerlegt werden. Demnach handelt es sich bei der Minderkomponente um eine Verbindung gleicher Stereokonfiguration, die durch Rotation des Molekülfragments C14/C15/C19 um die Bindungen 13a/14 und 15a/15 mit der Hauptkomponente in dynamischen Gleichgewicht steht (Abbildung 31).

### III Biosynthese des Collinolactons

Collinolacton (7) ist ein neuer Naturstoff mit einem ungewöhnlichen, neuartigen tricyclischen Grundgerüst. In der Literatur konnte keine Verbindung ausgemacht werden, die ein derartiges Kohlenstoffskelett aufweist. Aufgrund der Neuartigkeit des tricyclischen Grundgerüsts waren Fütterungsexperimente mit entsprechenden  $^{13}\text{C}$ - und  $^{18}\text{O}$ -markierten Vorläufern zur Untersuchung der Biosynthese von besonderem Interesse.

#### 1. Polyketid-Biosynthese mikrobieller Sekundärstoffe

Die Gruppe der Polyketide gehört zu der größten und wichtigsten Verbindungsklasse innerhalb der Sekundärmetabolite aus Bakterien. Beeindruckend ist der hoch variable Biosyntheseweg, der durch die Polymerisation von Essigsäure und Propionsäure oder anderen Carbonsäuren zu Naturstoffen von hoher struktureller Komplexität und variabler pharmazeutischer Wirksamkeit führt.

Der Begriff Polyketid-Naturstoff kennzeichnet Verbindungen, deren Grundgerüst aus einer Poly- $\beta$ -oxocarbonsäure bestehen. Eine Vielzahl von Organismen wie z. B. Bakterien, Pilze oder auch Pflanzen sind in der Lage diese Arten von Substanzen zu bilden. Die gebildeten Substanzen weisen eine erstaunliche therapeutische Vielseitigkeit auf, wobei das Spektrum von klassischen Antibiotika gegen Infektionskrankheiten und Chemotherapeutika gegen Tumorerkrankungen über Immunsuppressiva bis hin zu Fungiziden für die Landwirtschaft reicht.

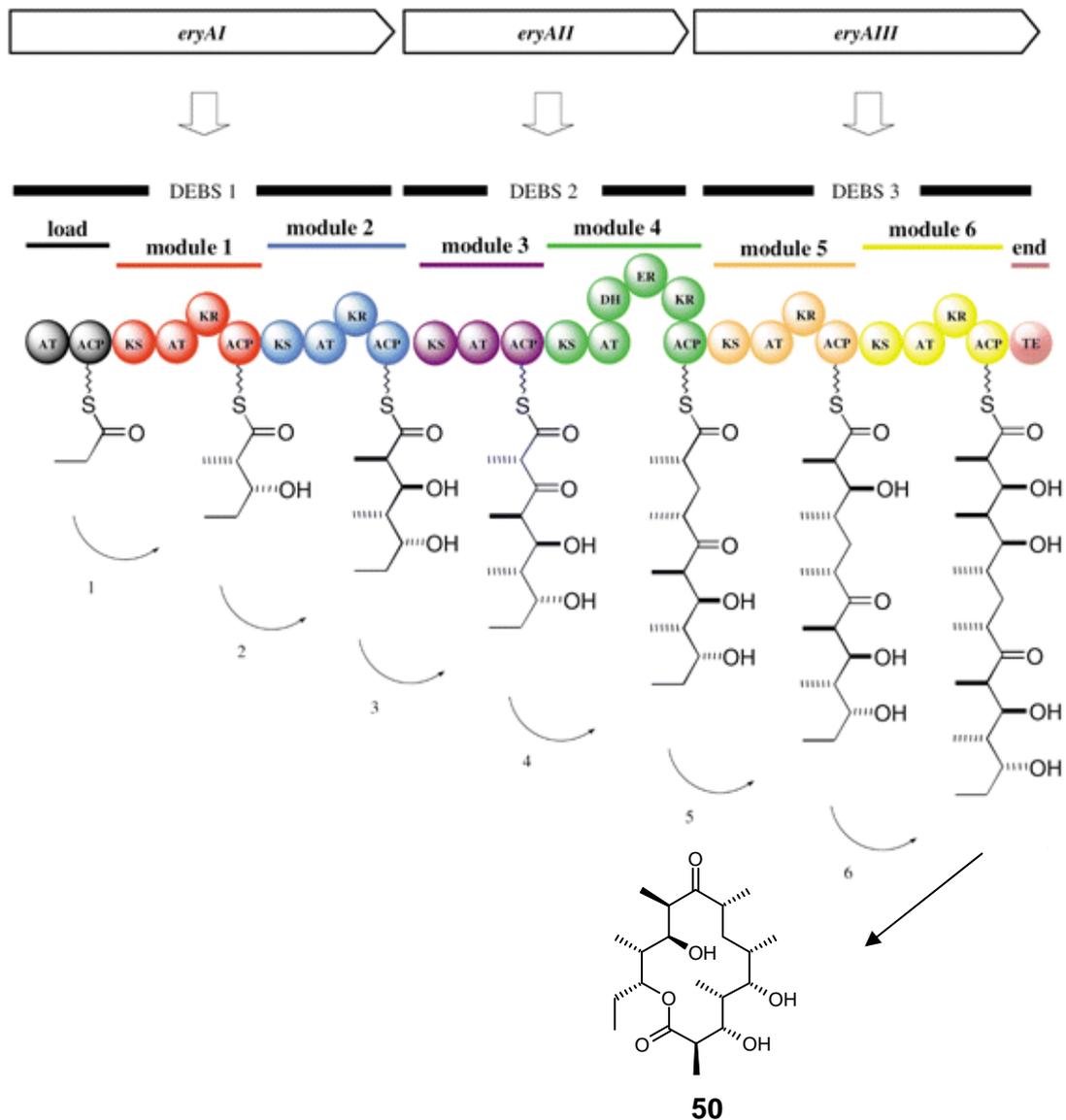
Die Beschreibung des heute allgemein anerkannten Polyketid-Biosynthesewegs begann um 1900 mit den Theorien von J. COLLI<sup>[81]</sup> und wurde in den vierziger Jahren von R. ROBINSON<sup>[82]</sup> weiterentwickelt. Aber erst der im Jahre 1953 von A. BIRCH und F. DONOVAN<sup>[83]</sup> formulierte Biosyntheseweg führte zu einer breiten Akzeptanz. Demnach verläuft der Biosyntheseweg der Polyketide und der Fettsäuren nach einem ähnlichen Schema ab. Mehrfach nacheinander stattfindende Claisenkondensationen von CoA-Derivaten wie Acetyl- oder Propionyl-Thioestern, die durch die Polyketidsynthase (PKS) oder die Fettsäuresynthase (FAS) katalysiert werden, führen zum Aufbau von Polyketidgerüsten bzw. Fettsäuren. Als Startereinheit fungiert bei der Biosynthese häufig Acetat (als Acetyl-CoA), während Malonyl-CoA den Baustein für die Kettenverlängerung darstellt. Auch Propionat ( $\text{C}_3$ -Einheit) oder Butyrat ( $\text{C}_4$ -Einheit) bzw. Methyl- oder Ethylmalonat können als Starter und zur Kettenverlängerung verwendet werden, wodurch Kettenverzweigungen entstehen.

Der Unterschied zwischen Fettsäure-<sup>[84]</sup> und Polyketid-Biosynthese liegt in den auf die Claisen Kondensation folgenden Reduktionsschritten. Bei der Fettsäurebiosynthese werden alle Ketofunktionen reduziert, dehydratisiert und die entstandenen Doppelbindungen vollständig zu Methylengruppen reduziert. Ungesättigte Fettsäuren entstehen erst durch nachfolgende Oxidation. In der Polyketidbiosynthese wird jede neue C<sub>2</sub>-Einheit individuell in unterschiedlichem Ausmaß reduziert, wodurch komplexe Moleküle mit Keto-, Hydroxygruppen, Doppelbindungen oder Methylengruppen entstehen und dabei hinsichtlich der Stereochemie entstehender Chiralitätszentren unterschiedliche Konfigurationen in Abhängigkeit der PKS entstehen.<sup>[85,86]</sup>

Ebenso wie bei den Fettsäuren unterscheidet man die Polyketidsynthasen aufgrund unterschiedlicher enzymatischer Aktivitäten inzwischen in drei Typen. Neuste Arbeiten belegen jedoch einen großen Variantenreichtum aller PKS-Biosynthesewege und raten, sich von einer zu starren Unterteilung der Typen zu trennen.<sup>[87]</sup> Der Typ PKS-I katalysiert die Biosynthese von Polyethern und Makroliden wie das 6-Desoxyerythronolid B (**50**), während der Typ PKS-II die Synthese von polyzyklischen, aromatischen Verbindungen wie z.B. Angucycline und Anthracycline wie das Actinorodin (**51**) katalysiert. Der Typ PKS-III katalysiert die Synthese der Chalcone (**52**) in höheren Pflanzen.<sup>[42,85]</sup>

### *Typ PKS I*

Der Typ PKS-I besteht aus modular aufgebauten Multienzymkomplexen, welche über verschiedene funktionelle Einheiten (Domänen) verfügen. Die in diesem Komplex enthaltenen Module bestimmen die Bausteine zum Aufbau der Kette durch Acyltransferase (AT),  $\beta$ -Ketosynthase (KS) und Acetyl-Carrier-Protein (ACP) und die Funktionalitäten je nach Aufbau und Reihenfolge der jeweiligen Module wie Keto-Reduktase (KR), Dehydratase (DH) und Enoyl-Reduktase (ER), wie am Beispiel des Aglykons **50** des Erythromycins (Abbildung 34) gezeigt ist. Die katalysierten Reaktionen verlaufen äußerst selektiv hinsichtlich ihrer Regiochemie und kontrollierter Generierung aller Stereozentren.



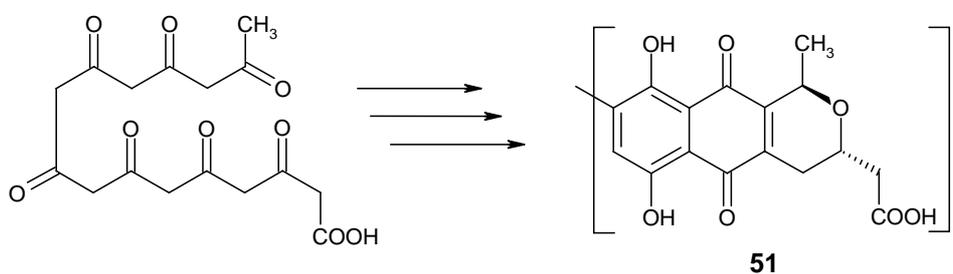
**Abbildung 34:** Biosynthese von 6-Desoxyerythronolid B (**50**) durch eine modulare Typ PKS-I nach J. STAUNTON.<sup>[88]</sup>

### Typ PKS-II

Der Typ PKS-II besteht dagegen aus nur einem einzelnen Satz mono- oder sogar bifunktionaler Enzyme, der wiederholt, also iterativ abgelesen wird, ein klassisches Beispiel ist das Actinorhodin (**51**) (Abbildung 35). Zunächst wird die gesamte Polyketidkette durch aufeinander folgende 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 stabilen aromatischen Sechsringen führen. Ferner gibt es Ringschlüsse (z.B. Lactonisierungen), bei denen vermutet wird, dass sie in der Enzyntasche definierter

Größe unkatalysiert zum thermodynamisch stabilen Produkt führen (vgl. Chaperone). Nachdem das Grundgerüst aufgebaut wurde, folgen die post-PKS Modifikationen, wie Oxidationen, Reduktionen, Alkylierungen und Glykosylierungen.

Die für den Aufbau eines Grundgerüsts zuständigen Gene sind heute größtenteils charakterisiert und werden als „minimale PKS“ bezeichnet. Die minimale PKS enthält eine  $\beta$ -Ketosynthase (KS), mit deren Hilfe die Claisenkondensation stattfindet, eine damit gekoppelte Acyltransferase (AT), die die Startereinheit zur Ketosynthase transportiert, einen Kettenlängenfaktor (Chain-Length-Factor (CLF)), der die Kettenlänge bestimmt und ein Acylcarrierprotein (ACP), an das die Polyketidkette gebunden ist.

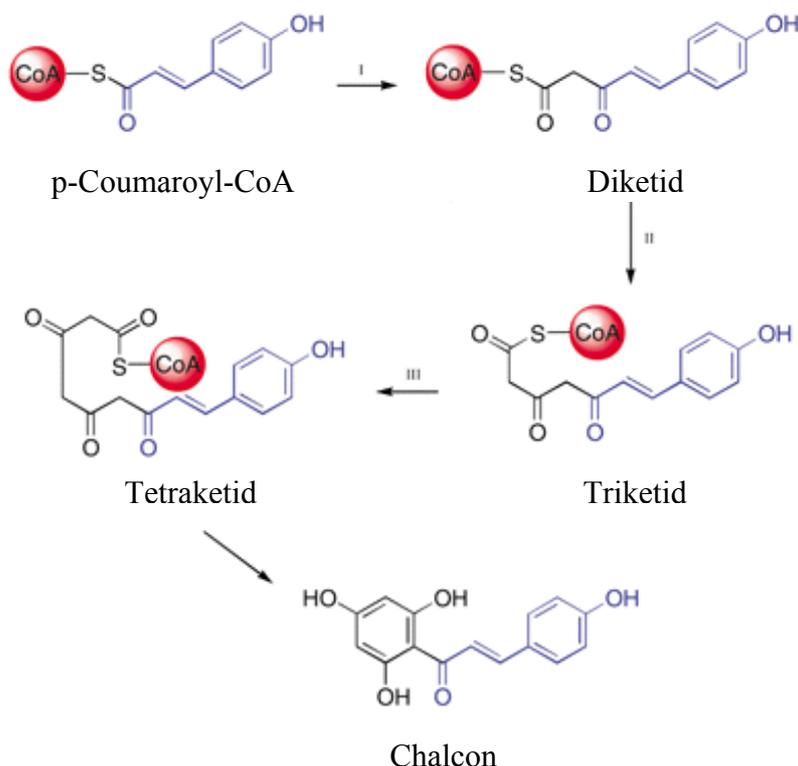


**Abbildung 35:** Schematische Darstellung der Typ PKS-II-vermittelten Actinorhodinbiosynthese (**51**).

### *Typ PKS III*

Das bekannteste Beispiel für die PKS-III ist die Chalcon-Synthase (CHS) (Abbildung 36), die Phenylpropanoide synthetisiert. Oberflächlich gesehen, ähnelt sie der PKS Typ I und II, jedoch gibt es einige wichtige Unterschiede: PKS Typ I und II benutzen den Phosphopantetheinarm des ACP, um Substrate entlang der aktiven Zentren zu befördern. Die CHS nutzt stattdessen den CoA-Thioester der Substrate. Eine vollständige Reaktionsfolge von Decarboxylierung, Kondensation, Cyclisierung und Aromatisierung finden an einem einzigen aktiven Zentrum statt. Demnach ist die PKS Typ III multifunktional und iterativ aufgebaut.<sup>[88,89]</sup>

Bei den Chalcon-Synthasen gehören die Ketoreduktasen (KR), die eine Carbonylgruppe zur Hydroxygruppe reduzieren, zu den sogenannten post-PKS-Genen. Die Aromatasen (ARO) und Cyclasen (CYC) sind verantwortlich für die spezifische Cyclisierung, die größtenteils dem Reaktionstyp einer intramolekularen Aldolkondensation angehören.<sup>[90]</sup>



**Abbildung 36:** Drei Kondensationschritte der Chalcon-Synthese (CHS) nach J. STAUNTON.<sup>[88]</sup> Die Startereinheit ist in blau gezeichnet.

## 2. Fütterungsexperimente mit $^{13}\text{C}$ - und $^{18}\text{O}$ -markierten Vorläufern

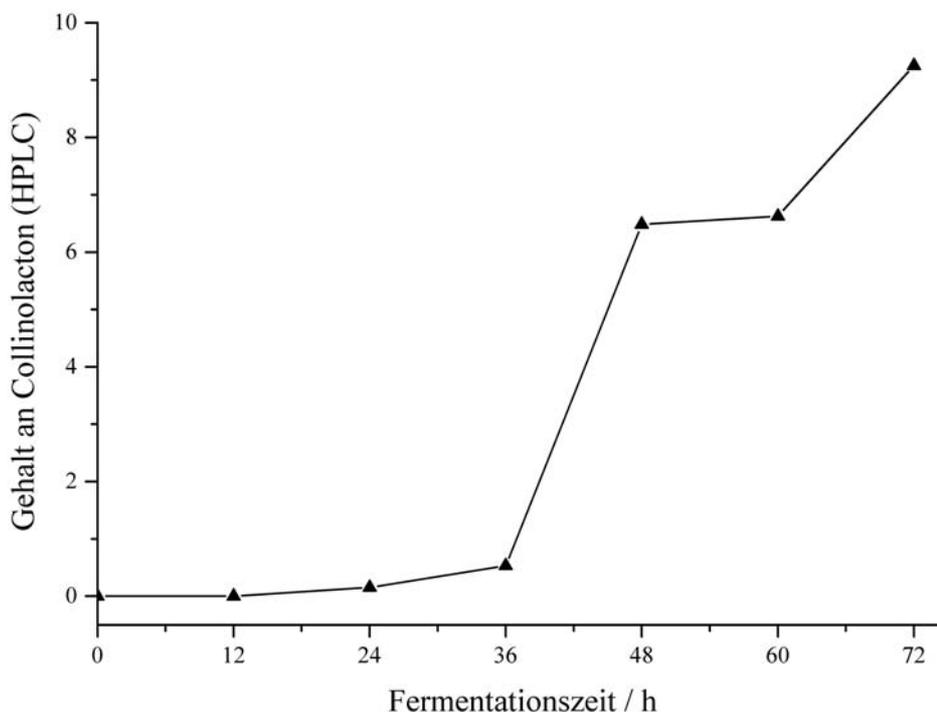
Um den biosynthetischen Aufbau des neuartigen tricyclischen Grundgerüsts des Collinolactons (7) zu studieren, sollten Fütterungsexperimente mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Vorläufern aus der Polyketidbiosynthese durchgeführt werden.

### 2.1. Fermentationskurve

Für Biosyntheseuntersuchungen wichtige Informationen erhält man aus der Fermentationskurve eines Produzenten, die für jeden Mikroorganismus einen charakteristischen Verlauf zeigt. Erkenntnisse über den pH-Verlauf und die Entwicklung der Sekundärstoffproduktion liefern notwendige Hinweise, um die  $^{13}\text{C}$ - und  $^{18}\text{O}$ -markierten Vorläufer gezielt zum richtigen Zeitpunkt in die spezifischen Stoffwechselwege des Sekundärmetaboliten einschleusen zu können. Für die Fütterungsexperimente mit stabilen Isotopen muss eine genügend hohe Anreicherung im Zielmolekül erreicht werden. Deshalb wird die gezielte Fütterung des Vorläufers durch Pulse-Feeding-Verfahren oder kontinuierliche Zugabe, meist zu Beginn der Sekundärstoffproduktion begonnen, und endet kurz vor Erreichen der maximalen Konzentration des Metaboliten. Um die vollständige

Aufnahme der Vorläufermoleküle zu gewährleisten, wird die Fermentation meist nur wenige Stunden fortgeführt, dann der Sekundärmetabolit aus der Kulturlösung isoliert, damit Abbau- und Umbaureaktionen die Ausbeute nicht beeinflussen. Bei der kontinuierlichen Zugabe werden die markierten Vorläufer über einen definierten Zeitraum in kleinen Mengen in die Kulturlösung gepumpt, so dass dem Produzenten stets eine konstante Konzentration des Vorläufers zur Verfügung steht. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass ein längerer Fütterungszeitraum der zeitlichen Flexibilität des biologischen Stoffwechsels gerecht wird, und so ein erfolgreicher Einbau des markierten Vorläufers in den Sekundärmetaboliten gewährleistet ist.

Um die Entwicklung der Collinolacton-Konzentration während der Fermentation zu analysieren, wurde für den Stamm Tü 1892 eine Fermentationskurve aufgenommen. Die Fermentationskurve wurde während der Fermentation in einer  $^{18}\text{O}_2$ -Apparatur aufgenommen, da unter anderem Fütterungen in  $^{18}\text{O}_2$ -angereicherter Sauerstoffatmosphäre durchgeführt werden sollten (Abbildung 107). Die Kultivierung des Stammes Tü 1892 erfolgte nach B.XI3.1. Die Kolben der  $^{18}\text{O}_2$ -Apparatur sind in Reihe geschaltet. Es war notwendig den letzten Kolben mit 100 mL sterilem Wasser zu befüllen, um zu vermeiden, dass sich wegen des starken Wachstums des Bakterienstammes die gesamte Apparatur entleerte. Ab der sechsten Fermentationsstunde wurde alle sechs Stunden, je ein Kolben (100 mL) geerntet. Um das Fermentationsvolumen nicht zu verringern und damit das Sauerstoffvolumen zu erhöhen wurde der entnommene Kolben mit 100 mL sterilem Wasser befüllt und wieder auf das Schüttelbrett gesetzt. Die Proben wurden mittels Filtration in Kulturfiltrat und Mycel getrennt. Das Kulturfiltrat wurde mit Ethylacetat (2 x 50 mL) extrahiert und die organischen Phasen im Vakuum eingeeengt. Von den Rohextrakten wurde eine methanolische Lösung mit der Konzentration 3 mg/mL hergestellt und einer HPLC-Analyse zugeführt (HPLC 1, Säule 1, Programm 1). Mit Hilfe der Kalibrierungsgerade, die zuvor mit Konzentrationen von 1.0 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL und 0.125 mg/mL Collinolacton (7) erstellt wurde, konnte die Konzentration des Collinolactons (7) durch HPLC-Chromatographie verfolgt werden (Abbildung 37).



**Abbildung 37:** Fermentationskurve des Collinolactons (7) aus dem Stamm Tü 1892.

Die Fermentationskurve zeigte den Produktionsbeginn von Collinolacton (7) ab der 24. Inkubationsstunde. Ein drastischer Anstieg der Konzentration war zwischen der 36. und 48. zu verzeichnen.

Aus den Daten der Fermentationskurve wurde abgeleitet, dass eine Fütterung ab der 36. Inkubationsstunde sinnvoll ist. Ab diesem Zeitpunkt steigt die Konzentration an Collinolacton (7) in der Kulturbrühe drastisch an. Da die Fütterungsdauer nicht zu lang gewählt werden sollte, wurden insgesamt 16 Stunden, von der 48. bis zur 64. Stunde, isotonenstabile Vorläufer gefüttert.

## 2.2. Fütterung von [1-<sup>13</sup>C]Acetat und [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Acetat<sup>[91]</sup>

Alle Fütterungsexperimente mit <sup>13</sup>C-markierten Verbindungen, wurden von H.-J. SCHIEWE nach seiner Dissertation durchgeführt und sind bisher nicht veröffentlicht. Zur Klärung der Biogenese des Collinolactons (7), wurden zunächst Fütterungen mit isotonenmarkiertem Natriumacetat als Grundbaustein des Polyketid-Biosynthesewegs durchgeführt. Aus den

erhaltenen Ergebnissen sollte im Folgenden problemspezifisch über den Einsatz weiterer Vorläufer entschieden werden.

Der Stamm Gö 40/10 wurde im 1 L Fermenter kultiviert und die Precursorlösung ab der 48. Inkubationsstunde über 16 Stunden nach dem Pulse-Feeding-Verfahren in Intervallen von 15 min in die Kulturbrühe gepumpt. Nach der 72. Inkubationsstunde wurde die Fermentation beendet, aufgearbeitet und das Collinolacton (**7**) isoliert (A. II4).

Dem Stamm Gö 40/10 wurden in der ersten Fermentation 820 mg/L [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]Acetat (10 mmol/L) gefüttert und nach Aufarbeitung und Isolierung konnten 3.0 mg/L Collinolacton (**7**) erhalten werden. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum der angereicherten Substanz ließen sich für C-2, C-4, C-5a, C-7, C-10 und C-13a (Tabelle 9) beachtliche Intensitätserhöhungen erkennen, mit einem spezifischen Einbau (vgl. Gleichung 2) von 4.48 – 7.48. Unter Berücksichtigung der natürlichen Häufigkeit von  $^{13}\text{C}$ -Kernen sowie der Anreicherung des Precursors gilt ein Einbau als erfolgreich, wenn die Signalintensität eines C-Atoms verdoppelt und somit die Anreicherung größer als eins ist.

$$\% \text{Anreicherung} = 1.1\% \times \frac{\text{Intensität des Signals der markierten Verbindung}}{\text{Intensität des Signals der unmarkierten Verbindung}} - 1.1\%$$

$$\text{spezifischer Einbau} = \frac{(\% \text{ Anreicherung}) \times 100}{(\% \text{ Anreicherung Vorläufer})}$$

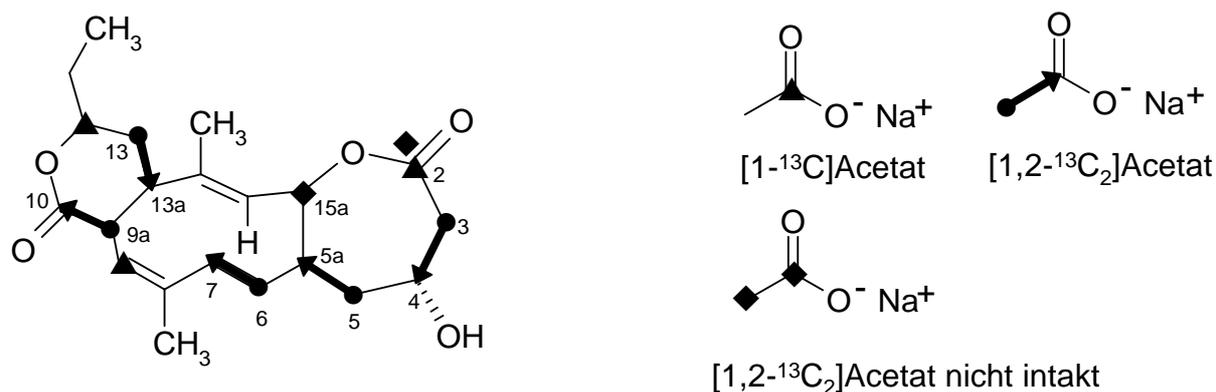
**Gleichung 2:** Berechnung der spezifischen Einbauraten bei Fütterungsexperimenten mit einfach markierten Vorläufern.

Nachdem durch den erfolgreichen Einbau von [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ]Acetat belegt (Abbildung 38), dass der Polyketid-Biosyntheseweg am Aufbau des Collinolactons (**7**) beteiligt ist, sollte mit dem Einbau von [ $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ ]Acetat geklärt werden, ob der Einbau der Acetatbausteine intakt erfolgte.

Der Fermentation wurden 410 mg/L [ $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ ]Acetat (5 mmol/L, 15 mL steriles Wasser) von der 48. – 64. Inkubationsstunde zugefüttert. Die Kultivierung wurde in der 72. Inkubationsstunde beendet und es konnten 7.8 mg/L Collinolacton (**7**) isoliert werden.

Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des mit [ $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ ]Acetat angereicherten Collinolactons (**7**) waren zehn Dubletts von Kohlenstoffatomen zu finden, zusätzlich waren zwei  $^{13}\text{C}$ -Signale (C-2 und C-15a) als erhöhte Singulets zu beobachten. Folglich hat an dieser Stelle die Trennung von [ $1,2\text{-}^{13}\text{C}_2$ ]Acetat in zwei einzelne Kohlenstoffatome stattgefunden. In Tabelle 9 sind die Kopplungskonstanten für die angereicherten C-Atome angegeben. Daraus ergab sich, dass

fünf intakte Acetateinheiten (C-3/C-4, C-5/C-5a, C-6/C-7, C-9a/C-10 und C-13/C-13a) und zwei einfache Markierungen aus Acetat (C-2, C-15a) in das Molekül eingebaut wurden. Die Beobachtung zweier isoliert angereicherter C-Atome legt die Vermutung nahe, dass C-2 und C-15 aus einer Acetateinheit stammen, die nachträglich oxidativ gespalten wurde. Aus der Summe der beiden Fütterungsexperimente mit angereichertem Acetat wurde die Einbaurichtung der Acetateinheiten bestimmt.



**Abbildung 38:** Markierungsmuster des Collinolactons (7), abgeleitet aus den Fütterungsexperimenten mit  $[1-^{13}\text{C}]\text{Acetat}$  und  $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Acetat}$ .

Damit steht außer Frage, dass Acetat über Acetyl-CoA und Malonyl-CoA in das Zielmolekül eingeführt wurde. Wie der Tabelle 9 ferner zu entnehmen ist, wurde für C-9 und C-12 des  $[1-^{13}\text{C}]\text{Acetat}$ -Fütterungsexperiments eine signifikante spezifische Einbaurate errechnet. Da für die Kohlenstoffatome C-16/C-8, C-18/C-17 und C-19/C-14/C-15 bislang kein Einbau gefunden wurde liegt die Vermutung nahe, dass diese Kohlenstoffe und die Kohlenstoffe C-9 und C-12, die durch  $[1-^{13}\text{C}]\text{Acetat}$  angereichert wurden, jeweils als  $\text{C}_3$ -Einheit aus Propionat hervorgehen. Dass die Kohlenstoffatome C-9 und C-12 durch Acetat markiert werden können liegt im Acetatmetabolismus begründet. Acetat wird über Zitronensäure und Succinat schließlich in Methylmalonyl-CoA umgewandelt, das als  $\text{C}_3$ -Einheit genauso eingebaut werden kann.<sup>[92]</sup> Der Einbau dieser  $\text{C}_3$ -Einheiten tritt wegen des Acetatmetabolismus zeitlich verzögert ein, dass darin die schwächeren Einbauraten begründet liegen.

Mit der Fütterung von  $[1-^{13}\text{C}]\text{Propionat}$  sollte die Herkunft der verbleibenden Kohlenstoffatome mit einem  $\text{C}_3$ -Baustein eindeutig geklärt werden

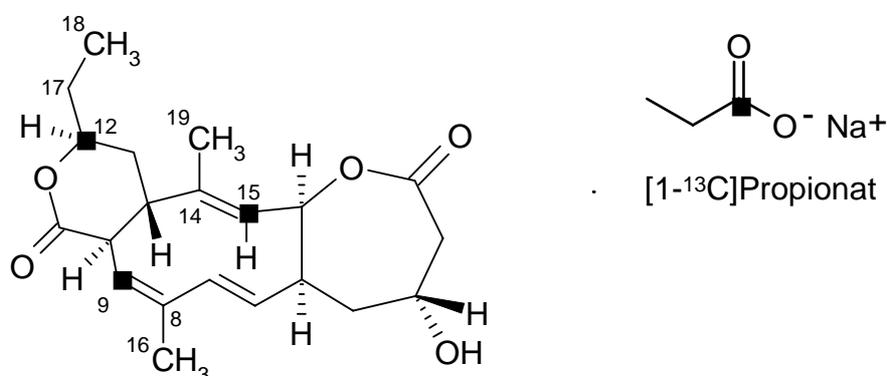
### 2.3. Fütterung von $[1-^{13}\text{C}]\text{Propionat}$ <sup>[91]</sup>

Zur Klärung der biosynthetischen Herkunft der Methyl- und Ethylgruppen von 7 wurde dem Stamm Gö 40/10 Propionat in einer Fermentation (960 mg/L  $[1-^{13}\text{C}]\text{Propionat}$ , 10 mmol/L,

15 mL steriles H<sub>2</sub>O) in dem Zeitraum von der 48. – 64. Inkubationsstunde im Pulse-Feeding-Verfahren zugefüttert. Die Fermentation wurde in der 72. Inkubationsstunde beendet und nach Aufarbeitung und Isolierung konnten 2.0 mg/L Collinolacton (7) erhalten werden.

Da das Experiment mit einem einfach-markierten Vorläufer durchgeführt wurde, konnte Gleichung 2 zur Auswertung des <sup>13</sup>C-NMR-Spektrums angewandt werden (Tabelle 9). Es war eine große Intensitätserhöhung der Signale C-9, C-12 und C-15 des <sup>13</sup>C-NMR-Spektrums zu erkennen. Abbildung 39 zeigt den Einbau von [1-<sup>13</sup>C]Propionat in Collinolacton (7), der aus dem <sup>13</sup>C-NMR-Spektrums ermittelt wurde.

Durch dieses Ergebnis konnte bewiesen werden, dass die drei C<sub>3</sub>-Einheiten C-16/C-8/C-9, C-18/C-17/C-12 und C-19/C-14/C-15 durch den Einbau von Propionat in der PKS entstehen.



**Abbildung 39:** Markierungsmuster des Collinolactons (7), abgeleitet aus dem Fütterungsexperiment mit [1-<sup>13</sup>C]Propionat.

Aus den Fütterungsexperimenten mit <sup>13</sup>C-markierten Vorläufern war abzuleiten, dass Collinolacton (7) als Nonaketid aus sechs Acetat- und drei Propionat-Einheiten nach der PKS aufgebaut wird.

Das Collinolacton (7) zeigt in seiner Struktur ein sieben-Ring-Lacton. Bisher ist nicht klar, aus welchem Vorläufer der Sauerstoff an Position 1 stammt. Da C-2 und C-15a von einer nicht intakten [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Acetat-Einheit markiert wurden, liegt die Vermutung nahe, dass an dieser Stelle eine oxidative Ringerweiterung durch Sauerstoff stattgefunden hat. Um die Hypothese zu belegen und um die Herkunft des Sauerstoffs an Position 1 zu analysieren, wurde eine Kultivierung in <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-angereicherter Atmosphäre durchgeführt.

C-Atom	$\delta_{C_{anti}}$ (ppm)	Spezifischer Einbau		$^1J_{C-C}$
		[1- $^{13}C$ ] Acetat	[1- $^{13}C$ ] Propionat	[1,2- $^{13}C_2$ ] Acetat
2	171.6	<b>6.33</b>	0.46	-
3	42.7	0.23	0.64	35.0
4	62.9	<b>5.59</b>	0.68	35.0
5	35.1	0.24	0.29	34.6
5a	43.1	<b>4.68</b>	0.35	34.6
6	127.0	0.55	0.25	73.0
7	138.8	<b>4.48</b>	0.65	73.0
8	135.9	0.00	0.09	-
9	123.6	<b>1.33</b>	<b>26.71</b>	-
9a	40.6	0.24	0.14	50.3
10	173.8	<b>7.48</b>	0.53	50.3
12	78.5	<b>2.27</b>	<b>28.30</b>	-
13	32.5	0.21	0	32.8
13a	46.7	<b>4.93</b>	0.38	32.8
14	133.1	0.03	0.99	-
15	134.0	0.03	<b>24.90</b>	-
15a	82.3	0.33	0.17	-
16	19.9	0.11	0.26	-
17	28.4	0.13	0.04	-
18	9.6	0.00	0.24	-
19	13.2	0.82	0.36	-

**Tabelle 9:** Chemische Verschiebungen ( $CD_2Cl_2$ , 125.7 MHz) und spezifische Einbauraten von Collinolacton (**7**) nach Fütterungsexperimenten mit [1- $^{13}C$ ]Acetat und [1- $^{13}C$ ]Propionat (standardisiert auf die C-13 Signalintensität, fett: erfolgreicher Einbau) und Kopplungskonstanten  $^1J_{C,C}$  in Hz nach Fütterung von [1,2- $^{13}C_2$ ]Acetat.

#### 2.4. Kultivierung in $^{18}O_2$ -angereicherter Atmosphäre

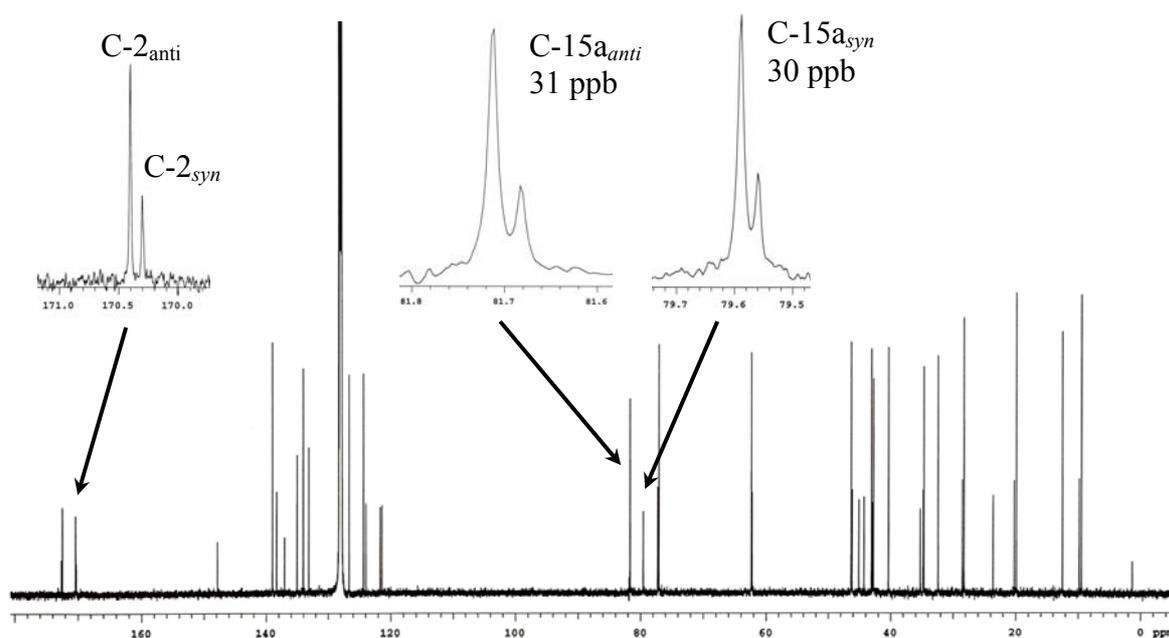
Zur Interpretation der Biosynthese-Mechanismen eines Metaboliten kann die Kenntnis der Herkunft der im Molekül enthaltenen Sauerstoffatome sehr hilfreich sein. Der Verbleib von Sauerstoffatomen aus Vorläufermolekülen lässt sich experimentell durch Zufütterung entsprechender  $^{18}O$ -markierter Vorläufer verfolgen. Ein am Kohlenstoffatom gebundenes  $^{18}O$ -Isotop bewirkt durch einen Isotopen-Effekt eine Verschiebung des entsprechenden Kohlenstoff-Signals im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum, der zu untersuchenden Verbindung.<sup>[93]</sup> Je nach Einbaurate der Sauerstoffmarkierung in das Molekül zeigt sich neben dem  $^{13}C$ -NMR-Signal unmarkierter Moleküle ein um einen charakteristischen Isotopen-Shift in Richtung Hochfeld verschobenes  $^{13}C$ -NMR-Signal der markierten Isotopomeren. Ein Vergleich der

Signalintensitäten lässt sich zur Abschätzung des  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ -Verhältnisses verwenden. Die Stärke des Isotopen-Shifts ist von der chemischen Umgebung abhängig.<sup>[94,95,96]</sup> So führen  $^{18}\text{O}$ -Atome in Carbonylen zu einem stärkeren Effekt (0.034 – 0.050 ppm) als beispielsweise in sekundären Alkoholen (0.016 – 0.023 ppm).<sup>[95]</sup> Während die Größe der Signalverschiebung bei Carbonylen nicht vom Lösungsmittel abhängt, verändert sich dieser bei Alkoholen beispielsweise mit dem Wechsel von  $d_1$ -Chloroform auf  $d_5$ -Pyridin um bis zu 0.003 ppm. Der Isotopen-Shift für die benachbarten C-Atome bei Einbau mehrerer  $^{18}\text{O}$ -Atome addiert sich jeweils.<sup>[97]</sup>

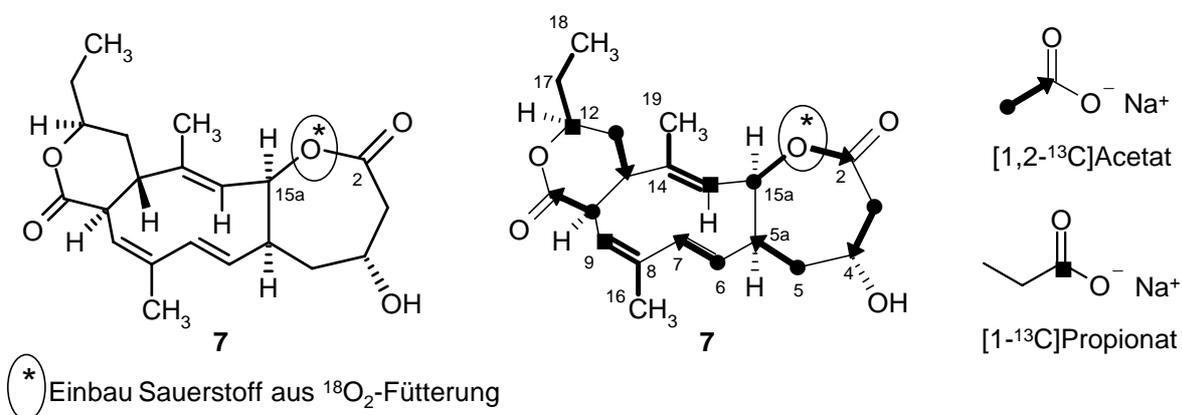
Um die Herkunft des Sauerstoffatoms an Position 1 zu klären wurde der Stamm Tü 1892 im Rahmen dieser Arbeit unter  $^{18}\text{O}_2$ -angereicherter Atmosphäre fermentiert. Eine Oxidation, in der ein Sauerstoffatom durch Oxygenasen spezifisch in ein Kohlenstoffgerüst eingebracht wird, ist eine Reaktion der „späten Biosynthese“. Das Experiment sollte Auskunft über die Biosyntheseschritte der „späten Biosynthese“ geben.

Der Stamm Tü 1892 wurde im 300 mL EMK mit SM-Medium bei 28°C, 250 rpm, wie unter B. XI3.6 und B. XI3.7 beschrieben, fermentiert. Unter diesen Bedingungen wurde die  $^{18}\text{O}_2$ -Zufütterung in der 36. Fermentationsstunde begonnen. Hierzu schloss man die Schüttelkolben an eine  $^{18}\text{O}_2$ -Apparatur (Abbildung 107) an, die eine regelmäßige kontrollierte Gaszirkulation im geschlossenen System ermöglicht, und nach 36 Stunden Inkubationszeit in normaler Luftatmosphäre wurden dem System 2 L  $^{18}\text{O}_2$ -Sauerstoff vorgelegt. In der 48. Inkubationsstunde wurde die Fermentation abgebrochen und aufgearbeitet. Collinolacton (7) ließ sich in einer Ausbeute von 7 mg/L als Reinsubstanz isolieren. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigte den üblichen doppelten Signalsatz. Außerdem ergaben sich  $\alpha$ -Isotopenshifts für die Atome  $C_{anti-15a}$  (31 ppb) and  $C_{syn-15a}$  (30 ppb) (Abbildung 40). Damit war der  $\alpha$ -Isotopenshift bei den Kohlenstoffatomen, die durch eine Einfachbindung mit Sauerstoff verbunden sind (C-15a), vergleichsweise groß und eindeutig. Nach der Hypothese sollte auch für C-2 ein  $\alpha$ -Isotopenshift erkennbar sein. Bei den Signalen der Carbonylgruppe ( $C_{anti-2}$  und  $C_{syn-2}$ ) war kein  $\alpha$ -Isotopenshift zu erkennen. Aus diesem Grund wurde das Experiment wiederholt. Die Auswertung des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum aus der zweiten Fermentation ergab jedoch das gleiche Ergebnis. In der Literatur wurde ein ähnliches Phänomen beschrieben. Es konnte eine  $^{18}\text{O}$ -Markierung, die zwischen einem  $\text{sp}^3$  hybridisiertem Kohlenstoff- und einem Carbonyl-Kohlenstoffatom liegt, ausschließlich an dem  $\text{sp}^3$  hybridisierten Kohlenstoffatom beobachtet werden,<sup>[98]</sup> obwohl Carbonyl-Kohlenstoffatome einem stärkeren  $\alpha$ -Isotopenshift unterliegen und eine Verschiebung von 43 – 50 ppb in Richtung Hochfeld zeigen sollten. In Anlehnung an die Literatur ist damit auch für das Collinolacton (7) der Einbau von  $^{18}\text{O}$ -

Sauerstoff an Position 1 durch das  $^{18}\text{O}_2$ -Fütterungsexperiment bestätigt, auch wenn der Einbau allein durch das benachbarte Kohlenstoffatom C-15a nachgewiesen wurde (Abbildung 41). Das Fütterungsexperiment in  $^{18}\text{O}_2$ -angereicherter Atmosphäre bestätigte die Annahme, dass nur O-1 zwischen C-2 und C-15a aus atmosphärischem Sauerstoff generiert wird, alle anderen Sauerstoffatome des Collinolactons (**7**) gehen demnach, wie erwartet, aus Acetat und Propionat hervor.



**Abbildung 40:**  $\alpha$ -Isotopenshift am C-15a (*anti* und *syn*) im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des  $^{18}\text{O}_2$ -angereicherten Collinolactons (**7**).

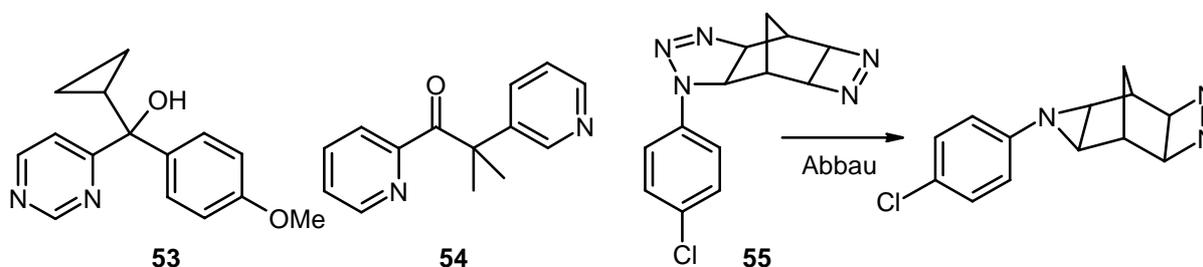


**Abbildung 41:** Einbaumuster von  $^{18}\text{O}_2$  in Collinolacton (**7**). Einbaumuster von **7** aus den Fütterungsexperimenten mit  $^{13}\text{C}$ - und  $^{18}\text{O}$ -markierten Vorläufern.

Abbildung 41 zeigt das Einbaumuster von Collinolacton (**7**) aus den Fütterungsexperimenten mit  $^{13}\text{C}$ - und  $^{18}\text{O}$ -markierten Vorläufern an Collinolacton (**7**). Daraus ist abzuleiten, dass das Grundgerüst des Collinolactons (**7**) aus sechs Acetat-, drei Propionat-Einheiten und einem atmosphärischen Sauerstoffatom aufgebaut ist. Der Einbau des Sauerstoffatoms aus Luft sicherte die Annahme, dass das Lacton während der späten Biosynthese durch eine oxidative Ringerweiterung aufgebaut wird. Solche Ringerweiterungen werden in der Natur durch Baeyer-Villiger-Monooxygenasen ausgeführt. Damit erscheint die Biogenese des Collinolactons (**7**) insgesamt plausibel.

### 3. Zusatz von Inhibitoren $\text{P}_{450}$ -abhängiger Monooxygenasen

Der Zusatz von Enzyminhibitoren dient meist dem Ziel, durch Blockade einzelner Schritte der Biosynthese natürlicher Sekundärmetabolite Zwischenprodukte, sogenannte „shunt-Produkte“ zu akkumulieren und so Hinweise über den genauen Biosyntheseablauf zu erhalten. Eine Beeinflussung des Oxygenierungsmusters ist durch Inhibierung der  $\text{P}_{450}$ -abhängigen Monooxygenasen mit Hilfe von Verbindungen wie Ancymidol (**53**)<sup>[99]</sup>, Metapyron (**54**)<sup>[100]</sup> oder Tetcyclacis (**55**) möglich. Daraufhin werden Desoxyderivate der bekannten Metabolite erwartet.



**Abbildung 42:** Inhibitoren  $\text{P}_{450}$ -abhängiger Monooxygenasen: Ancymidol (**53**), Metapyron (**54**) und Tetcyclacis (**55**).

Auch andere post-PKS-Biosyntheseschritte können inhibiert werden. Bei Methylierungsreaktionen lassen sich beispielsweise die Übertragung von  $\text{C}_1$ -Bausteinen über S-Adenosylmethionin durch Ethionin, *O*-Methylierungen durch Sinefungin<sup>[101]</sup> inhibieren. Eine andere Idee liegt der Verwendung von Cerulenin<sup>[102]</sup> als Inhibitor der Fettsäure-, Polyketid- und Steroidbiosynthese zugrunde. Hier soll eine vollständige Unterdrückung des gesamten Biosynthesewegs schon am Anfang erreicht werden. So werden zugefütterte oder durch einen zweiten Stamm in Co-Fermentation ausgeschiedene Vorläufer durch die intakten

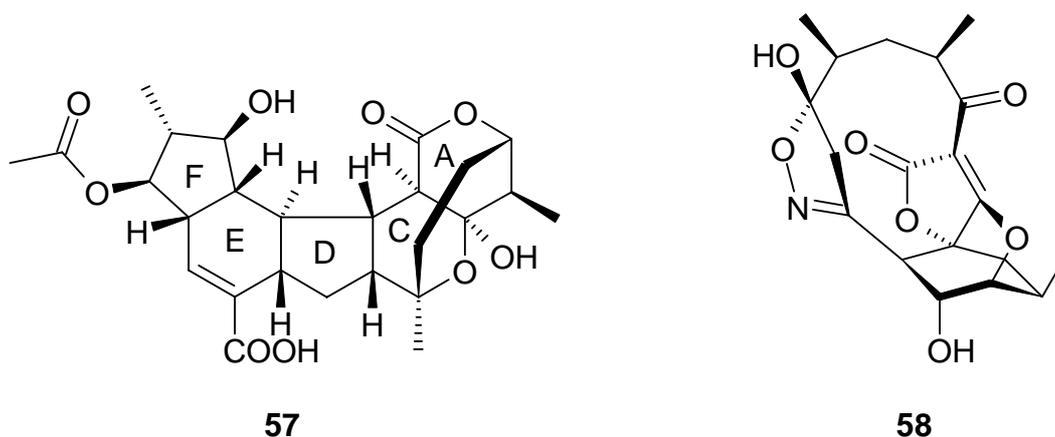
Enzyme der späten Biosynthese (z. B. Glykosyltransferasen)<sup>[103]</sup> modifiziert. Enzyminhibitoren können aber auch zur Ausbeutesteigerung eingesetzt werden, wie es unter A. II3.4 beschrieben wurde.

Da die Literatur nicht genauer darauf eingeht, ob Inhibitoren der P<sub>450</sub>-abhängigen Monooxygenasen ebenso Flavin-abhängige Monooxygenasen inhibiert, wurde der Stamm Tü 1892 in SM-Medium kultiviert mit dem Ziel, Collinoketon (**56**) als Desoxyderivat des Collinolactons (**7**) zu erhalten. Die Kulturen wurden ab der 24. Fermentationstunde über einen Zeitraum von 12 Stunden mit Ancymidol **53** (33 mg pro 100 mL Kultur) in drei Portionen versetzt. Ancymidol **53** war weder in Wasser, DMSO oder MeOH ausreichend löslich, so dass der Kulturlösung eine Suspension in allen drei Lösungsmitteln zugefüttert wurde.

Die Kulturen wurden standardmäßig *via* Ethylacetatextraktion aufgearbeitet. In den Rohextrakten der Ancymidol-Fütterung konnte weder mittels HPLC-MS (HPLC 3, Säule 2, Programm 2) noch mithilfe Dünnschichtchromatographie Collinolacton (**7**) detektiert werden. Ein Produkt mit der nominellen Masse von  $m/z = 344.45$ , das dem Collinoketon (**56**) und somit dem gesuchten Desoxyprodukt des Collinolactons (**7**) entspräche konnte, als  $[M+H]^+$ -, als  $[M+Na]^+$ -Peak und nicht als andere Addukte in einer HPLC-ESI-MS Analyse nachgewiesen werden. Das bedeutete, dass die Oxidation vermutlich durch keine P<sub>450</sub>-abhängigen Monooxygenase katalysiert wird, was die Annahme, dass wir es mit einer Baeyer-Villiger Oxygenase zu tun haben, bestärkte. Obwohl die Kulturen ein gutes Wachstum zeigten, was anhand der olivgrünen Färbung der Kulturbrühe festgestellt wurde, schien der P<sub>450</sub>-abhängige Monooxygenase Inhibitor auf die Biosynthese des Collinolactons Einfluss genommen zu haben, der derzeit nicht genauer erklärt werden kann. Die Biosynthese ist nicht auf der Stufe des Collinoketons (**56**) zum Stillstand gekommen und es konnte kein Collinolacton (**7**) identifiziert werden.

#### 4. Diskussion und Hypothese zur Biosynthese des Collinolactons

Das Collinolacton (**7**) ist ein neuartiger Naturstoff mit einem ungewöhnlichen 7-10-6-tricyclischen Grundgerüst, dessen 10-Ring ein Trien ist und dessen beide äußeren Ringe Lactone sind. Der Literatur zufolge konnte bisher kein Sekundärmetabolit gefunden werden, der ein solches Grundgerüst trägt. Mit Hexacyclinsäure (**57**)<sup>[104]</sup> und Abyssomicin (**58**)<sup>[105]</sup> sind zwei interessante Ringsysteme bekannt, die im Falle des Abyssomicins (**58**) als Inhibitor der *p*-Aminobenzoessäure/Tetrahydrofolat Biosynthese wirken und damit eine antibiotische Aktivität gegen vancomycinresistente Staphylokokken aufweisen.

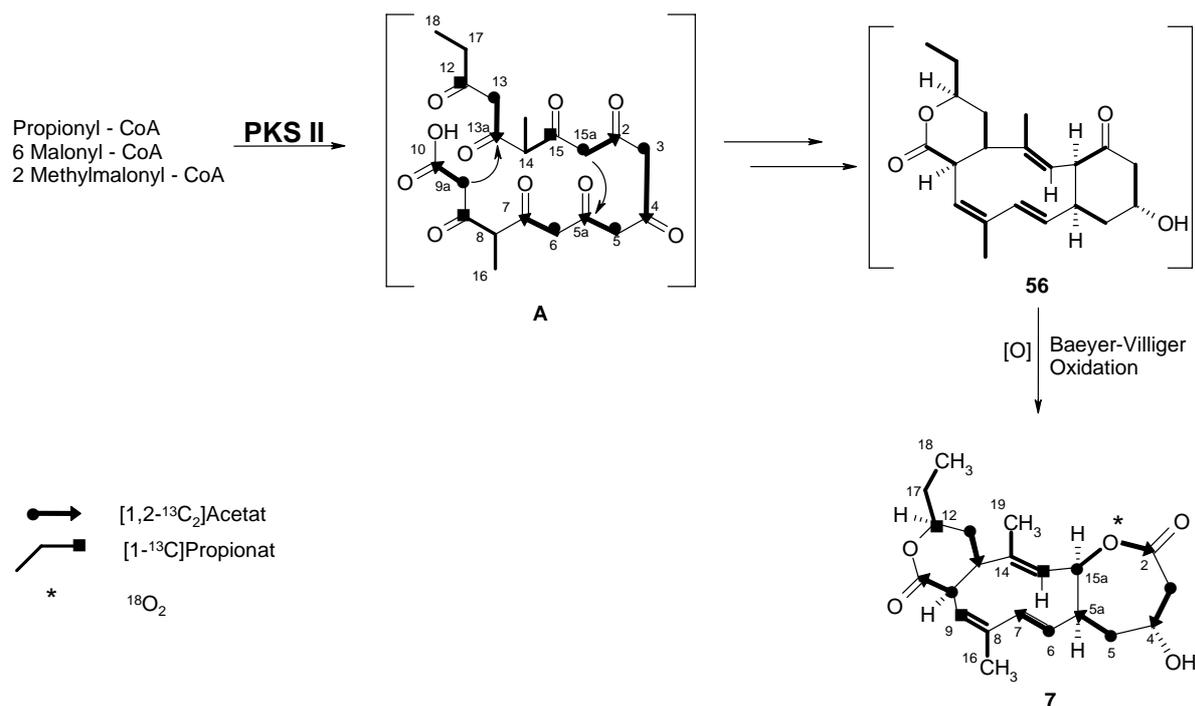


**Abbildung 43:** Zwei literaturbekannte Sekundärmetabolite: Hexacyclinsäure (**57**) und Abyssomicin (**58**).

Die Fütterungsexperimente mit  $^{13}\text{C}$ - und  $^{18}\text{O}$ -markierten Vorläufern führten zur vollständigen Aufklärung der Biogenese des Kohlenstoff- und Sauerstoffgerüsts des Collinolactons (**7**) aus *Streptomyces* Gö 40/10 und Tü 1892. Die aus den Einbauexperimenten erhaltenen Einbaumuster sind in Abbildung 44 dargestellt. Das Collinolacton (**7**) entsteht auf dem Polyketid-Biosyntheseweg aus sechs Acetateinheiten, von denen eine durch den Einbau eines atmosphärischen Sauerstoffatoms durch eine Baeyer-Villiger analoge Oxidation getrennt wird. An der Bildung der tricyclischen Struktur des Cyclodecatriens war einerseits der erfolgreiche Einbau fünf intakter  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetateinheiten beteiligt, die aufgrund des Kopplungsmusters detektiert werden konnten. Weiterhin konnte der Einbau einfach markierter Vorläufer und die durch die Baeyer-Villiger-Oxidation getrennte  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetateinheit anhand erhöhter Signalintensität im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum bewiesen und der spezifische Einbau berechnet werden. Die Auswertung der Markierungsmuster belegt, dass die Biosynthese unter Bildung eines Nonaketids stattfand. Die Kohlenstoffkette C-12/C-17/C-18 ist dabei die Startereinheit. Somit ist eindeutig festgelegt, dass die Methylgruppen C-16 und C-19 aus Propionateinheiten und damit aus einer Polyketidketten-Kettenverzweigung hervorgeht. Dass die Ketofunktion des Collinoketons (**56**) in der späten Biosynthese zu einer Lactonfunktion oxidiert wird, konnte durch den Einbau von markiertem Luftsauerstoff eindeutig bewiesen werden. Mittels Oxidation wird ein Sauerstoffatom aus der Atmosphäre zwischen C-15a und C-2 an Position O-1 eingeführt, der dabei eine vormals intakte Acetateinheit spaltet. Der erfolgreiche Einbau von  $^{18}\text{O}$ -Sauerstoff in das Gerüst des Collinolactons (**7**) wurde durch den  $\alpha$ -Isotopenshift (ca. 30 ppb) im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des  $^{18}\text{O}$ -angereicherten Spektrums eindeutig gezeigt. Es ist zu vermuten, dass es sich um eine

Baeyer-Villiger Oxidation handelt, für die es einige literaturbekannte Beispiele gibt, bei denen ein Sechsringketon zu einem Siebenringlacton oxidiert wird.<sup>[132-137]</sup> Beispielsweise wird auf dem Biosyntheseweg der Urdamycine, dass instabile Sechsringketon UWM 6 (**17**) zum Siebenring-Lacton (**18**) durch eine Baeyer-Villiger analoge Oxidation gebildet wird. Die als Baeyer-Villiger-Oxidation beschriebene Reaktion wird auf molekularbiologischer Ebene durch das Enzym *UrdM* katalysiert.<sup>[33]</sup>

Die aus den Fütterungsexperimenten ausgewerteten Einbaumuster warfen die Frage auf, nach welchem Polyketidsynthase-Typ das Collinolacton (**7**) hinsichtlich seiner Struktur eine Sonderstellung zwischen typischen Sekundärstoffen der Gruppe der Makrolide (modular, Typ I) und den polycyclischen, aromatischen Polyketiden (iterativ, Typ II) einnimmt.<sup>[106]</sup> Die PKS vom Typ I ist vor allem als Syntheseapparat von makrocyclischen Lactonen bekannt. Acetat und Propionat gelten als Grundbausteine der Kettenverlängerung von PKS Typ I aufgebauten Verbindungen. Die Struktur des Collinolactons (**7**) weist jedoch kein Makrolacton, das typische Kohlenstoffskelett von Makroliden auf. Es ist denkbar, dass in der Biosynthese zunächst ein Makrocyclus gebildet wird, der durch post-PKS-Enzyme zur Dreiringstruktur umgebaut wird, denn Collinolacton (**7**) trägt die charakteristische Funktionalität des Lactons. Es ist denkbar, dass Collinolacton (**7**) nach dem Mechanismus einer Typ II PKS aufgebaut werden könnte. Wäre eine PKS Typ II an dem Aufbau von Collinolacton (**7**) beteiligt, so würde iterativ ein Nonaketid (**A**) durch aufeinander folgende Claisenkondensationen aufgebaut. Nach geeigneter Faltung des Vorläufers würden die intramolekularen Ringschlüsse entsprechend der Pfeile in Abbildung 44 stattfinden. Durch post-PKS Modifikationen gelänge man zum vorgeschlagenen Collinoketon (**56**), dass *via* Baeyer-Villiger Oxidation zum Collinolacton (**7**) oxidiert würde (Abbildung 44). Gegen diese Hypothese spricht, dass Propionat ein für PKS II untypische Verlängerungseinheit darstellt. Ferner sollte die Methylgruppe an C-14 die Bildung des Triens behindern. Ferner enthält die Struktur des Collinolactons (**7**) keinen aromatischen Ring, was gegen eine Typ PKS II spricht. Vor allem wegen des Vorkommens der Propionateinheiten wird der Biosyntheseweg durch eine iterativ aufgebaute PKS Typ II als unwahrscheinlich angenommen.



**Abbildung 44:** Hypothetisches Biosyntheseschema von Collinolacton (7) unter Beteiligung der PKS II.

Basierend auf den Ergebnissen der Fütterungsexperimente wird hier ein Mechanismus zur Biosynthese des Collinolactons (7) vorgeschlagen, der dem Weg der PKS Typ I folgt. Demnach umfasst die Biosynthese-Hypothese, dass die Polyketidsynthese vom Typ I zunächst ein Nonaketid (A) aufbaut, bestehend aus sechs Acetat- und drei Propionat-Einheiten. Die Polyketidkette wird durch entsprechende Enzymaktivitäten, die in der modular aufgebauten PKS Typ I verankert sind, funktionalisiert. Anschließend findet die Lactonisierung zu einem Makrocyclus (B) zwischen O-11 und C-12 statt. Durch Faltung des Makrolactons und damit günstige Ausrichtung der Doppelbindungen könnten die zwei Ringschlüsse zum Collinoketon (56) unter Verschiebung der Positionen der Doppelbindungen stattfinden. Beide Ringschlüsse könnten konzertiert nach einer [6+4]Cyloaddition zum Collinoketon (56) erfolgen. Dieser konzertierte Mechanismus ist demnach ausschlaggebend dafür, dass die intakten <sup>13</sup>C-markierten Acetateinheiten, nicht wie üblicherweise in PKS I Produkten zwischen den Doppelbindungen liegen, sondern in diesem Falle direkt auf den Doppelbindungen (Abbildung 45). H.-J. SCHIEWE vermutete an dieser Stelle, dass die beiden von ihm vorgeschlagenen *E/Z*-Isomere sich durch zwei verschiedene Ringschlüsse zum Collinoketon (56) aufbauen lassen. Im Jahr 1965 wurde von R. HOFFMANN und R. B. WOODWARD eine [6+4]Cyloaddition in der chemischen Synthese theoretisch beschrieben. Aus ihren Rechenexemplen geht hervor, dass die Reaktion zum Aufbau von Trienen,

theoretisch möglich ist.<sup>[107]</sup> Erste praktische Arbeiten dazu führte K. N. HOUK im Jahre 1970 aus.<sup>[108,109,110]</sup> Im Jahr 1998 machen sich J. H. RIGBY und K. R. FALES die [6+4]Cyloaddition zunutze um das Streptovaricin D synthetisch aufzubauen.<sup>[111]</sup> Eine [6+4]Cyloaddition als Biosyntheseschritt für Sekundärmetaboliten aus Pflanzen, Pilzen oder Streptomyceten wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Anschließend an die [6+4]Cycloaddition wird zwischen C-2 und C-15a in der späten Biosynthese ein Sauerstoffatom *via* Baeyer-Villiger Oxidation eingeführt und so das Collinolacton (**7**) aufgebaut (Abbildung 45).<sup>[112,113]</sup> In ein Produzentenstamm der Firma *Analyticon* wurde die Existenz des Collinoketons (**56**) analytisch mittels HPLC-MS nachgewiesen.<sup>[114]</sup>

Bisher konnte der Biosyntheseweg aufgrund von Fütterungsexperimenten mit isotoopenmarkierten Voläufnern nur postuliert werden. Wünschenswert wäre es, die biosynthetischen Vorstufen zu isolieren. Ob der lactonisierte Makrocyclus **B** je isoliert werden kann ist unsicher. Das Collinoketon (**56**), sollte durch Fütterungsexperimente von Oxygenase-Hemmstoffen oder veränderte Kultivierungsbedingungen geniert werden können. Fütterungen von Ancymidol als Enzyminhibitoren der P<sub>450</sub>-abhängigen Monooxygenase führten nicht zum Erfolg, da BVMO nicht metall- sondern Flavin-abhängige Enzyme benötigen. Dem Stamm Gö 40/10 oder Tü 1892 sollten Enzyminhibitoren einer Flavin-abhängigen Monooxygenase zugegeben werden, die bis heute nicht literaturbekannt sind.

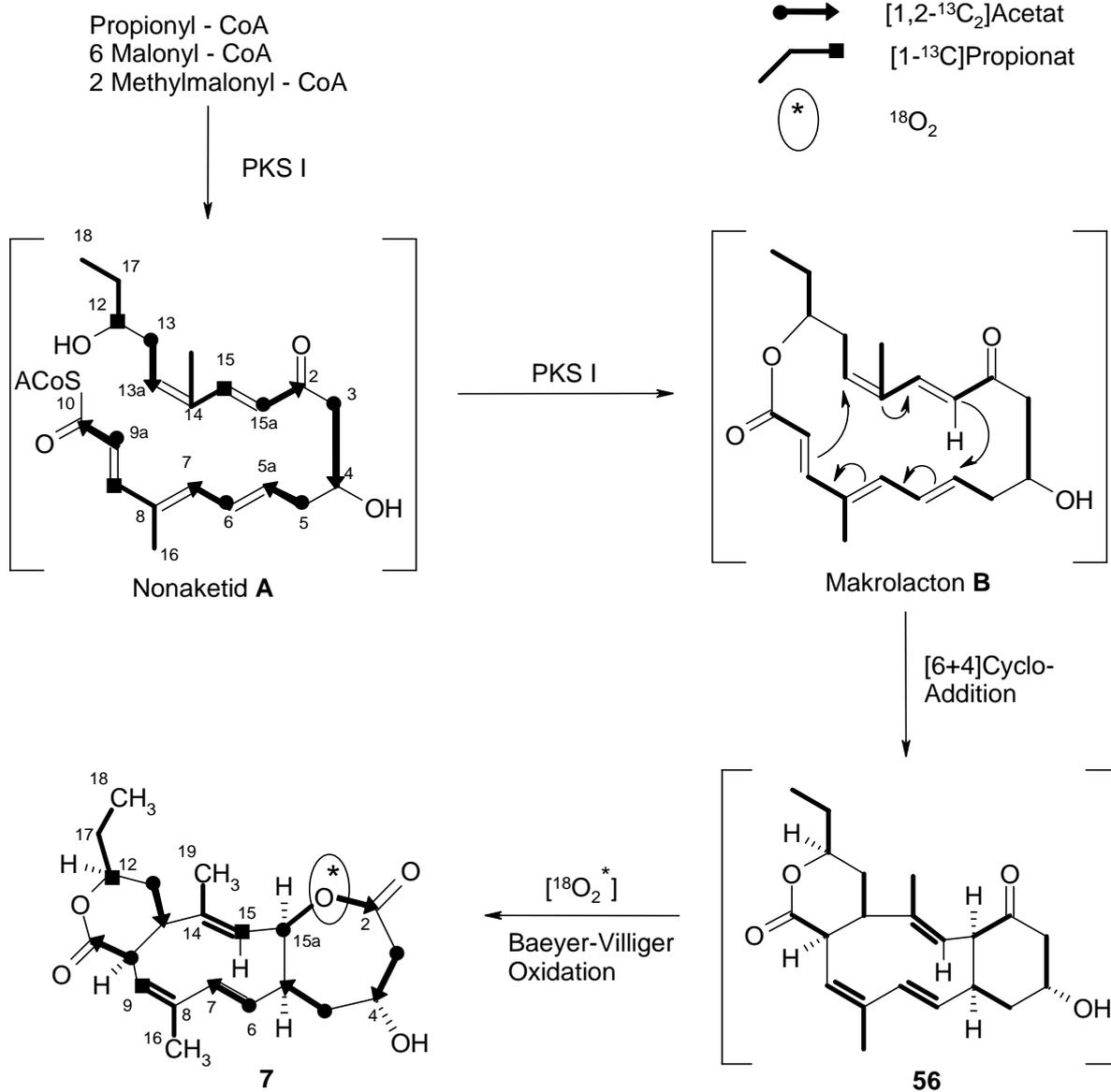


Abbildung 45: Biosynthese-Hypothese des Collinolactons (7) unter Beteiligung der PKS-I

## IV Chemische Modifikationen des Collinolactons

Arbeiten von H.-J. SCHIEWE zeigten, dass von ihm isoliertes Collinolacton-Produkt sowohl eine zytotoxische Aktivität gegenüber Magencarcinom (HM02), Lebercarcinom (HepG2) und Mammacarcinom (MCF7) hat, als auch eine Mikrotubuli-stabilisierende und somit eine zytostatische Wirkung zeigt. Diese viel versprechende Grundlage war der Anlass, die Aktivitäten verschiedener Derivate des Collinolactons (7) zu untersuchen.

Ferner waren Kristallisationsversuche an Collinolacton (7) selbst bisher fehlgeschlagen. Daher sollten Derivate hergestellt werden, die sich kristallisieren ließen.

Bevor bewiesen werden konnte, dass es sich beim Collinolacton (7) um eine Reinsubstanz in Form von Rotameren handelt, wurde die Überlegung angestellt, dass durch Derivatisierung die vermeintlichen Isomere anhand ihrer Polaritäten unterscheidbar sein könnten, und so ihre Trennung leichter zu erreichen sei. Da es sich jedoch, wie in Kapitel A II.5.3 beschrieben, um Konformere handelte, sollten Analoga synthetisiert werden, die C-14 und C-15 so stabilisieren, dass keine Rotation mehr möglich ist. Alle hier beschriebenen Reaktionen wurden nicht gezielt optimiert, da die Menge an verfügbarem Collinolacton (7) immer den limitierenden Faktor der Derivatisierungsarbeiten darstellte.

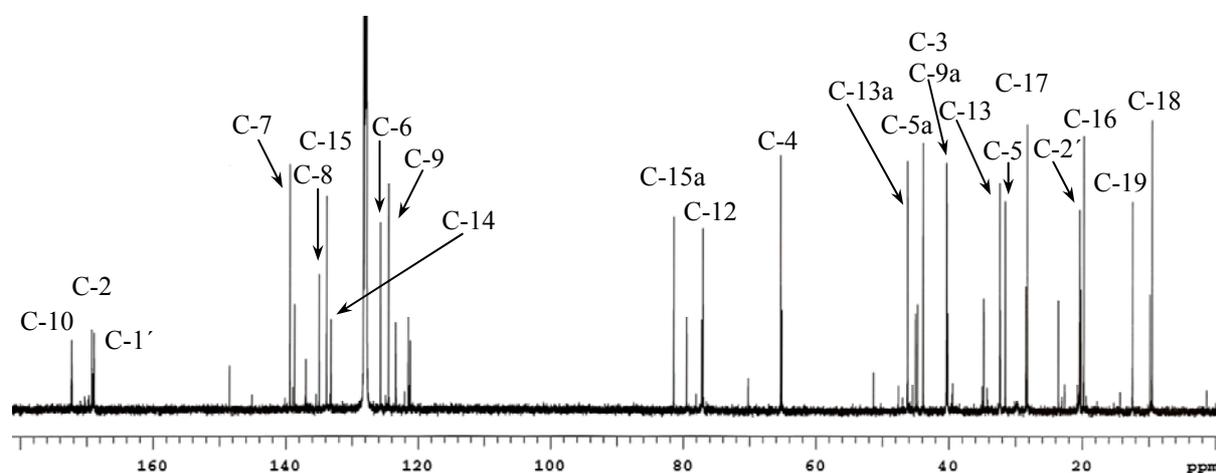
### 1. Reaktionen an C-4 des Collinolacton-Gerüsts

Die Hydroxylgruppe an C-4 des Collinolacton-Grundgerüsts eignete sich, um Veresterungen mit verschiedenen Substituenten durchzuführen. Die Selektivität stellte keine Probleme dar, da diese Hydroxygruppe die einzige OH-Gruppe im Molekül ist. Mit einer Modifikation an C-4 erhoffte man sich, dass die Derivate der vermeintlichen Isomere unterschiedliche Polaritäten aufweisen und dadurch eine Trennung möglich sei, oder durch Einführung von sperrigen Substituenten sich die Kristallisationseigenschaften verbessern.

#### 1.1. 4-O-Acetyllollinolacton (59)

Die Umsetzung von Collinolacton (7) mit Acetanhydrid (2 mL) in Pyridin (1 mL) bei Raumtemperatur über 16 h mit anschließender Aufarbeitung und Isolierung ergab einen weißen amorphen Feststoff mit der Summenformel  $C_{23}H_{30}O_6$ . Die Masse von  $m/z = 402.49$  und die Summenformel konnte durch HR-ESI-MS bestätigt werden. Die Reaktion lieferte das

4-*O*-Acetyllincolacton (**59**) in einer Ausbeute von 17.8 mg (91%) nach Aufreinigung zur Reinsubstanz an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 8:2). Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (600 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) zeigte neben den scharfen Signalen des Collinolacton-Grundgerüsts ein auf  $\delta_{\text{H}} = 4.98$  zu tiefem Feld verschobenes Signal von 4-H. Weiterhin ließ sich das neu eingeführte charakteristische Signal der Methylgruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 1.66$  als Singulett erkennen. Dem <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (150.8 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) konnten die Signale der Methylgruppe bei  $\delta_{\text{C}} = 20.4$  und die neue Ester-Carbonylgruppe bei  $\delta_{\text{C}} = 168.9$  entnommen werden. Die NMR-Spektren zeigten den doppelten Signalsatz für ein *anti*- (**59<sub>anti</sub>**) und ein *syn*-4-*O*-Acetyllincolacton (**59<sub>syn</sub>**). Die Rotameren-Verhältnisse beliefen sich auf 4:1 bei Raumtemperatur und C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> als Lösungsmittel und waren damit identisch zum Naturstoff Collinolacton (**7**).



**Abbildung 46:** <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (150.8 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) von 4-*O*-Acetyllincolacton (**59**) mit dem doppelten Spektrensatz für das *anti*- und *syn*-Rotamer von **59**.

## 1.2. 4-*O*-Benzoyllincolacton (**60**)

Die Umsetzung von Collinolacton (**7**) mit 1.5 eq. Benzoesäure, 1.5 eq. *N*'-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbo-diimid-hydrochlorid (EDCI) und 4-*N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bei Raumtemperatur über 19 h, nachfolgender Aufarbeitung und Aufreinigung an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 8:2) lieferte das 4-*O*-Benzoyllincolacton (**60**) in einer Ausbeute von 3.9 mg (42%). Die Summenformel von C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub> und die Masse von  $m/z = 464.56$  wurden durch HR-ESI-MS bestätigt. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (600 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) zeigte neben den scharfen Signalen des Collinolacton-Grundgerüsts ein auf  $\delta_{\text{H}} = 5.18$  zu tiefem Feld verschobenes Signal von 4-H. Ferner ließen sich die neu aufgetretenen Signale der fünf Protonen der Benzoylgruppe bei  $\delta_{\text{H}} = 7.16 - 8.09$  eindeutig identifizieren. Dem <sup>13</sup>C-

NMR-Spektrum (150.8 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>) konnten die fünf Methingruppen des Benzolrings bei  $\delta_C = 128.7 - 133.4$ , das quartäre Kohlenstoffatom bei  $\delta_C = 130.5$  und die neu eingeführte Estergruppe bei  $\delta_C = 164.9$  entnommen werden. Die Zuordnung der Protonen der Benzoylgruppe zum jeweiligen Kohlenstoffatom wurde über ein 2D-HSQC-Spektrum eindeutig bestimmt. Die NMR-Spektren des 4-*O*-Benzoylcollinolactons (**60**) zeigten die Rotamere des *anti*- und *syn*-Konformers im Verhältnis 4:1. Da die eingeführte Benzoylgruppe räumlich weit von C-14 und C-15 getrennt liegt, weichen die NMR-Daten der eingeführten Gruppe der *anti*- und *syn*-Konformere untereinander nicht stark voneinander ab.

### 1.3. 4-*O*-*p*-Brombenzoylcollinolacton (**61**)

Normalerweise lassen sich *p*-Brombenzoylderivate gut kristallisieren. In einem Vorversuch wurde Collinolacton (**7**) mit 8.3 Moläquivalenten *p*-Brombenzoylchlorid sowie DMAP in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> umgesetzt. Nach Aufarbeitung konnte 3.4 mg des 4-*O*-Brombenzoylderivat in einer Ausbeute von 39% aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden. Um auch die Möglichkeit einer Veresterung mit freien Säuren zu prüfen, wurde Collinolacton (**7**) in einem weiteren Ansatz mit 1.5 Moläquivalenten *p*-Brombenzoesäure sowie *N'*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbo-diimid-Hydrochlorid (EDCI) als Kupplungsreagens und katalytischen Mengen DMAP versetzt. Hier konnte das 4-*O*-Derivat in 48% Ausbeute nach Aufarbeitung gewonnen werden. Es wurde ebenfalls ein Derivat **61** erhalten, das mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gelb anfärbte. Aus der HR-ESI-MS konnte die Masse mit  $m/z = 543.46$  und die Summenformel zu C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>BrO<sub>6</sub> bestimmt werden. Das ins Tieffeld verschobene Proton von 4-H wurde in <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von **61** bei  $\delta_H = 5.54$  detektiert. Es handelt sich um einen symmetrischen Benzoylrest, der durch die Protonensignale mit doppelter Integralintensität ( $\delta_H = 7.65$  und  $7.92$ ) identifiziert werden konnte. Im <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum wurden fünf neue Signale beobachtet, wobei zwei Methingruppen, mit doppelter Intensität ( $\delta_C = 131.2$  und  $132.2$ ) auftraten. Das quartäre Kohlenstoffatom mit Bromsubstitution wurde zu  $\delta_C = 129.0$  und das C-1' mit Carboxylsubstitution  $\delta_C = 131.4$  zugeordnet. Das Signal der Estergruppe hatte einen charakteristischen Wert von  $\delta_C = 165.0$ . Die NMR-Spektren des 4-*O*-*p*-Brombenzoylcollinolactons (**61**) zeigten den doppelten Signalsatz des *anti*- und *syn*-Konformers im Verhältnis 4:1. Da die eingeführte 4-Brombenzoylgruppe räumlich weit von C-14 und C-15 getrennt liegt, wichen die NMR-Daten der eingeführten Gruppe der *anti*- und *syn*-Konformere untereinander nicht stark voneinander ab.

#### 1.4. 4-*O*-*o*-Brombenzoylcollinolacton (**62**)

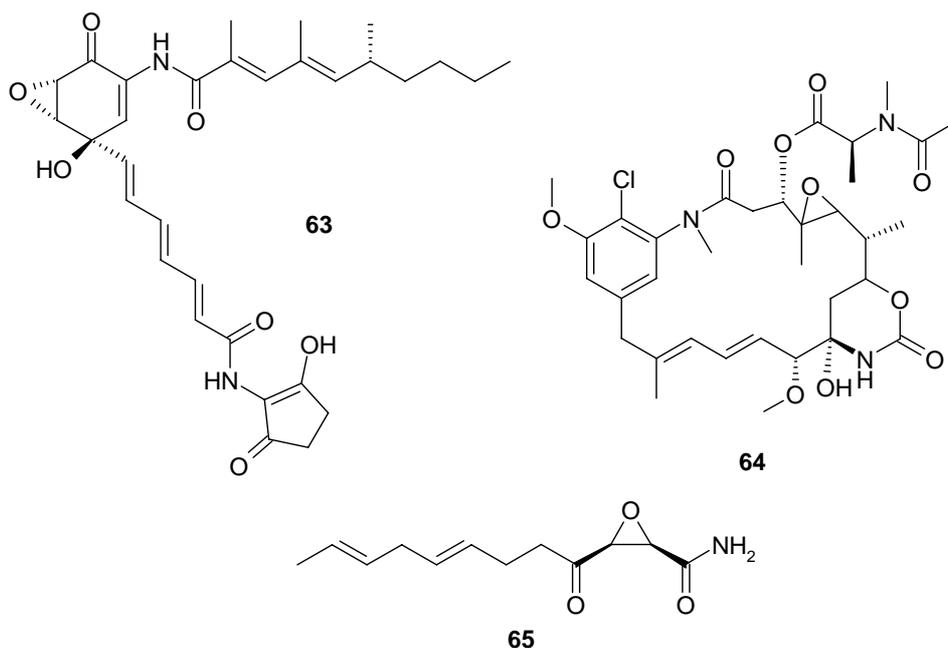
Durch Umsetzung von Collinolacton (**7**) mit *o*-Brombenzoesäure in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> unter Zusatz katalytischer Mengen DMAP und 1.5 Moläquivalenten EDCI konnte das 4-*O*-*o*-brombenzoylierte Produkt **62** in 72% Ausbeute (45.3 mg) nach Aufreinigung dargestellt werden. Neben den NMR-Daten des Collinolacton-Grundgerüsts konnte anhand des ins Tieffeld verschobenen Protons ( $\delta_{\text{H}} = 5.58$ ) der Erfolg der Umsetzung festgestellt werden. Die Protonen der *o*-Brom-Benzoylgruppe waren zwischen  $\delta_{\text{H}} = 7.42$  und  $\delta_{\text{H}} = 7.81$  zu beobachten. Die <sup>13</sup>C-NMR-Signale dieser Methingruppen zeigten eine chemische Verschiebung von  $\delta_{\text{C}} = 127.8 - 133.4$ . Die quartären Kohlenstoffatome wiesen eine chemische Verschiebung von  $\delta_{\text{C}} = 121.4$  (*ortho*-Brom-Position des Benzoylrings),  $\delta_{\text{C}} = 131.2$  (aromatisch) und  $\delta_{\text{C}} = 165.6$  (Esterfunktion) auf. Ähnlich wie bei dem 4-*O*-*p*-Brombenzoylcollinolacton (**62**) zeigten die NMR-Spektren die typische Verdopplung des Signalsatzes als *anti*- und *syn*-Konformer im Verhältnis 4:1. Es zeigten sich kaum Unterschiede in den NMR-Daten der eingeführten Gruppe der *anti*- und *syn*-Rotamere untereinander (max.  $\Delta\delta_{\text{H/C}} = 0.5$  ppm).

## 2. Reaktionen an den Doppelbindungen des Collinolactons

Das Grundgerüst des Collinolactons (**7**) enthält drei Doppelbindungen, die alle im 10-Ring liegen (C-6/C-7, C-8/C-9 und C-14/C-15). Gezielte Reaktionen (Oxidation bzw. Reduktion) an den Doppelbindungen, die eine sterische Hinderung des 10-Rings des Collinolactons (**7**) zur Folge haben, könnten die erwünschte Aufhebung der Rotationsisomerie bewirken. Zur Derivatisierung der Doppelbindungen in Collinolacton (**7**) boten sich Hydrierung als effiziente Reaktion mit hoher Ausbeute und Epoxidierung an.

### 2.1. Epoxidierung mit *m*-CPBA

Da es eine Vielzahl biologisch aktiver Verbindungen gibt, deren Pharmakophore Epoxidgruppen sind, wurde eine Epoxidierung des Collinolactons (**7**) angestrebt. Epoxidstrukturelemente in Sekundärmetaboliten verschiedener Produzenten induzieren häufig eine besondere Wirkung. Es sei hier nur auf einige dieser Naturstoffe verwiesen wie z. B. Manumycin (**63**)<sup>[115]</sup>, Maytansin (**64**)<sup>[116]</sup> oder Cerulenin (**65**)<sup>[102]</sup> (Abbildung 47).



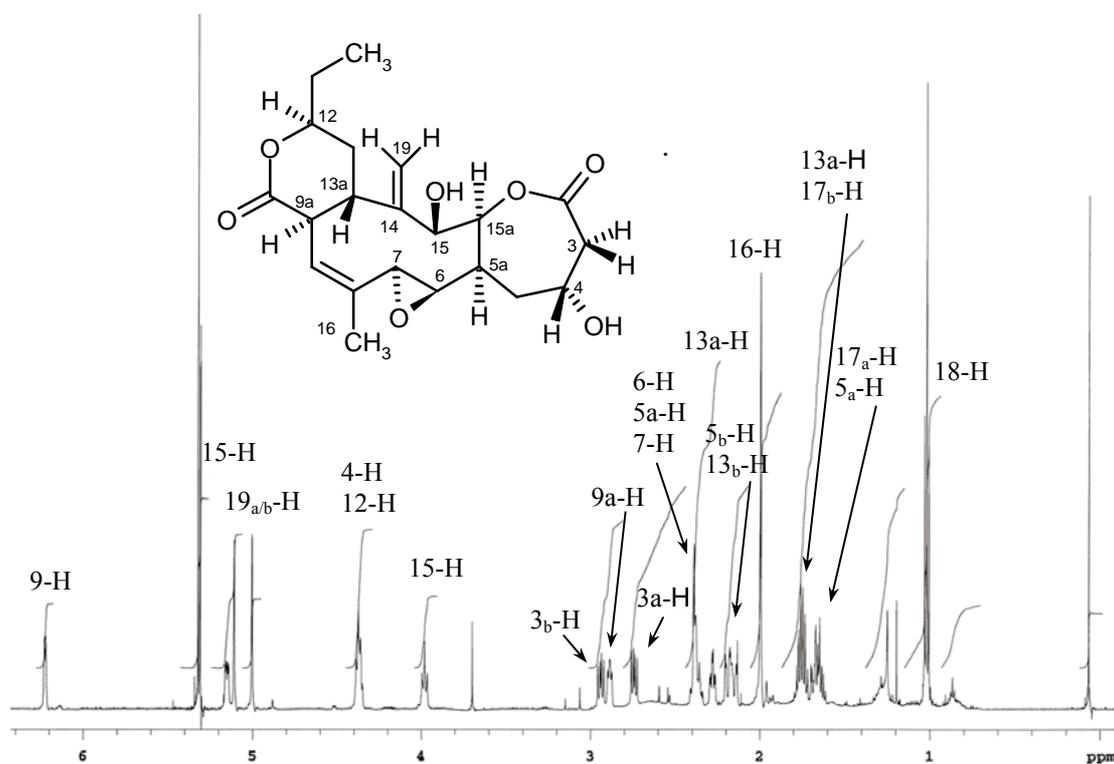
**Abbildung 47:** Naturstoffe aus Actinomyceten mit Epoxidstruktur: Manumycin (**63**), Maytansin (**64**) und aus Pilzen Cerulenin (**65**).

Für die Epoxidierung von Collinolacton (**7**) bot sich eine Vielzahl von Reagenzien an, die zwischen den zwar ähnlichen Reaktivitäten aber den unterschiedlichen chemischen Umgebungen der Doppelbindungen differenzieren sollten. Weiterhin war zu vermuten, dass die vorhandenen Stereozentren und die Art der Doppelbindungen (konjugiert und isoliert) eine Kontrolle auf die Epoxidierung ausüben. Als gängige Epoxidierungsreagenzien finden Wasserstoffperoxid und seine Derivate wie z. B. *tert*-Butylhydroperoxid (TBHP) und organische Persäuren Verwendung. Durch den Einsatz verschiedener Katalysatoren (z. B. VO(acac)<sub>2</sub> oder MoO<sub>2</sub>(acac)<sub>2</sub>) kann eine zusätzliche asymmetrische Kontrolle erreicht werden. Als universelle Oxidationsmittel liefern Persäuren wie *m*-Chlorperbenzoesäure (*m*-CPBA)<sup>[117]</sup> und Nitrobenzoesäuren<sup>[118]</sup> hervorragende Ergebnisse bei der Epoxidierung von Doppelbindungen, wobei jedoch keine Stereokontrolle auf die Reaktion ausgeübt wird. Die Kontrolle muss von den zu epoxidierenden Ausgangsverbindungen selbst ausgehen, wie Beispiele aus den Totalsynthesen von Fumagillin<sup>[119]</sup>, Dynemicin A<sup>[120]</sup>, Vernomenin<sup>[121]</sup> oder L-Triptonid<sup>[122]</sup> belegen.

### 2.1.1. 14-Methylen-15-hydroxy-6,7-monoepoxycollinolacton (**66**)

Die Reaktion von Collinolacton (**7**) mit 1.0 Moläquivalent *m*-CPBA ließ sich dünnschichtchromatographisch über vier Stunden sehr gut verfolgen. Es konnte die Bildung

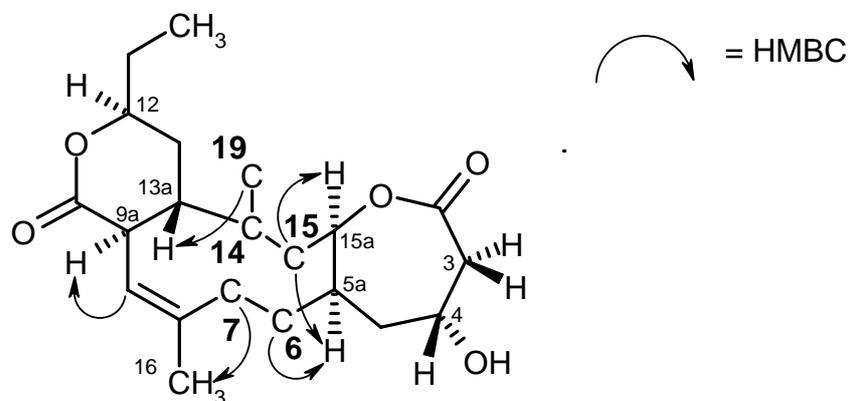
einer neuen Hauptverbindung beobachtet werden, die einen kleineren  $R_f$ -Wert ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 8:2) aufwies als Collinolacton (**7**). Die Reaktion wurde unter Argonatmosphäre vier Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Trennung des Produktgemisches und Aufreinigung an Kieselgel konnte die neu entstandene Verbindung (**66**) in 35% Ausbeute gewonnen werden. Den  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten wurde entnommen, dass durch die Umsetzung mit *m*-CPBA ein neues Derivat **66** dargestellt wurde, dass ein einheitliches Konformer zeigt. Ein doppelter Signalsatz in den NMR-Spektren von **66** wurde nicht beobachtet (Abbildung 48).



**Abbildung 48:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des 14-Methylen-15-hydroxy-monoepoxycollinolacton (**66**) in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  (600 MHz) gemessen.

Dem  $^1\text{H}$ -NMR konnten alle Protonen des 6- und 7-Ring-Lactons mit der C-12-Ethylgruppe entnommen werden. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Daten des Cylcodecatriens hatten sich stark verändert. Eine Ausnahme waren die chemischen Verschiebungen der Protonen 5a-H, 9a-H, 13a-H und 15a-H ( $\delta_{\text{H}} = 2.38, 2.89, 2.28$  und  $5.15$ ). Die Doppelbindung an C-8/C-9 ( $\delta_{\text{H}} = 6.22$ ) und die an C-8 ( $\delta_{\text{H}} = 2.00$ ) gebundene Methylgruppe zeigten eine starke Tieffeldverschiebung. Zur Charakterisierung des Collinolacton-Derivates **66** mussten 2 D-NMR-Experimente herangezogen werden. Zusätzlich gab das 2 D-NMR-Experiment Sicherheit, dass die in

Abbildung 49 dargestellten und eben beschriebenen Strukturelemente noch vorhanden waren. Daraus wurden abgeleitet, dass eine der konjugierten Doppelbindungen die Doppelbindungen C-6/C-7 und die isolierte Doppelbindung C-14/C-15 durch die Umsetzung mit einem Moläquivalent *m*-CPBA modifiziert (Abbildung 49) wurden.

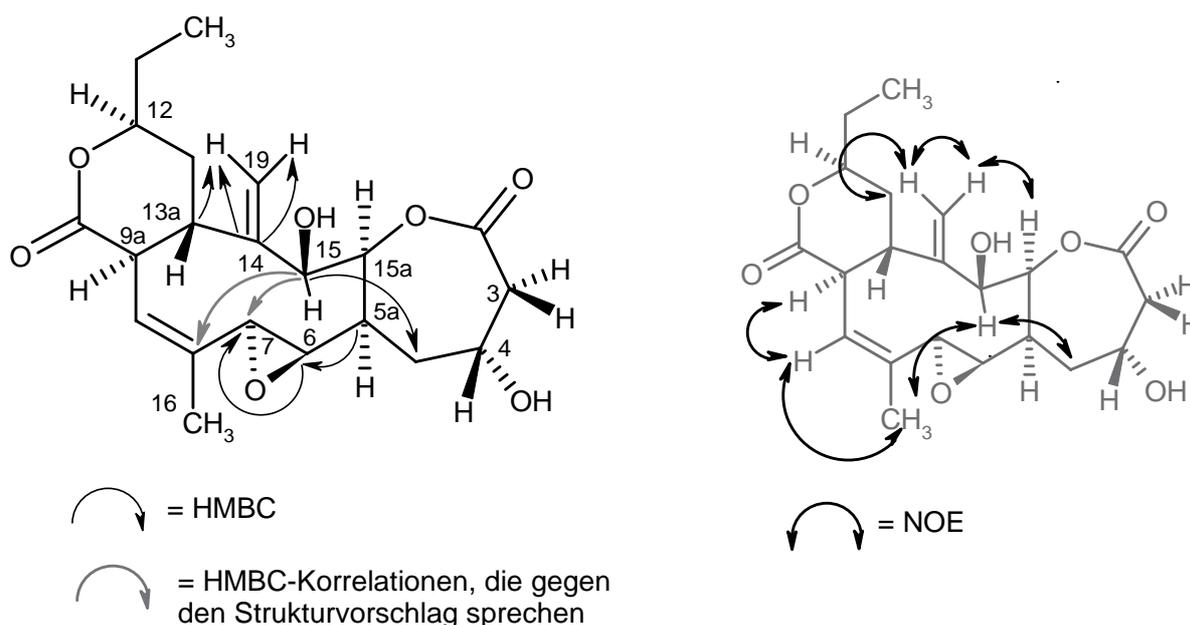


**Abbildung 49:** Eindeutig identifizierter Strukturteil mit vier offenen Positionen am 10-Ring des Monoepoxids des Collinolactons (**66**) mit ausgewählten HMBC-Korrelationen.

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigte fünf zusätzliche Protonen, die zunächst nicht zugeordnet wurden. Es handelte sich bei diesen Protonen um drei Methin- und um eine Methylengruppe. Die Protonen der Methylengruppe wurden als zwei scharfe Singulets bei  $\delta_{\text{H}} = 5.00$  und  $5.11$  beobachtet. Das gemeinsame Kohlenstoffatom hatte eine chemische Verschiebung von  $\delta_{\text{C}} = 105.1$ . Da die Signale als Singulets im Protonenspektrum erschienen, konnten keine weiteren Protonen in ihrer Nachbarschaft zugeordnet werden. Im 2 D-HMBC-Spektrum wurde die Nachbarschaft eines quartären Kohlenstoffs mit einer chemischen Verschiebung von  $\delta_{\text{C}} = 153.2$  identifiziert. Dieses Kohlenstoffatom ist direkt benachbart zu dem Brückenkopfatom C-13a. Somit konnte die Methylengruppe und das benachbarte quartären Kohlenstoffatom als exocyclische Doppelbindung, in Nachbarschaft zu C-13a, identifiziert werden.

Zwei der Methingruppen sind unmittelbar benachbart und hatten eine chemische Verschiebung von  $\delta_{\text{H}} = 2.39$  (2 x) und  $\delta_{\text{C}} = 52.9$  und  $54.0$  (COSY, HMBC). Diese Verschiebungen sprechen für eine Epoxidgruppe. Da über die 2 D-NMR-Spektren die Nachbarschaft zu C-5a und C-8 ermittelt werden konnte, lässt sich daraus der Strukturteil eines Epoxids, liegend zwischen C-5a und C-8 ableiten. Durch Umsetzung von Collinolacton mit *m*-CPBA wurde also eine Epoxidgruppe an C-6/C-7 generiert. Allein die Funktionalität von C-15 stand noch offen. Dem  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum war eine letzte Methingruppe zu entnehmen, die mit einer chemische Verschiebung von  $\delta_{\text{H}} = 3.98$  und  $\delta_{\text{C}} = 78.9$  in tiefem

Feld lag. Diese Werte deuten auf die Nachbarschaft von Sauerstoff hin. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass C-15 eine Hydroxylgruppe trug. Die Auswertung der NMR-Experimente deuten auf die Struktur von 14-Methylen-15-hydroxy-6,7-monoepoxycollinolacton (**66**) hin (Abbildung 50) und müsste die Summenformel  $C_{21}H_{28}O_7$  aufweisen. Um die Nachbarschaften der Protonen, der neu eingeführten Gruppen zu bekräftigen wurde von dem Molekül eine 2D-NOESY-NMR-Spektrum aufgenommen. Ausgewählte NOE-Korrelationen wurden in Abbildung 50 eingezeichnet.

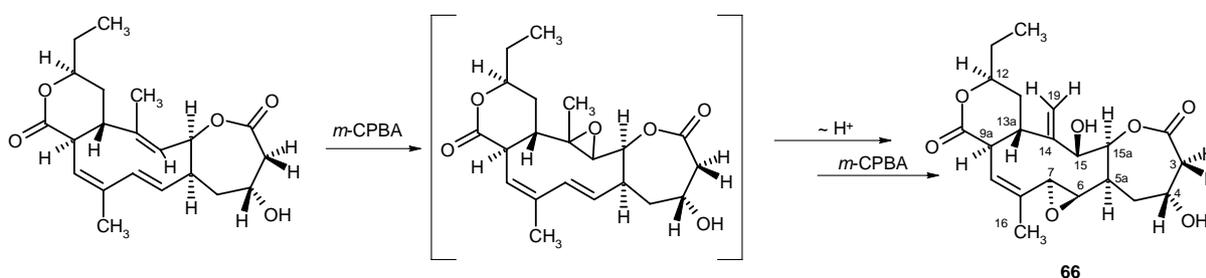


**Abbildung 50:** Postulierte Struktur vom Monoepoxid des Collinolactons (**66**) mit ausgewählten HMBC-Korrelationen (links) und Monoepoxid des Collinolactons (**66**) mit ausgewählten NOE-Korrelationen (rechts).

Zur eindeutigen Beweisführung wurde ein HR-ESI-MS-Spektrum der Substanz aufgenommen. Das Massenspektrum ergab eine Summenformel mit der Zusammensetzung von  $C_{21}H_{28}O_6$  und somit einer Masse von  $m/z = 376.45$ . Diese Ergebnisse standen im Widerspruch zur Auswertung der NMR-Experimente, denn das Massenspektrum ergab eine Summenformel, der ein Sauerstoffatom fehlte. Welche Möglichkeiten der Strukturzuordnung galt es also noch zu bedenken?

Die Sauerstoffatome der Lactone und die Hydroxylgruppe an C-4 galten als richtig zugeordnet, da die NMR-Verschiebungen der Umgebungen durch Vergleich mit Collinolacton (**7**) sich nicht verändert hatten. C-6/C-7 zeigte im Collinolacton (**7**) eine Doppelbindung. Doppelbindung haben generell eine chemische Verschiebung von  $\delta_C = 125 - 140$ . Die chemischen Verschiebungen in dieser derivatisierten Verbindung **66** waren auf  $\delta_C =$

53 – 54 stark ins Hochfeld verändert und sprechen eindeutig für eine Epoxid-Struktur.<sup>[123]</sup> Das letzte Sauerstoffatom C-15 galt es zu überdenken. Allein wegen der chemischen Verschiebungen in  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren war davon auszugehen, dass C-15 sich in der Nachbarschaft von mindestens einem Sauerstoffatom befand. Auch aus chemischer Sicht ist es plausibel, dass C-15 eine Hydroxylgruppe trägt. Der Mechanismus zur Bildung der Doppelbindung an C-14 kann wie folgt hergeleitet werden. Collinolacton (**7**) wurde mit *m*-CPBA umgesetzt. Als erstes wurde die isolierte Doppelbindung (C-14/C-15) von der Persäure angegriffen und es entstand ein Epoxid. Durch das negativ polarisierte Sauerstoffatom wurde der Methylgruppe ein Proton abstrahiert und so entstand sowohl die exocyclische Doppelbindung an C-14 als auch eine Hydroxylgruppe an C-15 (Abbildung 51).



**Abbildung 51:** Reaktionsmechanismus zur Generierung der exocyclischen Doppelbindung an C-14 von **66**.

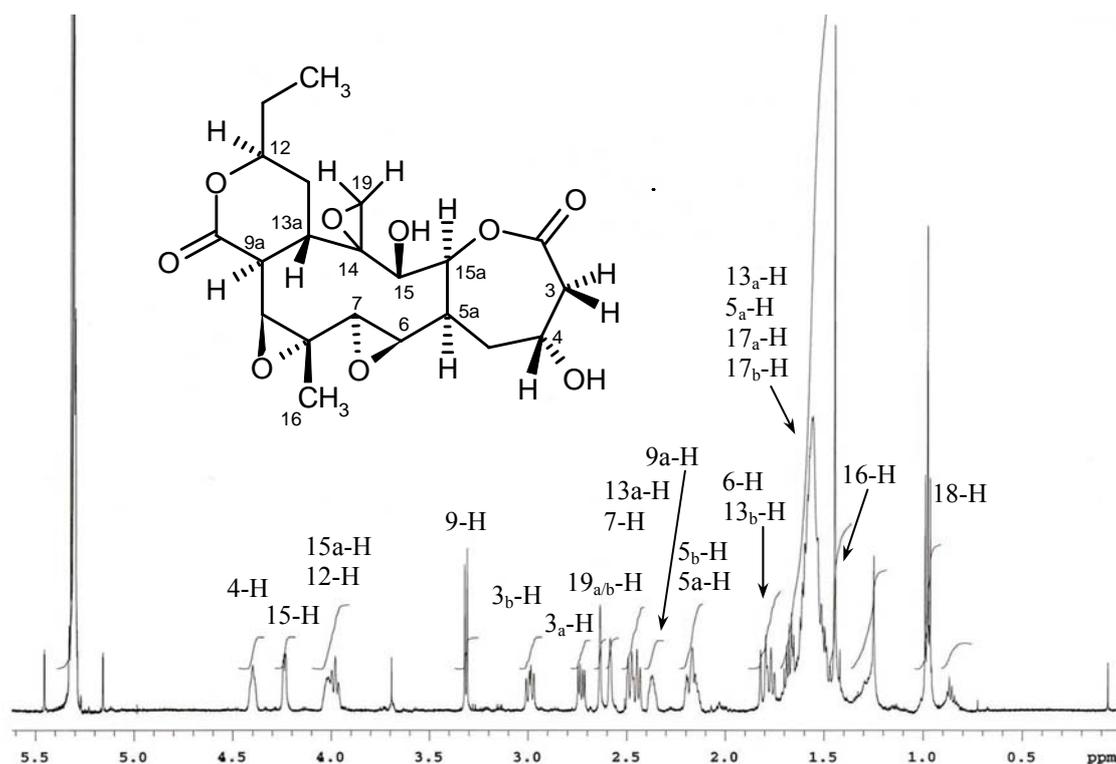
Wäre, wie die Massenspektrometrie andeutet, an C-15 keine weitere Funktionalität gebunden, müsste im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum an der entsprechenden Stelle für C-15 eine Methylengruppe anstatt der beobachteten Methingruppe ( $\delta_{\text{H}} = 3.98$  und  $\delta_{\text{C}} = 78.9$ ) zu beobachten sein.

Der Widerspruch zwischen Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie ist ein noch zu lösendes Problem. Ein weiteres trat in der Auswertung des HMBC-Experiments auf. Zwei Kopplungen, die in Abbildung 50 mit grauen Pfeilen angedeutet sind, können mit der gezeigten Strukturaufklärung nicht erklärt werden. Das Proton 15-H zeigt eine Kreuzkupplung zu den Kohlenstoffatomen C-7 und C-8. Die Kopplung zwischen 15-H und C-5 ist als  $^4J$ -Kopplung anzusehen.

Um den Widerspruch zwischen Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie zu klären, wäre es notwendig einen Kristall dieser Verbindung zu erhalten, um über Röntgen-Kristallographie die Lösung des Strukturproblems zu erhalten. Über Kristallisationsversuche wird in dem Kapitel A IV3 gesprochen.

### 2.1.2. 15-Hydroxy-triepoxycollinolacton (67)

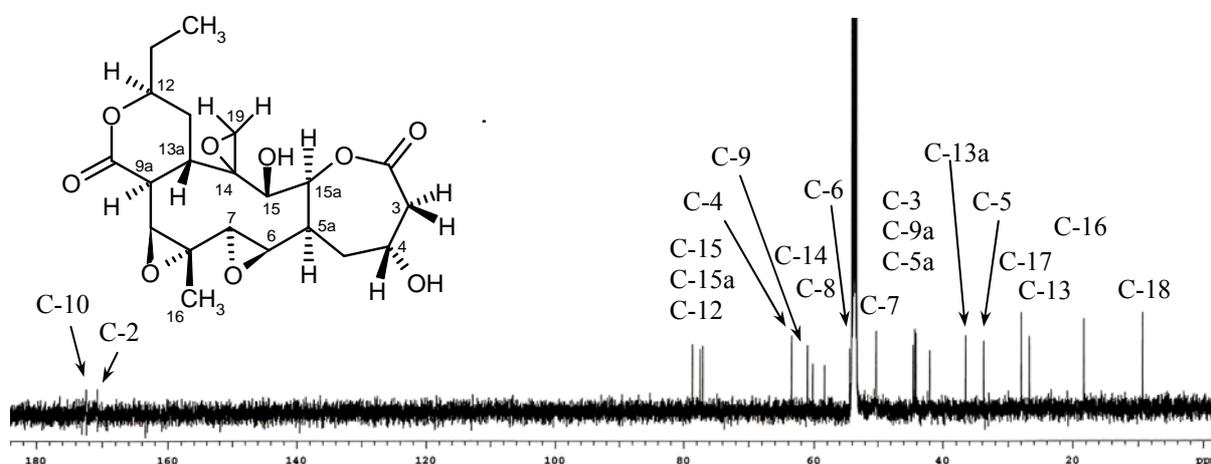
Da bisher nicht alle Doppelbindungen modifiziert wurden, wurde ein zweiter Epoxidierungsversuch mit 4 Moläquivalenten *m*-CPBA durchgeführt. Die Umsetzung fand unter Argonatmosphäre und bei Raumtemperatur statt, und wurde mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Nach vier Stunden Reaktionszeit wurde die Umsetzung abgebrochen, da trotz Zugabe von weiteren 0.5 Moläquivalenten *m*-CPBA die Reaktion zum Stillstand gekommen war. Auf dem Dünnschichtchromatogramm konnte ein Produktgemisch von mindestens vier mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gelb anfärbenden Spots beobachtet werden, von denen einer Collinolacton (7) war. Weil die Polarität durch Mehrfachepoxidierung verstärkt wird, wurde das Produkt mit dem kleinsten *R<sub>f</sub>*-Wert auf dem Kieselgel-DC isoliert. Dieses Produkt **67** konnte in 11% Ausbeute mit 0.5 mg nach Aufarbeitung erhalten werden.



**Abbildung 52:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von 15-Hydroxy-triepoxycollinolacton (**67**) in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (600 MHz) gemessen.

Das <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum zeigte einen einheitlichen Signalsatz. Dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum waren 26 Protonen zu entnehmen (Abbildung 52) und dem <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum 21 Kohlenstoffatome (Abbildung 53). Ähnlich wie bei der Aufklärung der Monoepoxycollinolacton-Struktur (**66**) wurden alle Protonen des 6- und 7-Ring-Lactons

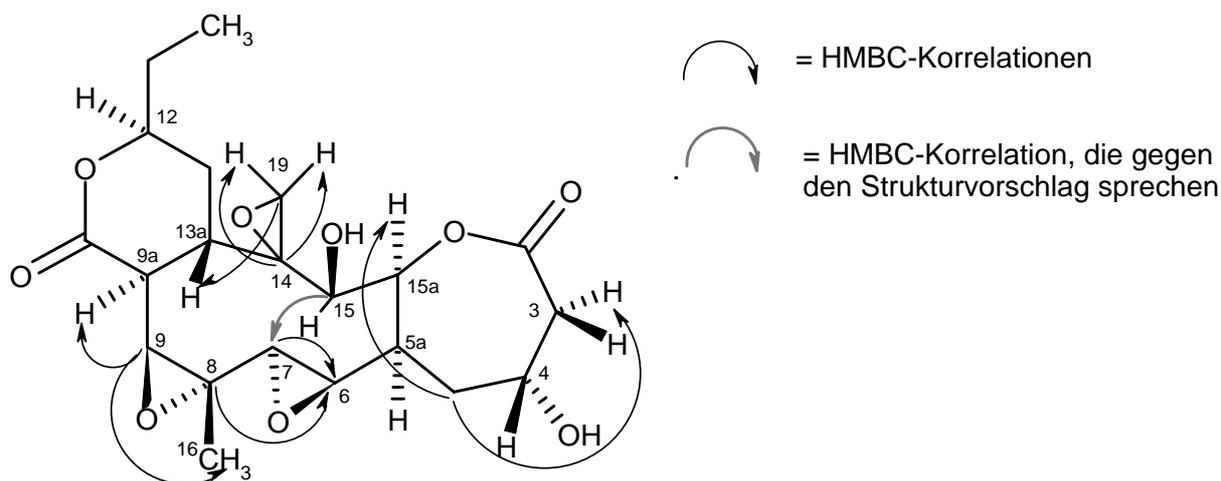
einschließlich der an C-12 gebundenen Ethylgruppe identifiziert, ebenso wie die an C-8 gebundene als Singulett erscheinende Methylgruppe. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Daten des Derivats **67** unterschieden sich stark vom Cyclodecatrien. Die Brückenkopfprotonen zu den Lactonringen konnten dennoch per COSY- und HMBC-Experiment zugeordnet werden und wichen kaum von den vorherigen Daten von **66** ab ( $\delta_{13a-H} = 2.28$  (**66**) versus 2.44 (**67**)). Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der drei Doppelbindungen (C-6/C-7, C-8/C-9 und C-14/C-15) waren ins Hochfeld verschoben zu  $\delta_C = 50.3 - 77.1$ . Im Vergleich dazu liegen die Doppelbindungen des Naturstoffs **7** bei einer chemischen Verschiebung von  $\delta_C = 124 - 139$ . Aufgrund der Protonenverschiebung von  $\delta_H = 1.76 - 3.32$  konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um das Strukturelement von Epoxiden handelte.



**Abbildung 53:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (150.8 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ) von 15-Hydroxy-triepoxi-collinolacton (**67**).

Zur Charakterisierung des Collinolacton-Derivats **67** wurden wie bei dem Monoepoxid **66** 2 D-NMR-Daten herangezogen. Über 2 D-NMR-Experimente konnte ermittelt werden, dass die Kohlenstoffe C-6/C-7 und C-8/C-9 über jeweils einen Sauerstoff als Epoxidstruktur verbrückt waren. C-15 erfuhr im Derivat **67** im Vergleich zum Collinolacton (**7**) eine Hochfeldverschiebung nach  $\delta_C = 77.1$ . Mit 15-H ( $\delta_H = 4.24$ ) konnte davon ausgegangen werden, dass C-15 eine Hydroxylgruppe trug. Dann galt zu klären, welche Funktionalitäten C-14 und C-19 trugen. C-14 erfuhr eine chemische Verschiebung von  $\delta_C = 60.3$  und C-19 eine von  $\delta_C = 40.6$ . C-19 trug zwei Protonen die als Singulets im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zu identifizieren waren, ähnlich der exocyclischen Doppelbindung von **66**. In der Verbindung **67** betragen die chemische Verschiebungen von 19- $\text{H}_{a/b}$  jedoch  $\delta_H = 2.58$  und 2.64. Da sowohl die Protonen als auch die Kohlenstoffatome im Vergleich zu **66** zum Hochfeld shifteten,

wurde diese Einheit als exocyclische Epoxidgruppe an C-14 und C-19 identifiziert. Abbildung 54 kann die postulierte Struktur des Triepoxids des Collinolactons (**67**) mit der relativen Stereochemie entnommen werden. Die relative Stereokonfiguration wurde den Spektren eines 2D-NOESY-NMR-Experiments entnommen.



**Abbildung 54:** Postulierte Struktur von 15-Hydroxy-triepoxicollinolacton (**67**) mit ausgewählten HMBC-Korrelationen.

Anhand des Reaktionsmechanismus, der dieser Umsetzung zugrunde liegt, kann man erklären, warum zwischen C-14 und C-19 ein Epoxid eingeführt werden konnte. Da die Reaktion mit 4 Moläquivalenten durchgeführt wurde, konnten zuerst die drei Epoxide an den drei Doppelbindungen entstehen. Durch die Instabilität des Epoxids an C-14/C-15 wird C-14/C-19 als exocyclische Doppelbindung in Analogie zum Monoepoxid **66** generiert. Im Reaktionsgemisch stand ein Überschuss an *m*-CPBA zur Verfügung, um auch die an C-14/C-19 gebildete Doppelbindung zu epoxidieren. Über die Reihenfolge der Epoxidierungen kann im Rahmen dieser Arbeit nur spekuliert werden. Die Umsetzung zum Monoepoxid **66** legt jedoch nahe, dass C-8/C-9 und C-14/C-19 wahrscheinlich als letzte der Doppelbindungen epoxidiert wurden.

Zur eindeutigen Beweisführung wurde ein HR-ESI-MS-Spektrum der Substanz aufgenommen. Das Massenspektrum ergab eine Summenformel mit der Zusammensetzung von  $C_{21}H_{28}O_8$  und somit der Masse von  $m/z = 408.45$ . Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zur Auswertung der NMR-Experimente. Dieser Widerspruch ist analog zum Monoepoxid **66**, denn auch hier erhielt man aus der massenspektrometrischen Untersuchung eine Summenformel mit der Differenz von 16 Masseneinheiten, also einem fehlenden Sauerstoffatom.

Nach der Auswertung der NMR-Daten sollten neun Sauerstoffatome im Molekül sein. Die Sauerstoffatome der Lactone und die Hydroxylgruppe an C-4 konnten sicher zugeordnet werden, da die NMR-Verschiebungen der chemischen Umgebung durch Vergleich von NMR-Daten mit Collinolacton (**7**) keine erhebliche Veränderung aufwiesen.

C-Atom	$\delta_C$ <b>66</b> (ppm)	$\delta_C$ <b>67</b> (ppm)	$\delta_H$ <b>66</b> (ppm)	$\delta_H$ <b>67</b> (ppm)
C-2	171.2	170.8	-	-
C-3	41.9	42.0	2.74 (dd, $J = 8, 13$ ) 2.94 (dd, $J = 8, 13$ )	2.73 (dd, $J = 6.5, 13.5$ ) 2.99 (dd, $J = 9.0, 13.5$ )
C-4	64.0	63.5	4.35 – 4.39 (m)	4.40 (m)
C-5	34.3	33.8	1.67 (m) 2.15 (m)	1.58 (m) 2.17 (ddd, $J = 3.0, 8.0, 8.0$ )
C-5a	43.0	44.3	2.38 (m)	2.17 (m)
C-6	52.9	54.5	2.39 (m)	1.76 (dd, $J = 11.5, 11.5$ )
C-7	54	50.3	2.39 (m)	2.48 (d, $J = 11.5$ )
C-8	138.8	58.4	-	-
C-9	127.8	61.1	6.22 (dd, $J = 3, 3.5$ )	3.32 (d, $J = 7.5$ )
C-9a	45.3	44.1	2.89 (dd, $J = 7, 8$ )	2.37 (m)
C-10	173.6	172.5	-	-
C-12	78.8	78.7	4.35 – 4.39 (m)	4.02 (m)
C-13	32.8	26.7	1.74 (m) 2.19 (ddd, $J = 2.5, 3.5, 15$ )	1.50 (m) 1.80 (m)
C-13a	41.7	36.6	2.28 (ddd, $J = 3, 8.5, 8.5$ )	2.44 (dd, $J = 10, 10$ )
C-14	153.2	60.3	-	-
C-15	78.9	77.1	3.98 (dd, $J = 10, 10$ )	4.24 (dd, $J = 2.5, 6.5$ )
C-15a	79.6	77.5	5.15 (dd, $J = 4, 8.5$ )	3.98 (dd, $J = 11.5, 11.5$ )
C-16	21.3	18.3	2.00 (s)	1.45 (s)
C-17	28.2	28.0	1.64 (m) 1.76 (m)	1.60 (m) 1.66 (m)
C-18	9.6	9.4	1.02 (dd, $J = 7.5, 7.5$ )	0.98 (dd, $J = 7.5, 7.5$ )
C-19	105.1	44.6	5.00 (s) 5.11 (s)	2.58 (s) 2.64 (s)

**Tabelle 10:** Vergleich  $^{13}\text{C}$ - und  $^1\text{H}$ -NMR-Daten ( $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ , 600 MHz) in ppm der mono- **66** und triepoxydierten **67** Syntheseprodukte. Starke Abweichungen der NMR-Daten zwischen den Daten der Derivate wurden grau unterlegt. Die angegebenen  $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplungskonstanten sind in Hz angegeben.

C-6/C-7 und C-8/C-9 zeigten im Collinolacton (**7**) Doppelbindungen, deren chemische Verschiebung bei  $\delta_C = 125 - 140$  lagen. Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Triepoxy-Verbindung **67** waren stark ins Hochfeld verschoben zu  $\delta_C = 50 - 61$ . Diese Werte konnten durch Vergleich

mit der Literatur<sup>[123]</sup> als Epoxid-Funktionalität angesehen werden. Wegen der Analogie zum Monoepoxid **66** wurde eine weitere Hydroxylfunktion, als an C-15 gebunden, zugeordnet. Ein Sauerstoffatom, das es zuzuordnen galt, verbrückt C-14 und C-19 zu einem exocyclischen Epoxid. Durch den Vergleich mit Literaturdaten z. B. Fumagillin<sup>[124]</sup> oder Mer-f3<sup>[125]</sup> kann dieser Strukturvorschlag als folgerichtig behandelt werden, jedoch gilt es das Paradoxon aus Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie zu klären.

Das HMBC-Experiment zeigte beim Derivat **67** eine nicht zu erklärende Korrelation. In Abbildung 54 ist sie als grauer Pfeil eingezeichnet. Die Korrelation des 15-H auf das Kohlenstoff C-7 ist anhand eines HMBC-Experiments nicht zu erklären. Diese Korrelation wurde in den HMBC-Spektren des Derivates **66** ebenso gefunden. Auch wenn eine erneute Analogie zwischen den beiden Derivaten festgestellt werden konnte, kann dieses Phänomen nicht geklärt werden. Aus Gründen der geringen Substanzausbeute von 0.5 mg konnte das Triepoxid des Collinolactons (**7**) bisher nicht in Kristallisationsversuche eingesetzt werden.

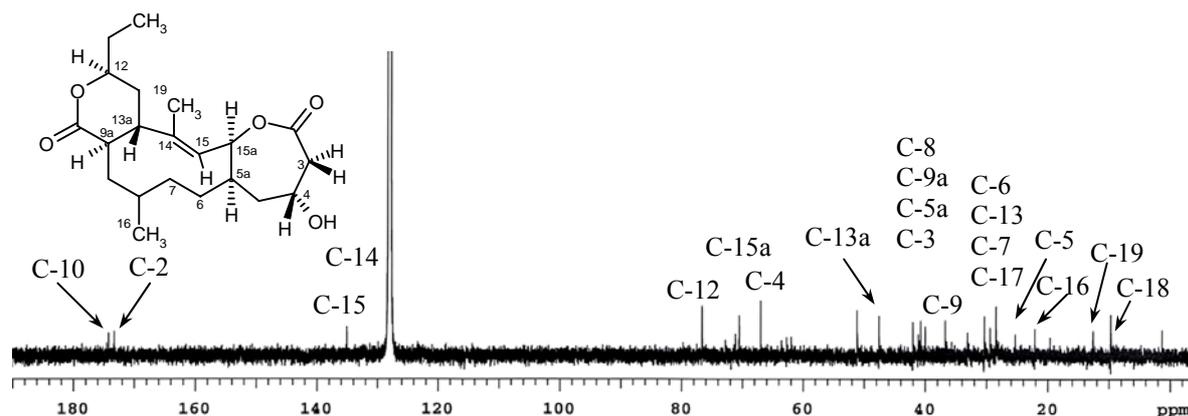
## 2.2. Reduktion mit Pd/C und H<sub>2</sub> zum (6,7,8,9)-Tetrahydrocollinolacton (**68**)

Die katalytische Hydrierung von C-C-Doppelbindungen ist die wichtigste Methode, um Wasserstoff an eine Doppelbindung zu addieren. Als Katalysatoren werden hauptsächlich Übergangsmetalle, wie z. B. Platin, Palladium<sup>[126]</sup> und Nickel<sup>[127]</sup> auf inerten Trägermaterialien eingesetzt. Eine Enantioselektivität dieser Systeme ist nicht gegeben. Da bei der Reaktion von Collinolacton (**7**) die Stereoselektivität, die etwa mit einem Wilkinson-Katalysator<sup>[128]</sup> erzielt werden kann, nicht von Interesse war, sondern ein möglichst hoher Umsatz erzielt werden sollte, wurde Pd/C (10%) als Katalysator gewählt.

Collinolacton (**7**) wurde, mit einem Massenäquivalent Pd/C (10%) versetzt, unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre über 17 h bei Raumtemperatur gerührt und die Reaktion mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Man beobachtete das Ausbleiben der UV-Löschung bei 254 nm des Collinolactons (**7**) und beendete die Reaktion. Nach Aufreinigung des Syntheseproduktes **68**, dass sich mit Molybdätophosphorsäure-Lösung (MOPS) blau anfärben ließ, konnte (6,7,8,9)-Tetrahydrocollinolacton (**68**) in 14% Ausbeute (1.2 mg) nach Aufreinigung erhalten werden.

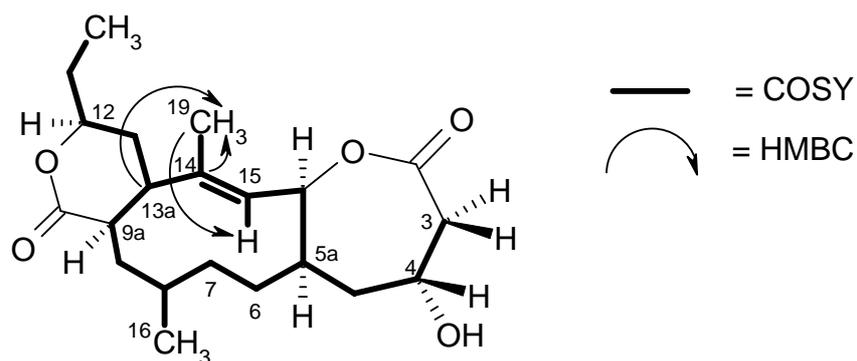
Dem DCI-MS-Spektrums konnte eine Masse mit  $m/z = 382.4$  als  $[M+NH_4]^+$ -Peak entnommen werden. Aus diesem Ergebnis ließ sich ableiten, dass die Summenformel des Syntheseproduktes C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub> war. Aufgrund schlechter Ionisierbarkeit des Tetrahydrocollinolactons (**68**) konnten keine Ergebnisse aus den Messungen der EI-MS-, ESI-MS und

HR-ESI-MS-Spektrometrie erhalten werden. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigte 21 Kohlenstoffatome (Abbildung 55), von denen zwei als Estercarbonylgruppen bei  $\delta_{\text{C}} = 173.3$  und  $174.2$  auszuwerten waren. Ferner waren zwei Kohlenstoffatome im olefinischen Bereich ( $\delta_{\text{C}} = 135.1, 128.3$ ) zu beobachten. Die Kohlenstoffatome C-4 waren bei  $\delta_{\text{C}} = 67.0$ , C-12 bei  $\delta_{\text{C}} = 76.6$ , und C-15a bei  $70.6$  mittels HMBC-Experiment eindeutig identifiziert. Zusätzlich konnten dem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum 14 Kohlenstoffatome im Bereich von  $\delta_{\text{C}} = 9.7 - 51$  entnommen werden.



**Abbildung 55:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des 6,7,8,9-Tetrahydrocollinolacton (**68**) in  $\text{C}_6\text{D}_6$  (150.8 MHz) gemessen.

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum zeigte 31 Protonen, von den drei Methyl-, sieben Methylen- und acht Methingruppen waren. Ebenso wie in den Syntheseprodukten der Epoxidierungen **66** und **67** konnten die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der zwei Lactonringe mit der C-12-Ethylgruppe durch Vergleich mit den NMR-Daten des Naturstoffs **7** zugeordnet werden. Durch die Umsetzung des Collinolactons (**7**) mit dem Hydrierungsagens wurde das Cyclodecatrien verändert. Da das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zwei Kohlenstoffatome im olefinischen Bereich zeigte, konnte davon ausgegangen werden, dass nur zwei Doppelbindungen hydriert wurden. Dies stand im Einklang mit dem Ergebnis aus der Massenspektrometrie. Es galt zu klären, welche der Doppelbindungen noch vorhanden war. Da das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum sieben Methylengruppen zeigte, war sichergestellt, dass eine der Doppelbindungen erhalten geblieben war, die eine Methylgruppe trug. Da die Methylgruppe C-19 mit der chemischen Verschiebung von  $\delta_{\text{H}} = 1.26$  und  $\delta_{\text{C}} = 12.6$  als Singulett in  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum erschien, konnte man darauf schließen, dass die C-14/C-15 Doppelbindung intakt war.



**Abbildung 56:** Struktur des (6,7,8,9)-Tetrahydrocollinolacton (**68**) mit  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  (fett) und  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (Pfeile) Konnektivitäten erhalten aus COSY- und HMBC-Experimenten (ausgewählte HMBC Korrelationen).

C-Atom	$\delta_{\text{C}}$ 7 in ppm	$\delta_{\text{C}}$ 68 in ppm	$\delta_{\text{H}}$ 7 in ppm	$\delta_{\text{H}}$ 68 in ppm
2	170.3	173.3	quartär	quartär
3	42.7	42.0	2.40, 2.90	2.07, 2.19
4	62.3	67.0	3.62	3.88
5	34.6	33.1	1.55, 1.91	1.44, 2.20
5a	43.1	41.8	2.65	1.56
6	126.5	25.1	5.00	0.97, 1.96
7	139.0	29.5	5.62	0.98, 1.09
8	135.0	40.0	quartär	1.61
9	124.4	36.8	6.18	1.20
9a	40.3	40.8	2.78	1.92
10	172.4	174.2	quartär	quartär
12	77.0	76.6	3.78	3.70
13	32.4	28.5	1.22, 1.32	1.25, 1.49
13a	46.3	47.6	2.20	2.03
14	133.1	128.3	quartär	quartär
15	134.0	135.1	4.80	5.42
15a	81.7	70.6	5.30	4.56
16	19.0	22.2	1.88	0.93
17	28.2	30.4	1.20, 1.43	1.34, 1.43
18	9.2	9.7	0.81	0.84
19	12.5	12.6	1.12	1.26

**Tabelle 11:**  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten (600 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) des Collinolactons (**7**) im Vergleich mit (6,7,8,9)-Tetrahydrocollinolactons (**68**). Starke Abweichungen zwischen den Derivaten sind grau unterlegt.

Anhand der 2 D-NMR-Spektren ( $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY, HSQC, HMBC) konnte die Struktur bestätigt werden. Die Konnektivitäten zwischen den protonenträgenden Gruppen wurde durch die

Auswertung des  $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-Spektrums erfasst. Die Auswertung des HMBC-Spektrums ergab, dass die Protonen von 19- $\text{CH}_3$  auf C-15 der Methingruppe koppelten und das Proton 13a-H auf C-19 der Methylgruppe. Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

### 3. Kristallisation der Derivate

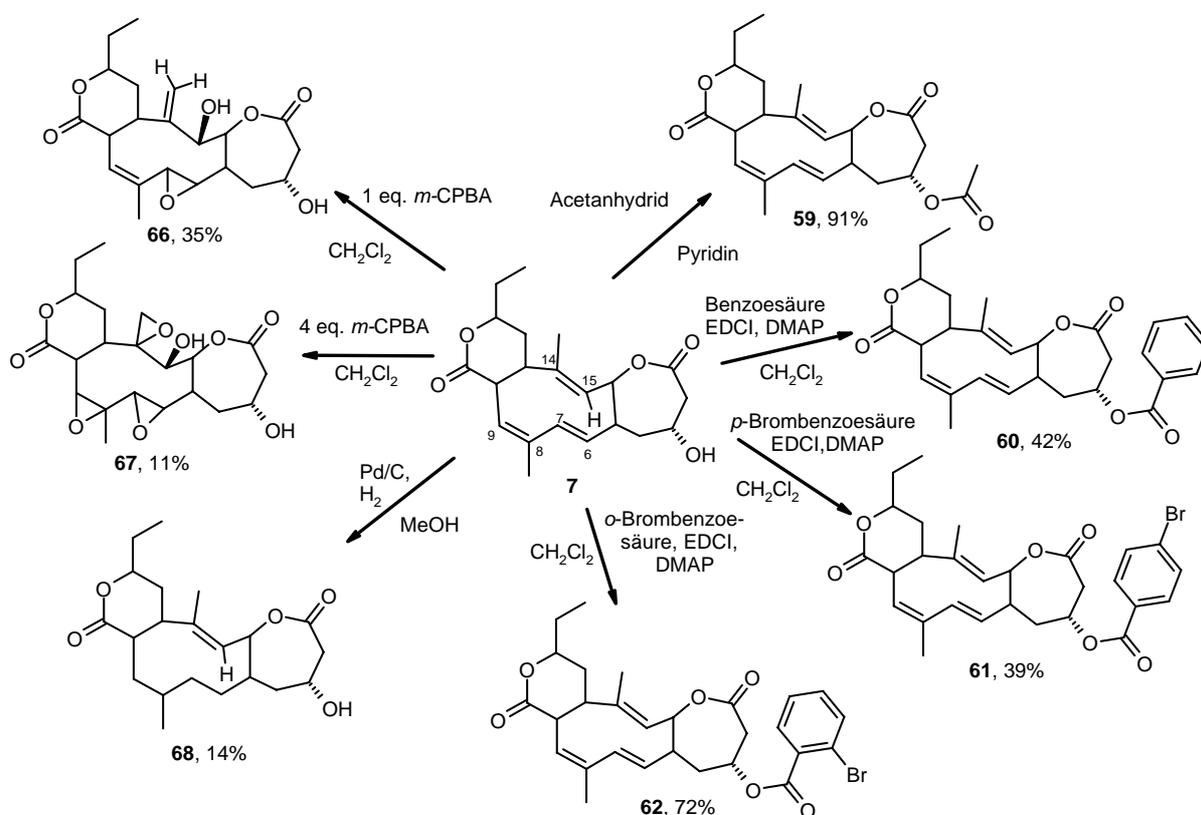
Zur Absicherung der neuartigen, tricyclischen Collinolacton-Struktur sowie der absoluten Stereochemie wurden verschiedene Versuche zur Kristallisation des Collinolactons (**7**) unternommen. Jedoch konnten aus unterschiedlichen Lösungsmitteln (MeOH, Aceton,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) bzw. Lösungsmittelgemischen (Aceton/Wasser, Aceton/Pentan) keine für die Röntgenstrukturanalyse tauglichen Kristalle erhalten werden. Auch der Versuch zur Verbesserung der Kristallisationseigenschaft des Collinolactons (**7**) durch Veresterung an 4-OH mit *ortho*- und *para*-Brombenzoesäure schlugen fehl. Grund mag das bei den veresterten Derivaten **61**, **62** vorliegende Rotamerengleichgewicht sein, das eine Kristallisation verhinderte. Hier wurden Kristallisationsexperimente nach der Abdampfmethode mit den oben genannten Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen bei unterschiedlichen Temperaturen (RT,  $4^\circ\text{C}$  und  $-20^\circ\text{C}$ ) durchgeführt.

Die am Cyclodecatrien modifizierten Derivate **66** – **68** zeigten in den NMR-Spektren erfreulicherweise nur noch einen einfachen Spektrensatz. Allein das Monoepoxy-Derivat **66** konnte in guten Ausbeuten dargestellt werden, so dass 9.1 mg zur Kristallisation zur Verfügung standen. Aus einer Lösung mit einer Konzentration von 3 mg/mL in  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$  bei  $-20^\circ\text{C}$  (NMR-Röhrchen) konnten Kristalle erhalten werden. Die Röntgenstrukturanalyse der Kristalle wurde in der Arbeitsgruppe G. SHELDRIK durchgeführt und ist derzeit noch in Bearbeitung. Die erfolgreiche Durchführung einer Röntgenstruktur-Analyse ist besonders attraktiv, damit könnte nicht nur die Stereochemie der Struktur des Collinolactons (**7**), sondern auch das Paradoxon der Epoxidderivate (**66**, **67**) aus der Analyse der Masse- und NMR-Spektren geklärt werden.

### 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten sieben neue Collinolacton-Derivate **59**, **60**, **61**, **62**, **66**, **67** und **68** semisynthetisch in Ausbeuten von 0.5 – 45.3 mg dargestellt werden. Die Derivate sind in Abbildung 57 zusammengefasst. Diese Verbindungen sind nicht literaturbekannt, d. h. in

ihrer Struktur völlig neuartig Vier Derivate wurden über eine Veresterung an der Hydroxylgruppe von C-4 hergestellt. Es konnte ein acetyliertes **59**, ein benzyliertes **60** und zwei brombenzylierte (*ortho* **61** und *para* **62**) Collinolactonderivate dargestellt werden. Dabei wurden unterschiedliche Agenzien verwendet. Zum einen wurde mit Acetanhydrid in Pyridin gearbeitet, zum anderen konnten die freien Säuren, mit EDCI als Kupplungsagenz und DMAP als Katalysator umgesetzt werden. Als drittes Veresterungssystem wurde ein Säurechlorid mit DMAP als Katalysator gewählt. Die Ausbeuten dieser Reaktionen, die nicht optimiert wurden, zeigten, dass alle drei Möglichkeiten effektive Reaktionen mit guten Ausbeuten darstellen.



**Abbildung 57:** Im Rahmen dieser Arbeit dargestellte neue Collinolactonverbindungen **59** – **62**, **66** – **68**. Funktionalisierungen der Hydroxylgruppe von C-4 (rechts), Umsetzungen an den Doppelbindungen (links).

Die Auswertung der NMR-Spektren von **59** – **62** zeigte, dass alle an C-4 modifizierten Verbindungen **59** – **62** der Rotationsisomerie unterliegen. Die Einführung eines sperrigen Substituenten an C-4 führte nicht zur erhofften räumlichen Fixierung des Cyclodecatriens. Die Aufklärung der Strukturen aller vier Derivate **59** – **62** erfolgte sowohl für das jeweilige *anti*- und das jeweilige *syn*-Rotamer durch <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- und HSQC-NMR-Daten. HR-ESI-MS-Daten bestätigten die Summenformeln und Massen der neuen Verbindungen **59** – **62**.

Weiterhin konnten drei Derivate **66** – **68** synthetisiert werden, die nur ein Konformer in durchgeführten NMR-Experimenten zeigten. Die Modifizierung an den Doppelbindungen des Cyclodecatriens erbrachte drei nicht literaturbekannte Verbindungen. Es konnten zwei epoxidierte und ein hydriertes Derivat **68** generiert werden. Die Epoxydderivate **66** und **67** wurden durch Umsetzungen mit *m*-CPBA in unterschiedlichen Moläquivalenten (1 eq. und 4 eq.) dargestellt. Zu beachten war, dass durch die Umsetzung mit einem Moläquivalent *m*-CPBA nicht nur die einzelne Doppelbindung C-14/C-15 angegriffen wurde, sondern auch die als stabil geltende konjugierte Doppelbindung (C-6 bis C-9). Da bei dieser Reaktion zwei Doppelbindungen vom Epoxidierungsreagenz angegriffen wurden, konnte die Ausbeute 50% nicht überschreiten. Insofern ist die Reaktionsausbeute von 35% (9.1 mg) als sehr hoch anzusehen. Im Gegensatz dazu wurde das Triepoxid **67** mit 11% Ausbeute in einem nicht befriedigenden Maß dargestellt. Das könnte unter anderem an der Isolierungsmethode liegen, denn die Epoxide wurden über Säulenchromatographie an Kieselgel, einem sehr sauren Chromatographiematerial, aufgereinigt. So könnten die Epoxydfunktionen zerstört worden sein. In Zukunft sollte auf RP-Material zurückgegriffen werden. Die Widersprüche der Ergebnisse aus der Massenspektrometrie und der NMR-Spektroskopie bei der Strukturaufklärung von **66** und **67** sind bisher nicht ausreichend geklärt. Interessanterweise trat das Phänomen „des fehlenden Sauerstoffs“ bei beiden Epoxidderivaten auf, so dass von einem ähnlichen Prinzip bei **66** und **67** gesprochen werden kann. Anhand einer Hypothese über den Reaktionsmechanismus der Epoxidierung von **66** und **67** konnte ein Einblick über die Stabilität und Reaktivität der Doppelbindungen des Cyclodecatriens gegeben werden.

Ein weiteres Derivat, das synthetisiert wurde war das Tetrahydrocollinolacton (**68**). Es wurde durch Reduktion mit Pd/C, H<sub>2</sub> mit 14% Ausbeute dargestellt. Um zukünftig eine höhere Ausbeute zu erzielen, ist darüber nachzudenken, ob eine schonende Aufreinigung über RP-Material geeigneter wäre. Aufgrund der hohen Anzahl von neu eingeführten Methylengruppen, war die Auswertung des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums eine Herausforderung. Da das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum nur einen einfachen Signalsatz von 21 Kohlenstoffatomen zeigte, konnte bewiesen werden, dass eine einheitliche Verbindung und kein Konformerengemisch vorlag.

Interessanterweise konnten die Reaktionszentren von *m*-CPBA und Palladium/Kohle im Collinolacton (**7**) nicht miteinander verglichen werden. Während die Persäure zuerst die isolierte Doppelbindung angreift, hydriert Pd/C, H<sub>2</sub> in einem höheren Maße zuerst die konjugierte und somit die sterisch ungehinderte Doppelbindung.

Mit diesen sieben Derivaten des Collinolactons **59 – 62**, **66 – 68** konnte gezeigt werden, dass die Derivatisierung der Hydroxylgruppe an C-4 zu keiner Aufhebung der Rotamere führt, hingegen die drei Derivatisierungen an den Doppelbindungen des Cyclodecatriens ein einheitliches Konformer zur Folge hatten.



## V Biologische Untersuchungen zum Collinolacton

### 1. Molekularbiologische Arbeiten zum Stamm Gö 40/10

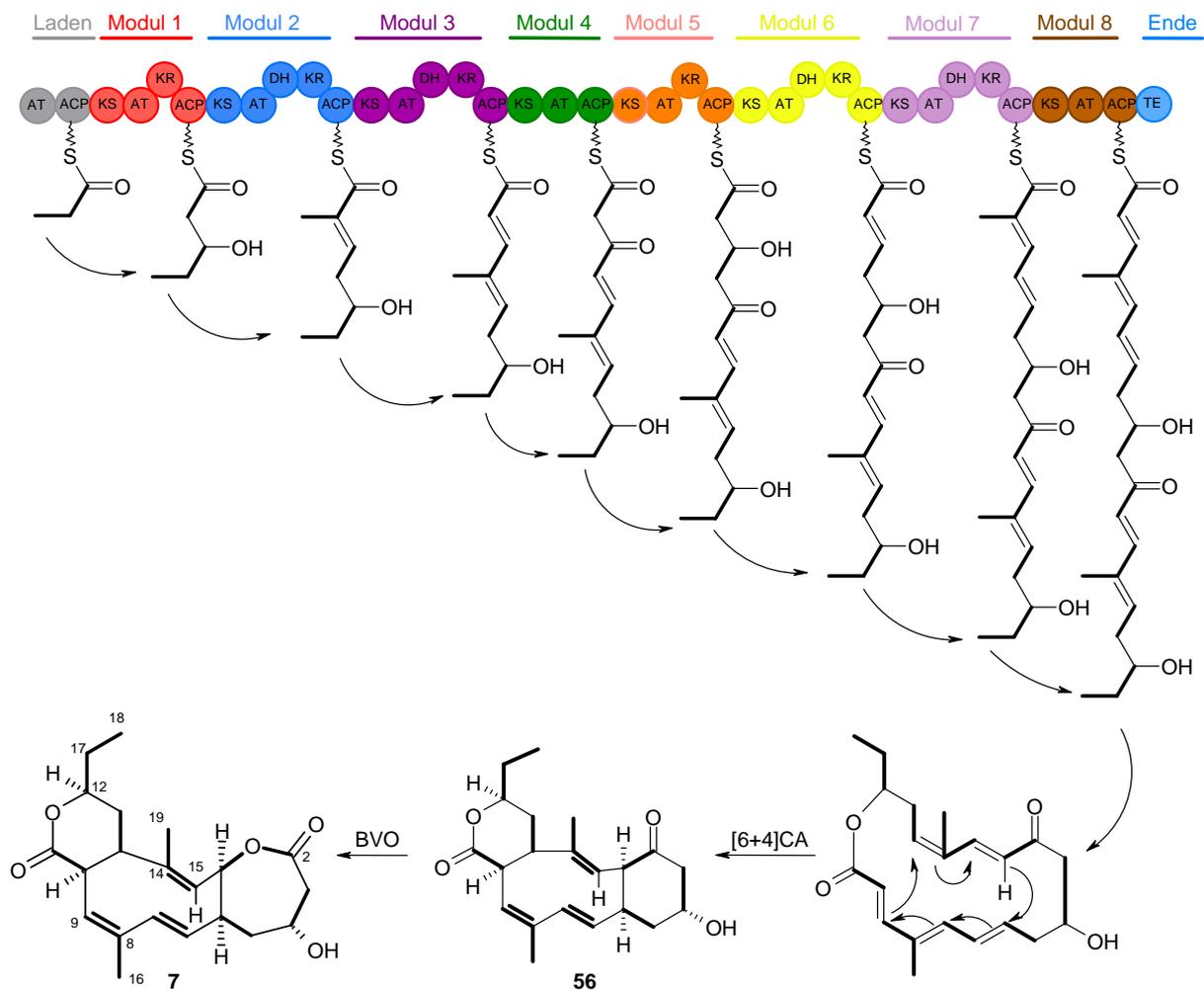
Die molekularbiologischen Arbeiten, insbesondere das Primerdesign, die PCR, DNA-Isolierung und Sequenzierung wurden in enger Kooperation mit dem Arbeitskreis Priv. Doz. Dr. R. DANIEL und seiner Mitarbeiterin CAROLA SIMON an der Universität Göttingen durchgeführt.

#### 1.1. Hypothese zum Biosynthesegencluster des Collinolactons

Wie in Kapitel III beschrieben, konnte eine Hypothese zum Aufbau des Kohlenstoffgrundgerüsts des Collinolactons (7) und der Herkunft des Sauerstoffatoms an Position 1 durch Fütterungsexperimente formuliert werden. Es kann auf die Beteiligung von Enzymen eines PKS I-Genclusters geschlossen werden. Im Folgenden wird die postulierte Biosynthese diskutiert, die sich unter Annahme einer beteiligten Polyketidsynthase I zum Aufbau eines Nonaketids und weitere Tailoring-Enzyme zur Funktionalisierung des Collinolactons (7) ergibt.

Die PKS I zur Collinolacton-Biosynthese sollte wie folgt organisiert sein: Das Lade-Modul, welches die Kettenstartereinheit, als Coenzym-A-Thioester an ACP bindet, ist aus zwei Domänen aufgebaut, der Acyltransferase (AT) und dem Acyl-Carrier-Protein (ACP). Die Kettenverlängerung findet unter Aktivierung von Malonsäure zu Malonyl-CoA und Bindung an die AT mit nachfolgender Übertragung durch die Ketosynthase (KS) statt. Anschließend findet die Funktionalisierung der Startereinheit durch die Ketoreduktase (KR) zur Hydroxylgruppe statt. Eine weitere Kettenverlängerung mittels AT und KS um eine Propionateinheit wird von den enzymatischen Aktivitäten des Moduls 2 vermittelt, durch die die Funktionalisierung der Propionateinheit zu einer Doppelbindung von einer Ketoreduktase (KR) und einer Dehydratase (DH) katalysiert wird. Die Kettenverlängerungen und Funktionalisierungen werden gemäß Abbildung 58 bis zum Nonaketid weiter fortgeführt. Das End-Modul des Multienzymkomplexes sollte eine Domäne enthalten, die eine Thioesterase (TE) trägt, die den  $\beta$ -Keto-Thioester von dem Protein ablöst und den Ringschluss zum Lacton einleitet. Abschließend wird das Molekül durch post-PKS-Enzyme modifiziert. Es können konkrete Vermutungen angestellt werden, welche Art von Reaktionen hier ablaufen müssen.

Es stellen sich dabei folgende Fragen: Ist am Aufbau des Collinolactons (**7**) eine Diels-Alderase beteiligt? Die Existenz von Diels-Alderasen ist ein äußerst kontrovers diskutiertes Thema in der Literatur.<sup>[129,130,131]</sup> Wird die [6+4]Cycloaddition, die zum Ringschluss des Collinolactons (**7**) führt durch ein Enzym katalysiert oder sind allein thermodynamische/kinetische Effekte, z. B. Faltung des Nonaketids im PKS-Enzymkomplex dafür verantwortlich? Wie könnte eine Baeyer-Villiger-Monooxygenase aussehen, die die Vorstufe Collinoketon (**56**) zum Collinolacton (**7**) oxidiert?



**Abbildung 58:** Biosynthese-Hypothese des Collinolactons (**7**) durch eine PKS I mit späten Biosyntheseschritten: Lactonisierung, [6+4]Cycloaddition ([6+4]CA), Baeyer-Villiger-Oxidation (BVO).

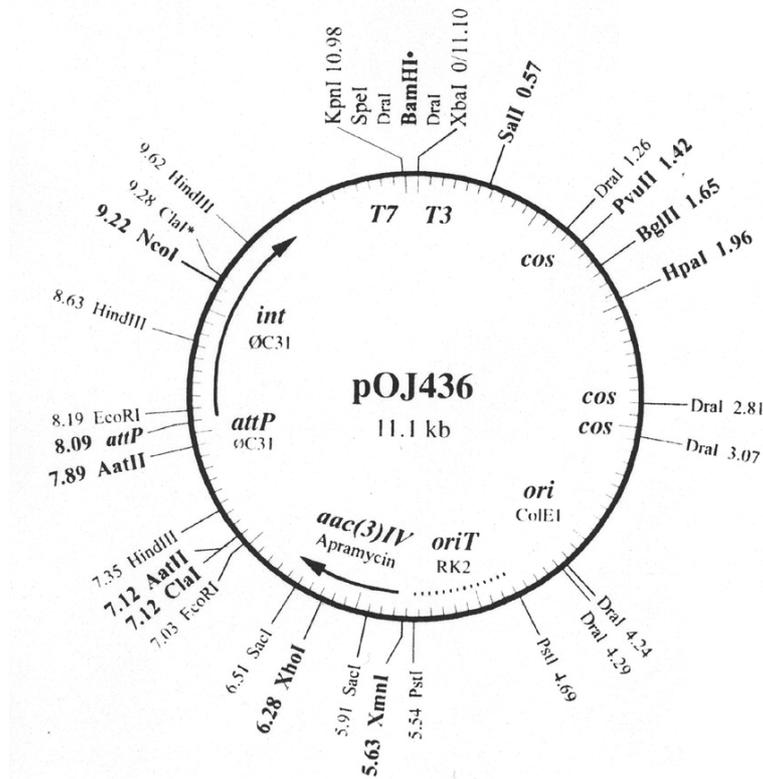
Um die verbleibenden Fragen zur Biogenese des Collinolactons (**7**) beantworten zu können, ist es notwendig, den Biosynthesegencluster zu identifizieren, zu sequenzieren und biochemisch zu charakterisieren.

## 1.2. Kartierung von Cosmiden des Stammes Gö 40/10

Um den hypothetischen Aufbau des Biosynthesegenclusters zu überprüfen, wurden erste molekulargenetische Arbeiten durchgeführt. Grundlage dieses Ansatzes ist die Tatsache, dass Gene durch Sonden-Screening, die aus bekannten analogen Genen anderer Organismen hergestellt worden sind, lokalisiert werden können. Durch die anschließende Annotation ist es auch in vielen Fällen möglich auf ihre Funktion zu schließen.

Die erste Aufgabe besteht darin, den Gencluster der Collinolactonbiosynthese in der genomischen DNA ausfindig zu machen. Dazu wurde der Stamm *Streptomyces* sp. Gö 40/10 im Rahmen dieser Arbeit zunächst durch Verdünnungsausstriche vereinzelt und überimpft. Anschließend folgte eine Kultivierung der vereinzelt Kolonien unter Standardbedingungen (B. XI3.1), um die erfolgreiche Produktion des Collinolactons (**7**) zu überprüfen. Dies war notwendig, um sicherzustellen, dass im nächsten, kostenintensiven Schritt, nämlich der Herstellung und Charakterisierung einer Cosmidbank der betreffende Klon den Collinolacton-Biosynthesegencluster enthält.

Aus einer Kolonie des Stammes Gö 40/10 wurde von der Firma *Combinature* unter Verwendung des integrativen Vektors pOJ436 (Abbildung 59) eine Cosmidbank angelegt. Zur DNA-Extraktion wurde Mycel des Stammes Gö 40/10 in Agarose eingebettet, die DNA partiell mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* gespalten und isoliert. Hierbei entstanden DNA-Fragmente einer durchschnittlichen Größe von mehr als 35 kb, die in den Cosmidvektor pOJ436 ligiert wurden. Dieser war 11.1 kbp groß und besaß außer einer  $\Phi C31$  Integration-Site und der für die Erkennung wichtige *attP*-Site eine *BamHI*-Schnittstelle. Daneben waren im Cosmid ein Apramycin-Resistenzgen (*aac3IV*) zur Selektion und eine *ori*- sowie eine *oriT*-Region („origin of replication“) zur Replikation vorhanden. Die bis zu 35 kbp Streptomyceten-DNA enthaltenden Cosmide wurden durch Elektroporation in kompetente *E. coli* Zellen (DH5 $\alpha$ ) eingeführt und kultiviert.



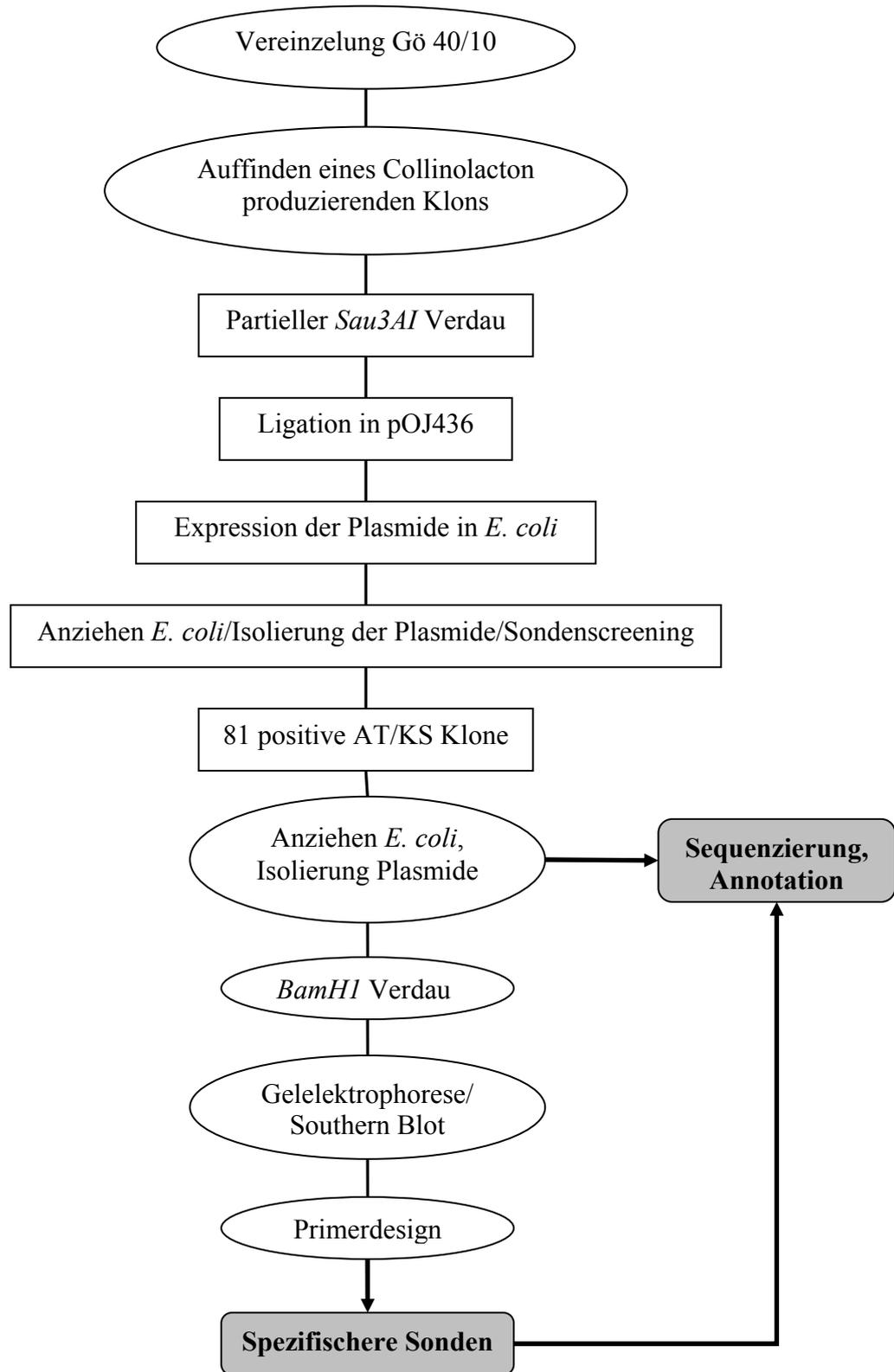
**Abbildung 59:** Integrativer Cosmid-Vektor pOJ436.

Das Ziel, das verfolgt wurde ist die Identifizierung, Sequenzierung und Annotation des Biosynthesegenclusters des Collinolactons (7). Bei der Betrachtung der Struktur von Collinolacton (7) fiel auf, dass das Grundgerüst keine spezifischen Funktionalitäten, wie halogenierte Substituenten, Zucker, oder ähnliches trägt, für die ausgearbeitete Sonden zu erhalten waren. Es war anzunehmen, dass das Collinolacton (7) auf dem Weg der Polyketide aufgebaut wird (vgl. Kapitel A III). Und wie in Kapitel II beschrieben, war bekannt dass der Stamm Gö 40/10 die Ansamycine bildet, die durch AHBA als Startereinheit gebildet werden. Vor diesem Hintergrund wurden die Arbeiten zur Erstellung einer Cosmidbank bei *Combinature* durchgeführt. Nach Isolierung der Cosmid-DNA wurde mittels der Sonden PKSI-2214 auf PKS-I Genanaloga und DEG-AHF2 auf Geldanamycin-AHBA Genanaloga geprüft. Die insgesamt 81 *E. coli* Kulturen, die die betreffenden PKSI-2214 positiven und die DEG-AHF2 negativen Cosmide enthalten, wurden daraufhin von *Combinature* weitergeleitet. Die 81 *E. coli* Kulturen, die im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet wurden, sind also reine PKS-I positive Kulturen, die keine DNA-Fragmente enthalten, um AHBA zu produzieren (AHBA-negativ). Der Stamm Gö 40/10 kann aber noch weitere PKS-I Produkte, wie die

---

Cineromycine oder Butyrolactone bilden. Somit musste eine Strategie erarbeitet werden, wie diese 81 *E. coli* Kulturen selektiert werden konnten. Die Idee, die im Folgenden verfolgt wurde, ist die Erarbeitung einer vollständig neuen, nicht literaturbekannten und spezifischen Sonde zur Erkennung der Baeyer-Villiger-Monooxygenase. Um eine Sonde zu entwickeln, müssen als erstes spezifische BVMO-Primerpaare entwickelt werden, die in PCR-Experimente (Polyketidkettenreaktionen) benutzt werden. In den PCR-Reaktionen werden BVMO-konservierte Regionen amplifiziert, die in weiteren Experimenten als BVMO-Sonde dienen. Um mit dieser neuentwickelten Sonde an den Biosynthesegencluster des Collinolactons (**7**) zu gelangen, muss die BVMO-Sonde radioaktiv oder fluoreszierend markiert werden und dann die 81 positiven Klone anhand des Southern Blots (B. XIII1.6) selektiert werden. Dazu wurden die 81 *E. coli* Kulturen kartiert und anschließend durch einen Southern Blot an eine Nylonmembran fixiert werden.

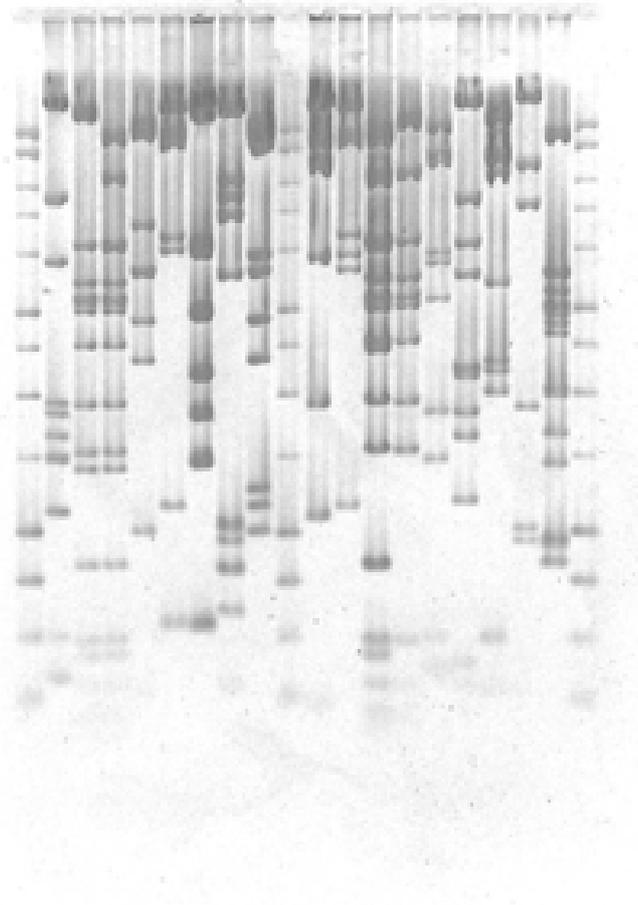
Die *E. coli* Kulturen wurden per Verdünnungsausstrich vereinzelt und Kultivierungen von den einzelnen Cosmid-Klonen durchgeführt. Nach alkalischer Lyse der Zellen wurde die Cosmid-DNA durch eine Mini-Präparation (B. XIII1.6) isoliert. Anschließend wurde die erhaltene DNA mit *BamHI* vollständig verdaut, die Fragmente durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt (Abbildung 61). Es wurde von dem Agarosegel ein Southern Blot angefertigt, der in Zukunft direkt mit der spezifischen BVMO-Sonde hybridisiert werden kann. Die durchgeführten Arbeiten sind in Abbildung 60 zusammengefasst.



**Abbildung 60:** Flussdiagramm über die durchgeführten und geplanten molekularbiologischen Arbeiten zum Stamm Gö 40/10. Arbeiten, die ellipsoid unterlegt sind, wurden in Göttingen durchgeführt. Rechteckig unterlegte wurden bei *Combinature* in Berlin ausgeführt. Anstehende Arbeiten sind grau unterlegt.

Die Auswertung der Agarosegele nach *Bam*HI-Verdau zeigte, dass offensichtlich alle Cosmide überlappende DNA-Fragmente zeigten. Daraus könnte gefolgert werden, dass in der vorliegenden Cosmidbank aus *Streptomyces* sp. Gö 40/10 die Gencluster in unmittelbarer Nachbarschaft auf dem DNA-Strang liegen oder zufälligerweise DNA-Fragmente von nur einem Polyketid kloniert wurden. Die Gesamtlänge der klonierten DNA wurde zu ~ 85 kbp bestimmt. Die Bandenmuster der Gelelektrophorese wurden auf Übereinstimmungen ausgewertet. Es wurden acht unterschiedliche Familien gefunden. Von jeder Familie wurde ein Cosmid ausgewählt, um die Zahl der Cosmide, mit denen gearbeitet wurde möglichst klein zu halten. Die acht Cosmide waren CB-2214-39, -41, -43, -53, -65, -68, -94 und -95.

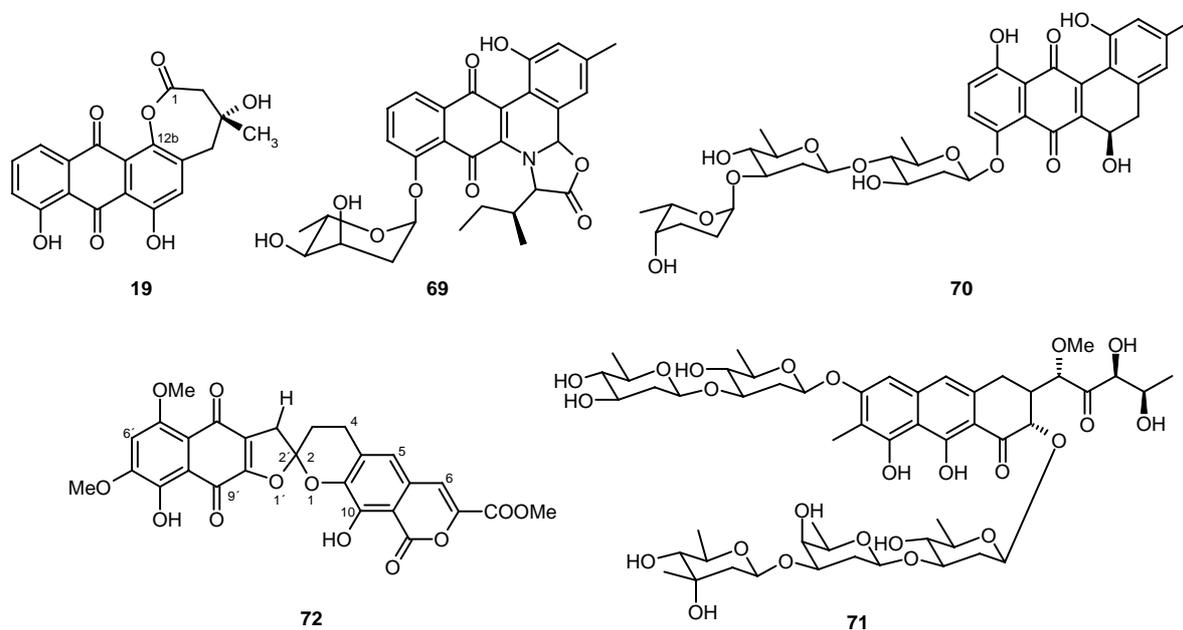
Leiter 37 39 41 43 L 46 50 52 54 Leiter  
38 40 42 44 45 49 51 53 55



**Abbildung 61:** 17 Proben der Cosmidbank (CB-2214-37 - 55) nach *Bam*HI-Verdau (1 h), Auftrennung per Gelelektrophorese und Anfärbung mit Ethidiumbromid bei 366 nm. Es wurden 3 µL einer DNA-Leiter (1 kb, *Promega*) aufgetragen (links, mitte, rechts).

### 1.3. Literaturbekannte BVMO-Reaktionen

Wie eingangs erwähnt, müssen zur Entwicklung von BVMO-Sonden zunächst spezifische BVMO-Primer designt werden, mit denen PCR-Experimente gemacht werden können. Dazu wurde die Literatur zu Baeyer-Villiger-Reaktionen, -enzymen und -genen geprüft und nur fünf Beispiele gefunden. Diese in der Literatur gefundenen Gensequenzen wurden auf Homologien untereinander geprüft, um die konservierten Regionen zur Konstruktion einer spezifischen BVMO-Sonde zu erhalten. Innerhalb der Sekundärmetabolite aus Streptomyceten sind die Angucycline eine große Familie, die Baeyer-Villiger-Monooxygenasen zum Aufbau ihrer Sekundärmetabolite verwenden. Angucycline wurden 1986 als neue Klasse von Antibiotika in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. ZEECK klassifiziert.<sup>[43]</sup> Die Vertreter dieser Klasse zeigen ein breites biologisches Wirkungsspektrum wie z. B. cytostatische, antivirale, antibakterielle und enzyminhibierende Wirkung. Die Angucyclin-Antibiotika besitzen ein tetracyclisches angulares Benzanthracengerüst. In der Literatur konnten drei Vertreter der Angucycline Urdamycin L (**19**), Jadomycin B (**69**), Landomycin E (**70**) gefunden werden, die die Aktivität von Baeyer-Villiger-Monooxygenasen zum Aufbau ihrer Sekundärstoffstruktur nutzen.



**Abbildung 62:** Fünf verschiedene literaturbekannte Vertreter **19**, **69** – **72**, die zum biosynthetischen Aufbau eine Baeyer-Villiger-Monooxygenase benötigen.

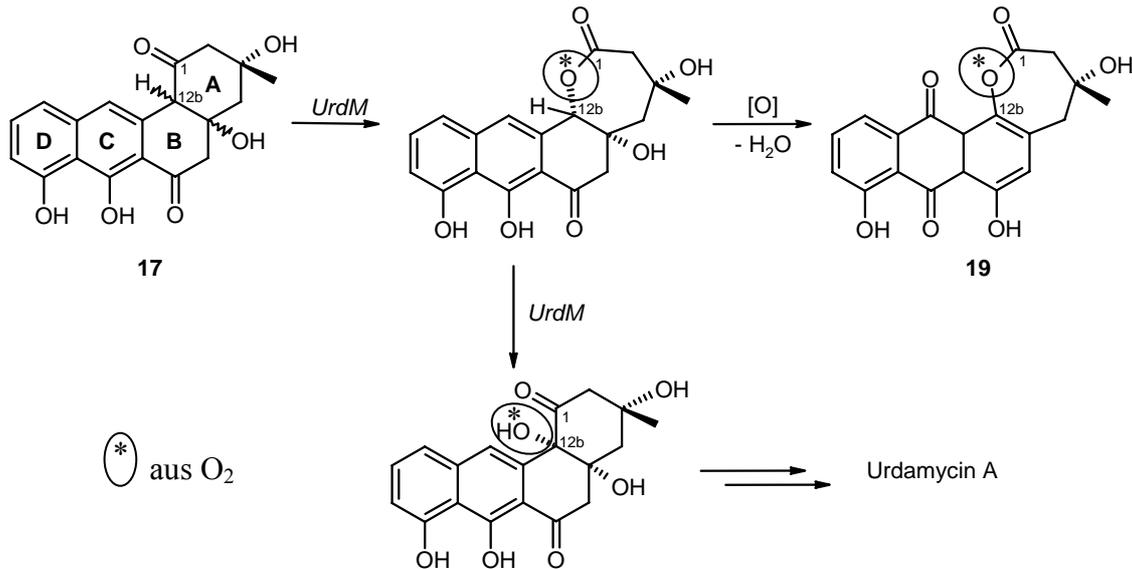
Es wurden zwei weitere Vertreter gefunden, das Mithramycin (**71**) zu den Aureolsäure-Antibiotika gehört und das  $\beta$ -Rubromycin (**72**) mit Hydroxynaphthoquinon-Chromophor

(Abbildung 62). Beim Aufbau dieser fünf Naturstoffe **19**, **69** - **72** wurden Gene postuliert, die eine Baeyer-Villiger-Monooxygenase codieren.

Die fünf Naturstoffe wurden im Detail zu ihrem Biosynthesemechanismus untersucht und die daran beteiligten Genen charakterisiert, um zu analysieren, welche Reaktionen von potenziellen BVMOs katalysiert werden, und um deren Gensequenz auf Homologien zu untersuchen. Das Vorhandensein von Sequenzhomologien ist eine notwendige Voraussetzung, für die Konstruktion einer spezifischen BMVO-Sonde und damit für die erfolgreiche Isolierung des Biosyntheseclusters des Collinolactons (7).

### *Urdamycin L*

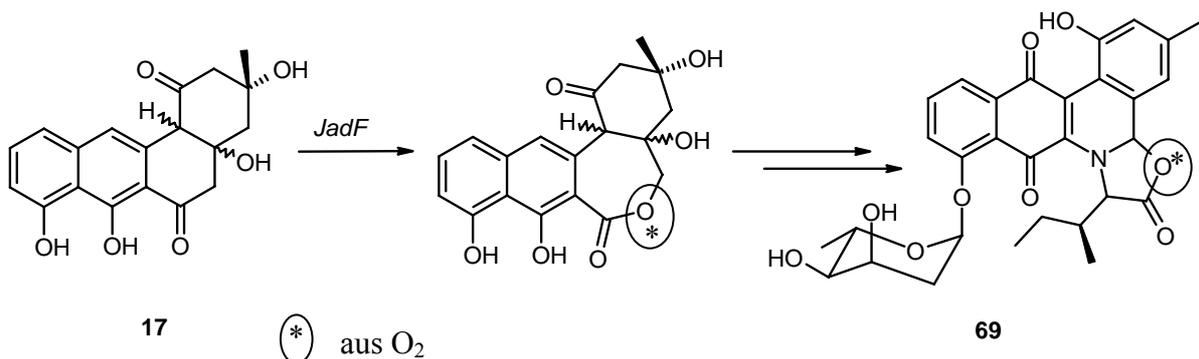
Urdamycin L (**19**) ist ein "shunt-Produkt" aus *Streptomyces fradiae* Tü 2717, welches auf dem Biosyntheseweg zum Urdamycin A aus UWM 6 (**17**) gebildet werden kann, wenn das Enzym *UrdM* eine Mutation aufweist. Anhand Abbildung 63 ist zu erkennen, dass *UrdM* sowohl die Baeyer-Villiger Oxidation zwischen C-12b und C-1 zum Siebenring-Lacton, als auch für die anschließende Umlagerung dieses Lactons zu einer Hydroxylgruppe an C-12b vermittelt. Untersuchungen zeigten, dass ein am C-terminalen Ende mutiertes *UrdM* nicht mehr in der Lage ist die Umlagerung durchzuführen.<sup>[132]</sup> So wird die Biosynthese an C-12b auf der Stufe des Lactons unterbrochen. Weitere Oxidationen am Ring C, für die nicht *UrdM* verantwortlich ist, führen zur Bildung des chinoiden Grundgerüsts von Urdamycin L (**19**). Da nicht mutiertes *UrdM* die Umlagerung zur Hydroxylgruppe durchführt und somit der Biosyntheseweg zur Produktion von Urdamycin A möglich ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Fähigkeit von *UrdM* eine Baeyer-Villiger Oxidation zum Lacton durchzuführen, in Richtung des N-terminalen Endes codiert ist.<sup>[132]</sup>



**Abbildung 63:** Mechanistische Überlegungen zur Urdamycin-Biosynthese: bei C-terminaler Mutation von *UrdM* zum Urdamycin L (**19**) und bei nicht mutiertem *UrdM* zum Urdamycin A.

#### *Jadomycin B*

UMW 6 (**17**) ist ähnlich wie bei den Urdamycinen in der Biosynthese des Jadomycins ein instabiles frühes Intermediat. So wird UMW 6 (**17**) durch *JadF* zu einem Siebenring-Lacton oxidiert, welches zum Jadomycin B (**69**) durch weitere Enzyme u. a. hydrolysiert, oxidiert und glykosyliert wird (Abbildung 64).<sup>[33]</sup> Jadomycin B wird vom Stamm *Streptomyces venezuelae* ISP 5230 produziert.

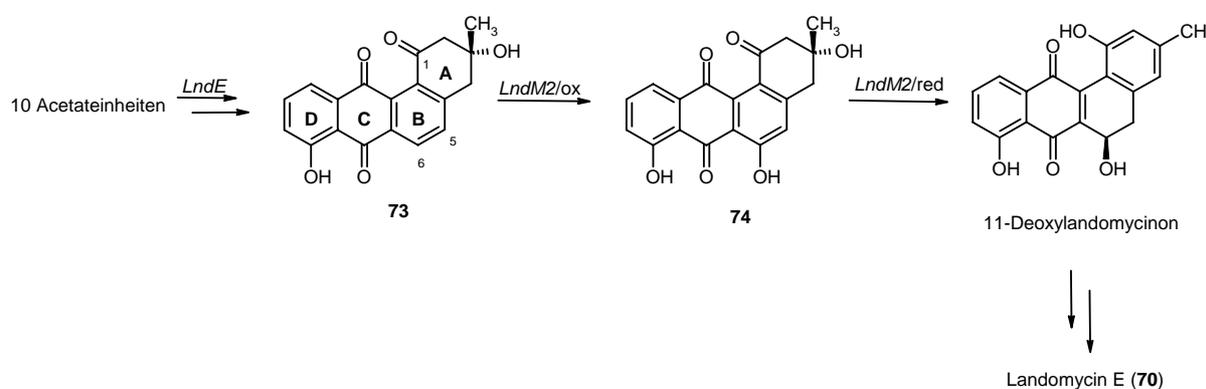


**Abbildung 64:** Umwandlung des UWM 6 (**17**) zum Jadomycin B (**69**) unter Beteiligung von *JadF*, einer Baeyer-Villiger Monooxygenase.

#### *Landomycin E*

Am Aufbau des Landomycins E (**70**) sind zwei Gene beteiligt, die nicht explizit als Baeyer-Villiger-Monooxygenasen in der Literatur geführt werden. Dennoch sind sowohl *LndE* als

*Streptomyces cyanogenus* S136 als auch *LndM2* aus *Streptomyces globisporus* 1912 als bifunktionale Oxygenase-Reduktase-Proteine bekannt und sollten nach der hier vorliegenden Analyse der post-Reaktionsmechanismen für eine Baeyer-Villiger-Oxidation verantwortlich sein.<sup>[133]</sup> Abbildung 65 zeigt einen Ausschnitt aus dem hypothetischen Biosyntheseweg zu Landomycin E (**70**) unter Beteiligung der zwei oben genannten Oxido-Reduktasen. Aus zehn Acetateinheiten wird durch eine PKS vom Typ II eine Polyketidkette aufgebaut, die durch *LndE* katalysiert, das Tetrangomycin (**73**) bildet. *LndM2* katalysiert die oxidative Einführung einer Hydroxylgruppe an C-6 im Ring B zum Rabelomycin (**74**). Ein zweiter Schritt, die Reduktion zum 11-Deoxylandomycinon, wird durch *LndM2* eingeleitet. Weitere Enzyme katalysieren die Biosynthese bis zum Landomycin E (**70**).

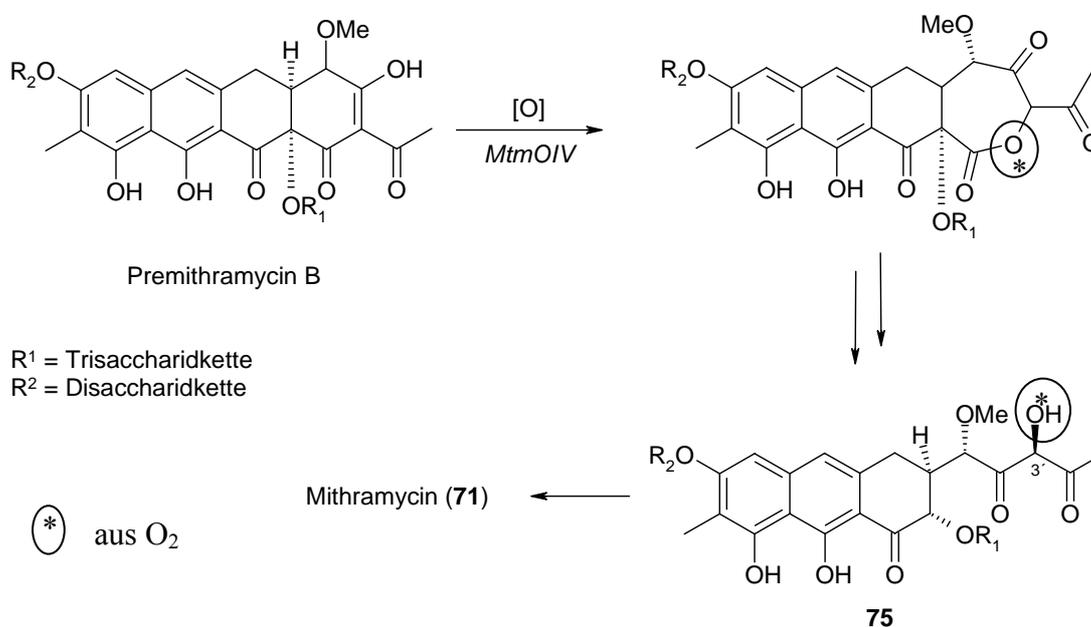


**Abbildung 65:** Hypothese von frühen Oxidations- und Reduktionsschritten während der Biosynthese des Landomycin E (**70**).

### Mithramycin

Der Mithramycin-Biosynthesegencluster wurde aus dem Produzentenstamm *Streptomyces argillaceus* isoliert und sequenziert. Das Gen *mtmOIV* ergab bei vergleichender Suche in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI)<sup>[135]</sup> eine hohe Ähnlichkeit mit den Oxygenase-Sequenzen des Jadomycin- und Urdamycin-Bildners und konnte so als Baeyer-Villiger-Oxygenase zugeordnet werden.<sup>[134]</sup> In dieser Datenbank sind alle Sequenzen von Genen oder Clustern mit Kommentaren zu Homologien gespeichert, die bislang veröffentlicht wurden. Somit konnte für Mithramycin (**71**) als Vertreter der Aureolsäure-Antibiotika ein Biosyntheseweg vorgeschlagen werden, der in Abbildung 66 zusammengefasst ist. Obwohl das durch *mtmOIV* oxidierte Zwischenprodukt bisher nicht isoliert werden konnte, wurde eine Fermentation unter  $^{18}\text{O}_2$ -angereicherter Sauerstoffatmosphäre durchgeführt, die zeigte, dass der Sauerstoff an Position C-3' der Mithramycinvorstufe **75** aus Luftsauerstoff hervorgeht. Daraufhin wurde ein Bindungsbruch

des Lactons zur Mithramycinvorstufe postuliert. Dies steht im Einklang mit dem Ergebnis einer Kultivierung des Collinolactons (**7**) in  $^{18}\text{O}_2$ -angereicherter Atmosphäre (A. III.2.4). Auch das Collinolacton (**7**) generiert ein Siebenring-Lacton aus Luftsauerstoff.

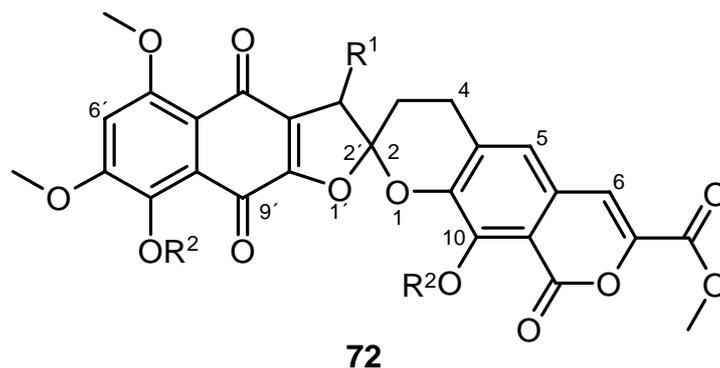


**Abbildung 66:** Vorgeschlagener Mechanismus für die Oxygenase-Reaktion von Premithramycin B zu einem Siebenring-Lacton.

### *β*-Rubromycin

In einer Datenbankrecherche zu *mtmOIV* wurde als verwandtes Gen *rubN* genannt.<sup>[135]</sup>

Der vollständige Biosynthesegencluster des Rubromycinbildners *Streptomyces collinus* DSM 2012 wurde von H. SAITO, P. BRUENTER, R. MARTIN und W. MINAS sequenziert (nicht publiziert).<sup>[135]</sup> Das Gen *rubN* zeigt in der Annotation eine hohe Verwandtschaft zu *mtmOIV* für eine Baeyer-Villiger-Monooxygenase, und weist u. a. eine FAD-bindende Domäne auf.<sup>[135]</sup> Die Rubromycine (**72**) sind antibakterielle und cytostatisch aktive mikrobielle Sekundärmetabolite, in denen ein Hydroxynaphthoquinon-Chromophor durch eine Spiroacetalverbrückung mit einer Isocoumarineinheit verbunden ist.<sup>[136]</sup> Eine Homologie zu *urdM* ist durch die Datenbankrecherche ebenso für das Gen *pgaM* aus dem Stamm *Streptomyces* sp. PGA64, gefunden worden.<sup>[137]</sup>



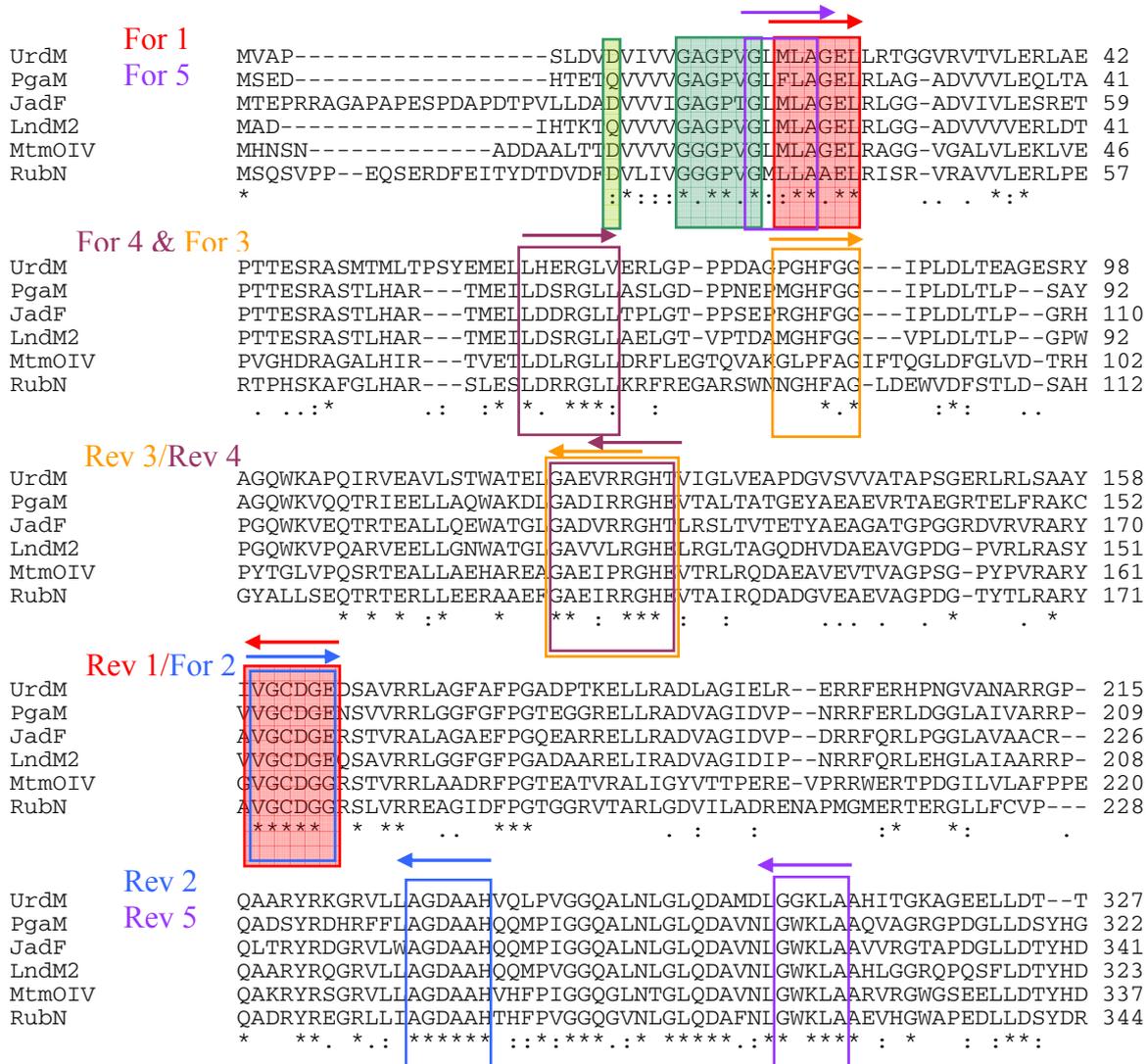
**Abbildung 67:** Grundgerüst der Rubromycine.

Die diskutierten Beispiele ergaben, dass die durch die Gene *urdM*, *jadF*, *mtmOIV* und *rubN* codierten Proteine BVMO-Aktivität haben könnten. BVMO-Aktivität konnte für die Proteine, die durch die Gene *IndE*, *IndM2* und *pgam* codiert sind vom Standpunkt der Biosynthesemechanismen nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Im Vergleich mit den diskutierten Beispielen erscheint die Beteiligung einer BVMO an der Biosynthese des Collinolactons (7), mit der post-PKS-Oxidation eines Sechsrings-Ketons zu einem Siebenring-Lacton unter Einbau von Luftsauerstoff sehr plausibel. Daher kann man erwarten, dass die Gensequenzen der Beispiele Homologien mit der BVMO des Biosynthesegenclusters (Abbildung 58) des Collinolactons (7) aufweisen sollten.

Um Primer für eine Baeyer-Villiger-Monooxygenase generieren zu können, werden die Aminosäure-Sequenzen der oben genannten BVMO-Gene auf ihre Sequenzähnlichkeit untereinander überprüft. Dazu sind Programme frei verfügbar, die das Alignment von Aminosäure-Sequenzen ermöglichen. Zu unserem Zwecke wurde das Programm ClustalW (1.82) des European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) genutzt.<sup>[138]</sup>

Das verwendete Programm ClustalW zeigt drei verschiedene Grade der Sequenzähnlichkeiten jeder einzelnen Aminosäure (AS) an. Mit einem Stern versehene AS stimmen zwischen den Sequenzen zu 100% überein. Die mit zwei Punkten übereinander gekennzeichnete AS stimmen > 50% überein. Alle AS, die mit einem Punkt gekennzeichnet sind, zeigen ca. 50%ige Übereinstimmung. Durch die anschauliche Auswertung des Programms wird es dem Anwender sehr einfach gemacht, Sequenzähnlichkeiten in den Aminosäure-Sequenzen zu erkennen. In diesem Enzym-Abschnitt fällt die große Übereinstimmung der Aminosäure-Sequenzen auf (Abbildung 68). Ferner konnte die in der Einleitung eingeführte und näher beschriebene Rossmann-Schleife (grün unterlegt) in dem Alignment wieder entdeckt werden.

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment



**Abbildung 68:** Alignment von sechs Aminosäure-Sequenzen mit ClustalW des EMBL-EBI.<sup>[138]</sup> Von markierten Aminosäure-Sequenzen (rot, blau, orange, bordeaux, lila) wurden Primer abgeleitet (For = forward, Rev = reverse). Grün gekennzeichnete Sequenzen sind literaturbekannte konservierte Regionen von Baeyer-Villiger-Monooxygenasen. Rot unterlegte Sequenzen gehören zu dem ausgewählten Primerpaar For 1 und Rev 1.

Neben dieser in der Literatur als konservierte Region für FAD-abhängige Oxygenasen beschriebene Region konnten sieben weitere Regionen (Umrahmungen) identifiziert werden, die innerhalb der Aminosäure-Sequenzen der sechs Gene *urdM*, *jadF*, *mtmOIV*, *rubN*, *lndM2* und *pgaM* konserviert vorliegen. Da für ein erfolgreiches Primerdesign die Sequenzähnlichkeit eine notwendige Voraussetzung ist, ermutigten die gefundenen Sequenzähnlichkeiten dazu, Primer zu designen und mittels PCR auf ihre Tauglichkeit hin zu prüfen.

#### 1.4. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich Gen-Sequenzen maschinell vervielfältigen, ohne einen lebenden Organismus, als Produktionswirt zu benutzen. Die PCR gehört inzwischen in biologischen und medizinischen Laboratorien zur Standardmethode zur Erkennung von Erbkrankheiten, für das Erstellen und Überprüfen genetischer Fingerabdrücke, für das Klonieren von Genen oder für die Verifikation einer Vaterschaft. In den frühen 1980er Jahren wurde die PCR vom Nobelpreisträger K. B. MULLIS gefunden. Seine Idee war die Entwicklung eines Verfahrens zur *in-vitro* Vervielfältigung von DNA mit Hilfe von DNA-Polymerase. Zur Durchführung einer PCR werden mehrere Komponenten benötigt.

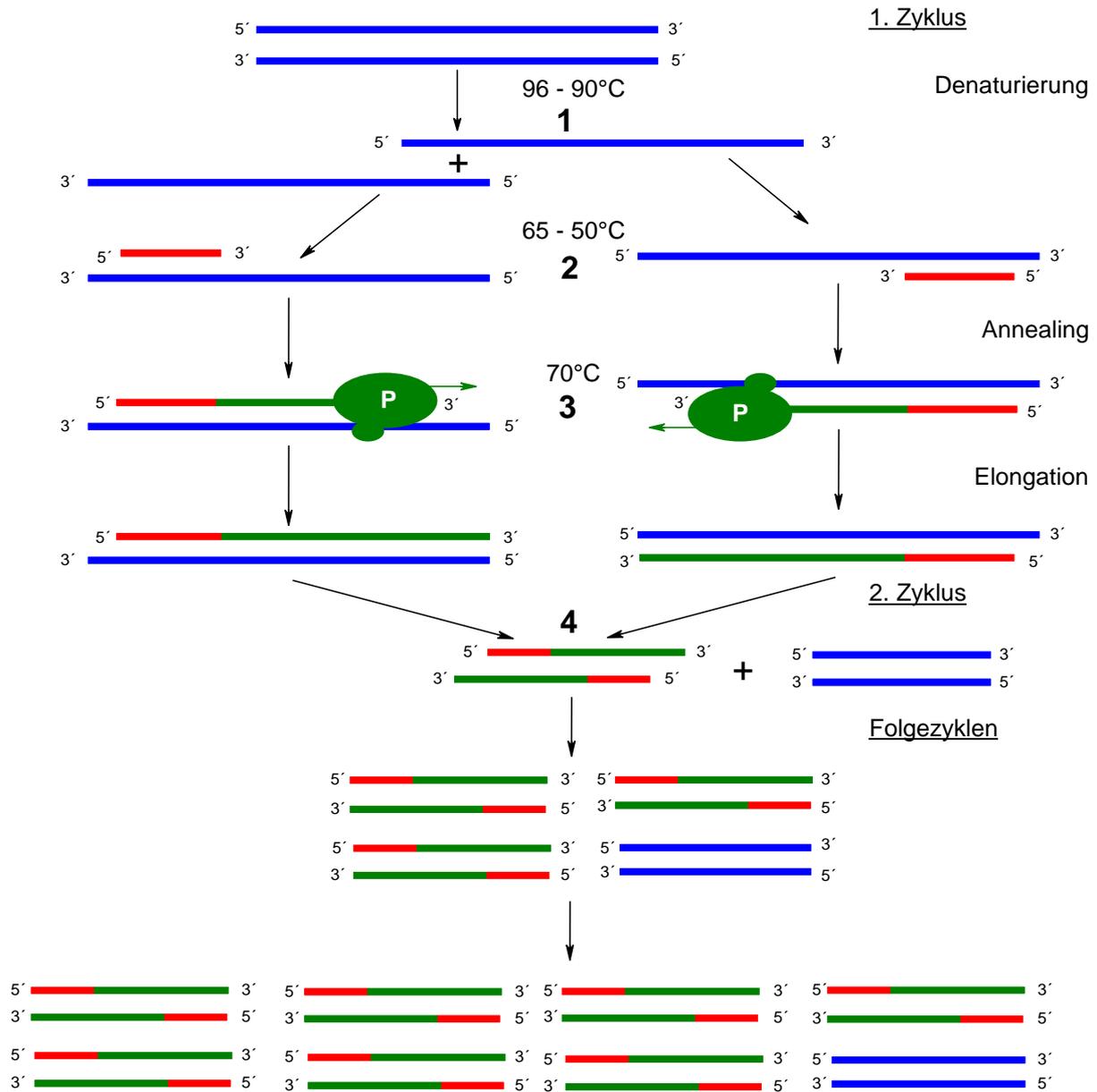
- Die zu vervielfältigende DNA (Matrize)
- Zwei Primer, zur Festlegung von Anfang und Ende des zu vervielfältigenden Abschnitts
- DNA-Polymerase, um den festgelegten Abschnitt zu amplifizieren
- Nukleotide (Triphosphate), die Bausteine für den von der DNA-Polymerase zu synthetisierenden DNA-Strang

Die PCR findet in einem sogenannten Thermocycler statt. Dieses Gerät erhitzt und kühlt die in ihr befindlichen Reaktionsgefäße für bestimmte Reaktionszeiten präzise auf die Temperatur, die für den jeweiligen Schritt benötigt wird. Der PCR-Prozess besteht aus einer Serie von 20 bis 40 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten (Abbildung 69).

1. Schritt: Zunächst wird die doppelsträngige DNA erhitzt auf 90°C, um die Stränge zu trennen. Dieser Schritt wird Denaturierung genannt. Die Wasserstoff-Brückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen. Im ersten Zyklus wird die DNA oft für längere Zeit erhitzt um sicherzustellen, dass sich die DNA-Matrize vollständig aufgetrennt hat.
2. Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur auf 50 – 65°C gesenkt, so dass die Primer sich an die einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Dieser Schritt heißt „Annealing“ (Anlagern). Die Temperatur während dieser Phase wird von dem Charakter der Primern definiert und liegt normalerweise 5°C unter deren Schmelztemperatur. Wird die Temperatur zu niedrig gewählt, führt das dazu, dass die Primer auch an der falschen Stelle der DNA-Matrize anlagern können und die PCR unspezifisch wird.
3. Schließlich verlängert die DNA-Polymerase (meist *Taq*, *Thermococcus aggregans*) die komplementären Stränge. Ihr Temperaturoptimum liegt bei ~ 70°C. Die DNA-

Polymerase beginnt am angelagerten Primer und folgt dann dem DNA-Strang. Dieser Schritt heißt „Elongation“ (Verlängerung). Beide Primer werden von der DNA-Polymerase in 5' → 3' der DNA verlängert. Die Zeit die dieser Schritt benötigt, hängt von der DNA-Polymerase und der Länge des DNA-Fragments, das vervielfältigt werden soll, ab. Die beiden entstandenen DNA-Stränge bilden zusätzlich zum Ausgangstemplat die Matrizen für den folgenden Durchlauf. Die Menge an DNA verdoppelt sich also mit jedem Zyklus. Der Ablauf einer korrekten PCR lässt sich über verschiedene Parameter einstellen. Dazu gehören die Temperaturen, die Zeiten, die Salzkonzentrationen und der pH-Wert.

Das zu vervielfältigende DNA-Fragment wird durch die Primer bestimmt. Primer sind kurze, künstlich erzeugte DNA-Stränge, die 18 – 30 Nukleotide lang sind und die komplementär zu dem Anfang bzw. dem Ende des zu vervielfältigenden DNA-Fragmentes sind. Sie lagern sich an den Start- und Endpunkten der Ausgangs-DNA an und dienen der DNA-Polymerase für die Synthese des neuen DNA-Strangs als Startpunkt. Die Schmelztemperatur des Primers hängt neben der Länge von einer Reihe von Faktoren ab. Die Schmelztemperatur eines Primers ist die Temperatur, bei der 50% des Primers am Templat binden. Die Schmelztemperatur steigt mit zunehmender Primer-Länge und hängt hauptsächlich vom G/C-Gehalt ab. Bei kurzen Primern kann die Schmelztemperatur nach der Formel  $T_m = 4x (\Delta bp \text{ G/C}) + 2x (\Delta bp \text{ A/T})$  abgeschätzt werden. Sollte ein Primer zu kurz sein, kann er sich an mehrere Stellen der DNA anlagern, wodurch der zu vervielfältigende Bereich nicht ausreichend definiert ist. Andererseits ist die Länge und dadurch die Spezifität des Primers durch die maximale Schmelztemperatur, die in der Nähe des Temperaturoptimums der Polymerase von 72°C liegen sollte, auf 60°C – 75°C begrenzt. Die optimale Länge der Primer liegt im Allgemeinen zwischen 18 und 30 Nukleotiden was 6 bis 10 codierten Aminosäuren entspricht.



**Abbildung 69:** Schematische Darstellung des PCR-Zyklus. 1. Schmelzen bei 96°C; 2. Anlagerung; 3. Verlängerung (P = Polymerase); 4. der erste Zyklus ist beendet. Es folgen weitere Zyklen.

Zwei spezielle Formen der PCR sollen an dieser Stelle kurz umrissen werden, da sie zur Anwendung kamen.

**1.4.1. Touchdown PCR**

Bei der Touchdown PCR wird die Annelingtemperatur der zu erwartenden Schmelztemperatur des Primers zyklusweise angenähert und über diese hinaus abgesenkt. Wenn die Annelingtemperatur über der zu erwartenden Schmelztemperatur des Primers

gewählt wird, binden die Primer ausschließlich und damit hochspezifisch an das gewünschte DNA-Fragment. So werden Primerdimere und Artefakte verringert, und es vermehrt sich vorzugsweise das gewünschte Amplikon.

#### 1.4.2. Nested PCR

Ein klassisches Problem ist, dass zwar theoretisch ein Templat-Molekül ausreicht, um dies beliebig zu vervielfältigen, dies in der Praxis jedoch nicht funktioniert. Nach etwa 40 Zyklen nimmt die Menge an Fehlhybridisierungen immer stärker zu, so dass man bei höheren Zyklenzahlen vor dem Problem des „Schmiers“ an Produkten steht. Ein Trick, um auch geringste Templatmengen nachzuweisen ist die nested („verschachtelte“) PCR. Man führt eine PCR durch und verwendet das Produkt als Templat für eine zweite Amplifikation mit anderen Primern. Das zweite Primerpaar liegt dabei innerhalb des zu untersuchenden Genabschnitts. Auf diese Weise werden die falschen Amplifikationsprodukte des ersten PCR-Durchgangs rausselektiert, man kann sehr geringe Templatmengen nachweisen und die PCR sehr spezifisch und empfindlich gestalten.

### 1.5. PCR mit abgeleiteten Primern

#### 1.5.1. BVMO-Primerdesign

Mit Hilfe des Alignments wurden aus den Aminosäure-Sequenzen Primerpaare für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) abgeleitet. Die jeweiligen Primer sollten mindestens sechs Aminosäuren lang sein und ein DNA-Stück der Länge  $\ll 2000$  bp amplifizieren. Die Primersequenz soll der konservierten Region der BVMO entsprechen. Die Primerlänge und die zu amplifizierenden Stücke der DNA-Sequenz wurden so gewählt, dass die Fehlerrate der PCR möglichst gering gehalten werden konnte. Es wurden fünf Primerpaare von den in Abbildung 68 bunt (rot, blau, orange, bordeaux, lila) gekennzeichneten Aminosäuresequenzen abgeleitet. „For“ (forward) bedeutet in diesem Falle, dass es sich um den Primer handelt, der an 3'-Ende der DNA bindet und „Rev“ (reverse) ist der Primer, der sich an das 5'-Ende des zu amplifizierenden DNA-Stücks anlagert. Beide Primer werden nun von der *Taq* in 5'  $\rightarrow$  3' der DNA verlängert (Abbildung 69).

Auch wenn in der Literatur die sogenannte Rossmann-Schleife mit dem Motiv GxGxxG, als konservierte Region für Oxygenasen beschrieben wurde,<sup>[31]</sup> so ist doch die Rossmann-Schleife eine für Baeyer-Villiger-Monooxygenasen relativ unspezifische Bindungsstelle, da

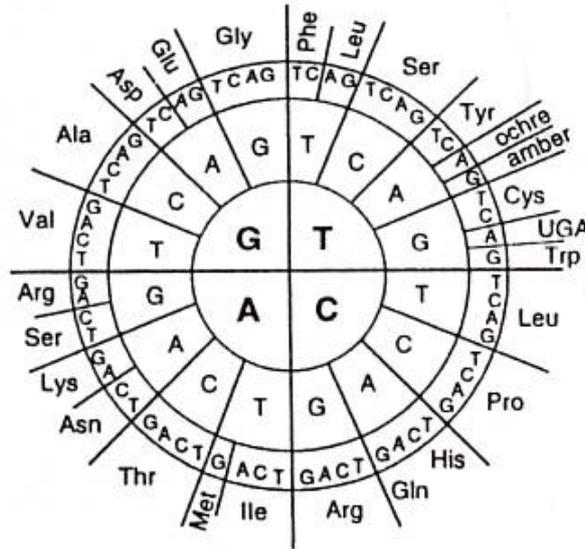
diese Domäne generell für viele FAD-abhängige Enzyme codiert. In dem Alignment (Abbildung 68) ist die Rossmann-Schleife grün unterlegt eingezeichnet und stellt den Adenosin-bindenden Teil des FAD (**10**) dar.<sup>[31]</sup> Würde man einen Primer allein auf Basis einer Rossmann-Schleife generieren, würde man alle Gene, die für FAD-abhängige Enzyme codieren, aus dem Cluster selektieren. Da das nicht allein Baeyer-Villiger-Monooxygenasen wären, sondern Oxygenasen unterschiedlicher katalytischer Aktivität, wie Dehydrogenasen und weitere Enzyme, war es nicht sinnvoll, die Primer allein auf Grundlage des Motivs der Rossmann-Schleifen zu konstruieren.

Fünf Aminosäuren in Richtung *N*-Terminus vor der Adenosin-bindenden Rossmann-Schleife befindet sich mit ca. 50%iger Übereinstimmung die Aminosäure Asparaginsäure (D, hellgrüner Kasten Abbildung 68). Nach Meinung von J. ROHR und Mitarbeitern ist diese Asparaginsäure (D) in Zusammenhang mit der ersten Rossmann-Schleife eine konservierte Region für Baeyer-Villiger-Monooxygenasen.<sup>[34,35]</sup> In unserem Alignment fällt jedoch auf, dass die Asparaginsäure (D) nur zu 66% in den sechs BVMO-Genclustern vorkommt. Aufgrund der geringen Übereinstimmung der Asparaginsäure in den BVMO-Gensequenzen und die große Entfernung zur ersten Rossmann-Schleife ist es nicht sinnvoll diese Asparaginsäure in das Primerdesign einzubeziehen. Dem Alignment ist aber zu entnehmen, dass *C*-terminal hinter der Rossmann-Schleife (roter Kasten, rot unterlegt) eine hoch konservierte Region für Baeyer-Villiger-Monooxygenasen ist, die bisher noch nicht beschrieben wurde. Zum einen, um nicht alle FAD-bindenden Enzyme heraus zu selektieren und weil eine eben so hoch konservierte Region identifiziert werden konnte, setzte das vorliegende Primerdesign für die forward-Primer 1 erst *C*-terminal hinter der Rossmann-Schleife an. Der reverse Primer 1 wurde an einer noch höher konservierten Region festgesetzt (roter Kasten rot unterlegt, Abbildung 68). Vier der sechs Aminosäuren aus dem Alignment der Aminosäuresequenzen der BVMO-Enzyme stimmen untereinander zu 100% überein.

Desweiteren wurden Richtung *C*-Terminus weitere sechs konservierte Regionen ausgemacht, von denen drei forward-Primer 3, 4 und 2 und fünf reverse-Primer 1 - 5 abgeleitet wurden.

Da die Aminosäuresequenz in der Nukleotidsequenz der DNA codiert vorliegt, müssen die Primer über den genetischen Code (Abbildung 70) in eine Nukleotidabfolge übersetzt werden. Jede Aminosäure wird durch ein Basentriplett, bestehend aus Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C) beschrieben. Da der genetische Code degeneriert ist, kommen für jede Aminosäure mehrere Codes in Frage, was das Primerdesign deutlich erschwert. An einem Beispiel sei das hier näher erklärt. Der Primer For 2 (blau, Abbildung 68) für die

Aminosäuresequenz VGCDGE wird anhand des genetischen Codes (Abbildung 70) in die Nukleotidsequenz übersetzt (Tabelle 12).



**Abbildung 70:** Der genetische Code: Der Triplet-Code wird er von innen nach außen gelesen.

Primer- Nummer	Valin (V)	Glycin (G)	Cystein (C)	Aspartat (D)	Glycin (G)	Glutamat (E)
1.	5' – <b>GTT</b>	GGT/C/A/G	TGT/C	GAT/C	GGT/C/A/G	GA – 3'
2.	5' – <b>GTC</b>	GGT/C/A/G	TGT/C	GAT/C	GGT/C/A/G	GA – 3'
3.	5' – <b>GTA</b>	GGT/C/A/G	TGT/C	GAT/C	GGT/C/A/G	GA – 3'
4.	5' – <b>GTG</b>	GGT/C/A/G	TGT/C	GAT/C	GGT/C/A/G	GA – 3'

**Tabelle 12:** Beispiel der Primerableitung von der Aminosäuresequenz VGCDGE in die Nukleotidsequenz anhand des genetischen Codes. Unterschiede fett eingezeichnet.

Man erkennt, dass für eine Aminosäure (AS) häufig die dritte Base im Basentriplett variiert und dennoch ein und dieselbe AS codiert wird. Daher wurden für die Aminosäuresequenz For 2 mindestens vier Primergruppen abgeleitet (1. – 4. siehe Tabelle 12), die sich in der dritten Position der ersten Aminosäure jeweils unterscheiden (fett). An die dritte Stelle der zweiten bis fünften AS setzt man Platzhalter, die eine Mischung aller gewünschten Nukleotide enthalten. Diese Positionen werden „Wobble“-Positionen genannt, sind nicht sehr spezifisch und haben damit mehrere Bindungsmöglichkeiten. Das Alignment zeigt, dass anstatt der letzten Aminosäure Glutaminsäure (Glu, E) auch häufig ein Glycin (Gly, G) in den

Gensequenzen vorkommt. So wurden weitere vier Primer hergestellt, die von der AS-Sequenz VGCDGG statt VGCDGE abgeleitet wurden. Somit wurde eine große Anzahl an Primern für PCR-Reaktionen erreicht. Aus dem Alignment der Aminosäure-Sequenzen wurden acht für BVMOs konservierte Regionen abgeleitet. Daraus resultierten die Primer For 1 - 4 und Rev 1 - 4. In Tabelle 13 ist die Primeranzahl zusammengefasst, die für die PCR-Reaktionen bestellt wurden.

AS-Sequenz	Name der Primer	Anzahl abgeleiteter Primer (1. Generation)	Name der Primer	Primer gepoolt (2.Generation)
For 1	BV11f	1	BVB1f – BVB5f	5
Rev 1	BV11r – BV15r	5	BVB1r – BVB5r	5
For 2	BV21f – BV28r	8		
Rev 2	BV21r – BV22r	2		
For 3	BV31f	1		
Rev 3	BV31r – BV32r	2		
For 4	BV41f	1		
Rev 4	BV41r – BV42r	2		
For 5	BV51f – BV54f	4		
Rev 5	BV51r – BV54r	4		

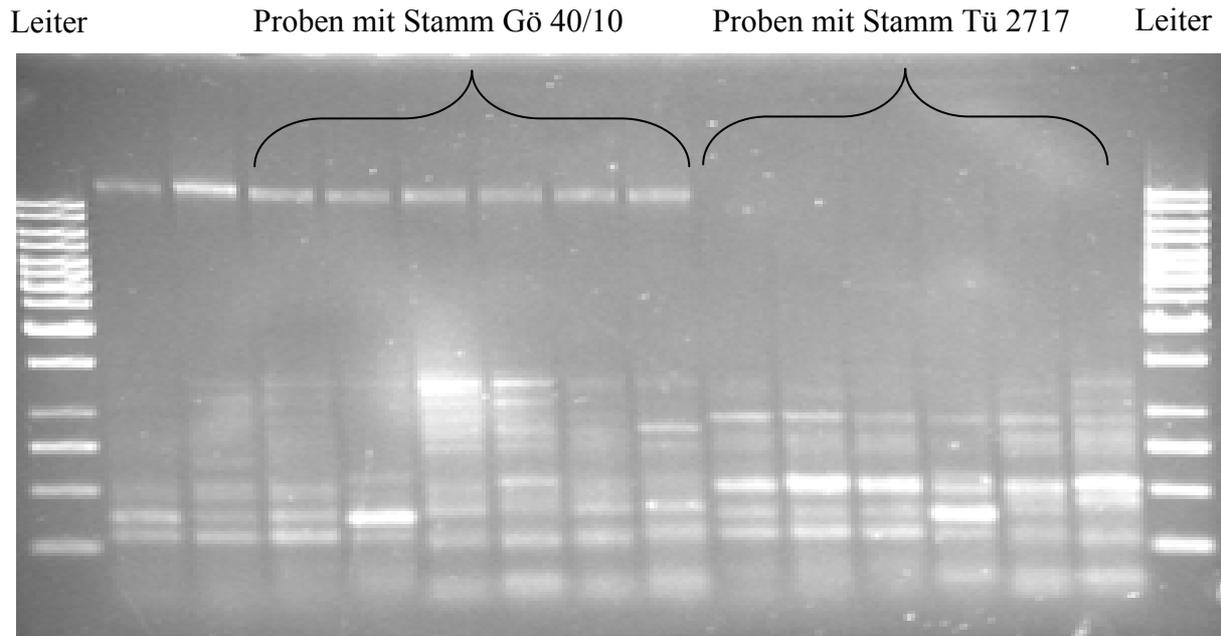
**Tabelle 13:** Anzahl der abgeleiteten Primer für die PCR-Reaktionen. Grau unterlegt sind die Primer, die zu einem positiven Ergebnis führten. Die Primer wurden von *Metabion* (Martinsried) bezogen.

Im folgenden Kapitel wird die Anwendung der abgeleiteten Primer an genomischer DNA beschrieben. Diese Versuche sollten zeigen, ob die abgeleiteten Primer in einer PCR-Reaktion spezifisch binden und das gewünschte DNA-Fragment amplifizieren. Das heisst, dass nach der PCR-Reaktion möglichst nur ein PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese zu beobachten ist, das auf die Primerpaare zurückzuführen ist. Die Größe dieses PCR-Produkts kann anhand des Alignments abgeschätzt werden, indem die Anzahl an Aminosäuren, die dieser Abschnitt lang ist, mit dem Faktor drei multipliziert wird. In diesem Fall sollte ein PCR-Produkt einer Größe von ca. 500 bp entstehen. Unter B. XIII4.3 sind alle Primerpaare mit ihren vollständigen Nukleotidsequenzen angegeben, die im Vorversuch mit der genomischen DNA zu einem positiven Ergebnis führten.

### 1.5.2. Vorversuch mit der genomischen DNA des Stammes Gö 40/10

Aus dem Alignment (Abbildung 68) konnten acht hoch konservierte Regionen für BVMOs identifiziert werden. Aus diesen konservierten Regionen konnten zunächst vier, später insgesamt fünf Primerpaare abgeleitet werden. Wie aus Tabelle 13 ersichtlich, würde daraus die Summe von 41 PCR-Reaktionen (5 PCR für Primerpaar (PP) 1; 16 PCR für PP 2; 2 PCR für PP 3; 2 PCR für PP 4 und 16 PCR für PP 5) allein mit jedem DNA-Templat resultieren. Um überschaubare Ergebnisse aus den PCR-Experimenten zu erhalten, wurde nicht unter Einsatz der 81 vorselektierten Cosmide aus der Cosmidbank von *Combinature* und nicht unter Einsatz der acht priorisierten Cosmide gearbeitet. Stattdessen wurde zunächst genomische DNA des Stammes Gö 40/10 isoliert, und mit dieser PCR-Versuche unternommen (B. XIII.4.3). Um sicherzustellen, dass die erhaltenen Ergebnisse der PCR auf Gene für BVMOs zurückzuführen sind, wurde parallel die genomische DNA des Stamms *Streptomyces fradiae* Tü 2717, des Urdamycin-Bildners mit denselben Primern untersucht. Da der Urdamycin-Bildner Tü 2717 der Literatur nach zu urteilen (vgl. A. VI.3) BVMO Gene enthält, von denen die Primer abgeleitet wurden, sollte dieses Experiment als positive Referenz gelten. Da die genomische DNA von Streptomyceten bis acht Mb groß ist und stark verdrillt vorliegt, wurde die genomische DNA der Stämme mit *BamHI* 15 min partiell verdaut, um eine Anlagerung der Primer in der PCR zu erleichtern. Die Primer, die bei der PCR gleichzeitig verwendet wurden, wiesen eine um ca. 6°C schwankende Schmelztemperatur auf. Daher wurde die Methode der Touchdown-PCR (A. VI.4.1) angewendet. In den ersten drei PCR-Durchgängen wurden die vier zunächst abgeleiteten Primerpaare For1/Rev 1 bis For 4/Rev 4 verwendet, was insgesamt zu 25 PCR-Ansätzen für je Gö 40/10 und Tü 2717 führte.

Die PCR, deren Produkte im Agarosegel in (Abbildung 71) aufgetrennt wurden, wurde mit den Primerpaaren (5 Stück), die von der Sequenz For 1 und Rev 1 abgeleitet wurden (For 1: BV 11f und Rev 1: BV 11r – BV 15r), durchgeführt. Um die aus der PCR erhaltenen DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurde eine Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung durchgeführt (B. XIII.4.2). In Abbildung 71 ist zu erkennen, dass neben der erwarteten Bande bei 500 bp mehrere Banden gefunden wurden. Da auf dem Gel fünf und mehr PCR-Produkte zu sehen waren, war die PCR nicht spezifisch verlaufen. Dies verwunderte nicht, da die Sequenz jedes Primers nicht einheitlich war, um der Degeneration des genetischen Codes gerecht zu werden (Wobble-Positionen, Tabelle 20) und damit die Möglichkeit zur Hybridisierung nicht spezifisch war.



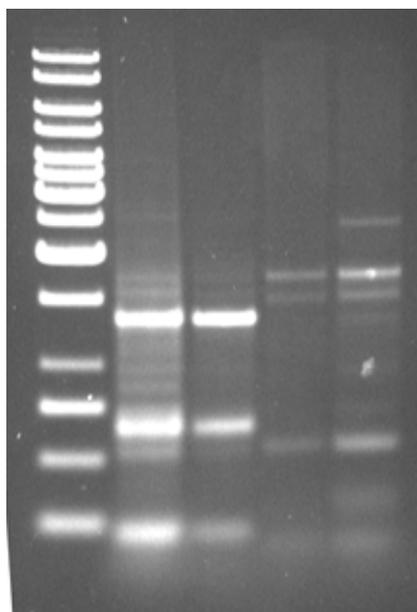
**Abbildung 71:** Agarosegel der genomischen DNA von Gö 40/10 (rechte Hälfte) und Tü 2717 (linke Hälfte) nach der PCR mit den Primerpaaren BV11f mit jeweils BV11r – BV15r. Zusätzlich wurden 2  $\mu$ L eine 1 kb großen DNA-Leiter (*Fermentas*) aufgetragen.

Somit wurde das Primerpaar BV 11f und BV 11r durch Aufspaltung in eine neue Primergruppe (BV B1f – BV B5f und BV B1r – BV B5r) spezifischer gemacht, indem die 3. und 4. AS des forward-Primers und die 2. und 5. AS des reverse-Primers, die in der jeweiligen Primer-Mischung vierfach gewobbelt vorlagen, nun durch eine zweifach gewobbelte Codierung ersetzt wurden (Tabelle 20, B XIII4.3). Mit diesen Primerpaaren der zweiten Generation, wurde erneut eine PCR durchgeführt.

Das Agarosegel nach der PCR, die mit den Primern BV B1f (5' – ATG CT(C/G) GC(T/C) GG(T/C) GA(A/G) CT – 3') und BV B2r (5' – GA(A/G) GG(A/G) GA(T/C) TG(T/C) GG(A/G) GT – 3') durchgeführt wurde, zeigte neben der 500 bp großen Bande nur drei weitere PCR-Hauptprodukte. Die Proben 27-1 und 27-2 in Abbildung 72 stammen von der PCR mit der genomischen DNA des Stamms Tü 2717 und die Proben 40-1 und 40-2 in derselben Abbildung sind mit der genomischen DNA des Stamms Gö 40/10 gemacht worden. Auf dem Gel war zu sehen, dass eine PCR-Produktbande der Größe ~ 500 bp gebildet wurde, so dass jetzt eine quantitative Gelelektrophorese mit dem gesamten Ansatz der PCR-Reaktion gemacht wurde, mit der Absicht die 500 bp-Bande zu isolieren. Das Ausschneiden musste ohne Anfärben des gesamten Geles erfolgen, da die Interkalation mit Ethidiumbromid die DNA zerstört. Daher wurde das äußerste Ende des Agarosegels, das u. a. die DNA-Leiter enthielt vom Gel abgetrennt, mit Ethidiumbromid unter UV-Licht ausgewertet und die Stelle

der 500bp-Bande mit einem Skalpell markiert. So konnte, nachdem das markierte Agarosestück wieder an das Gel angelegt worden war, die 500 bp-Bande des gesamten nicht angefärbten Agarosegels ausgeschnitten werden.

Leiter 27-1 27-2 40-1 40-2



**Abbildung 72:** Agarosegel der genomischen DNA von Tü 2717 und Gö 40/10 nach der PCR mit dem spezifischen Primerpaar BVB1f und BVB2r. Es wurden die Proben 27-1, 27-2, 40-1 und 40-2 von links nach rechts aufgetragen. Zusätzlich ist eine 1 kb große DNA-Leiter (*Fermentas*) aufgetragen.

Aus dem Agarosegel wurde das PCR-Produkt mit Hilfe eines Präparationskits der Firma *Qiagen* (QIAquick PCR Purification Kit) isoliert. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit Hilfe des TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kits der Firma *Invitrogen* in einen Vektor 2.1-TOPO kloniert. Zur Klonierung wurde statt einer Ligase ein mit *Vaccinia* Topoisomerase I „aktivierter“ TA-Vektor verwendet. Die Topoisomerase erkennt die Schnittstelle (C/T)CCTT, bindet die Vektor-DNA und bleibt über eine 3'-Phosphotyrosyl-Bindung kovalent an Topoisomerase gebunden. Da die *Taq*-Polymerase bei einem PCR-Durchgang immer die Base „A“ an das Ende des PCR-Produktes anhängt und der TOPO-Vektor nach dem Schnitt der Topoisomerase ein T-Überhang hat, wird das PCR-Produkt mit dem TOPO-Vektor ligiert. Der TOPO-Vektor besitzt neben der „multiple cloning site“ zum einen ein Ampicillin-Resistenzgen zum anderen das Gen *LacZα* zur Selektion. Wird *LacZα* durch insertieren eines DNA-Fragments zerstört, kann der blaue Farbstoff, den *LacZα* normalerweise bildet, nicht mehr produziert werden. Dieses Phänomen ist auf die Reaktion einer  $\beta$ -Galactosidase zurückzuführen (Blau-Weiß-Selektion). Der Vektor, der das PCR-Insert enthielt, wurde in

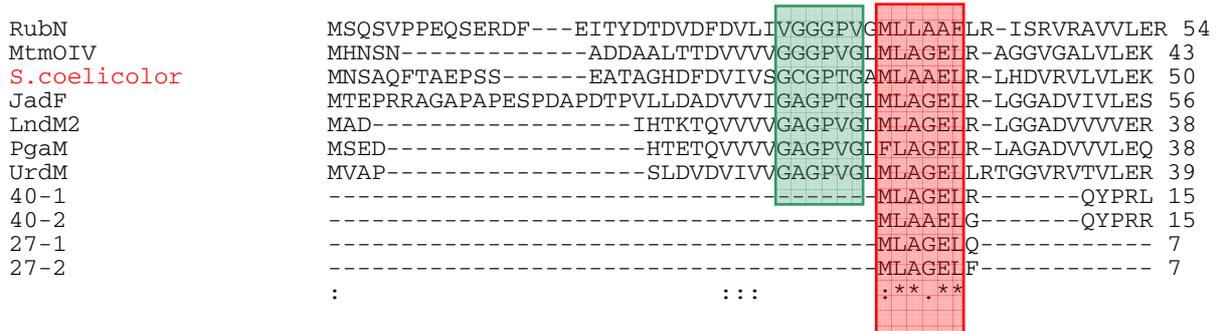
kompetente *E. coli* (TOP10-Zellen) *via* Hitzeschock transformiert. Die Transformationsprodukt-Zellen wurden auf eine LB-Agarplatte mit Ampicillin gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Alle Klone mit Weißfärbung tragen ein DNA-Produkt als Insert. Inaktive Zellen, die mit einem Vektor ohne Insert, erschienen blau gefärbt. Es wurden einzelne weißgefärbte Kolonien über Nacht in flüssigem LBamp-Medium (4 mL, 37°C, 220 rpm) angezogen und daraus die Plasmid-DNA mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid-Kits der Firma *Macherey-Nagel* isoliert. Die zwei Proben des Stammes Tü 2717 (27-1, 27-2; vgl. Abbildung 72) und zwei Proben des Stammes Gö 40/10 (40-1, 40-2; vgl. Abbildung 72) wurden von der Firma *Göttingen Genomics Laboratory* (G2L) ansequenziert.

Diese Sequenzen wurden mit dem Programm ClustalW 1.83 verglichen, um Übereinstimmungen der Nukleotidsequenzen der Primerprodukte untereinander zu finden. Aus diesem Vergleich war ersichtlich, dass alle Sequenzen der PCR-Produkte die Sequenz des Primers BV B1f als Anfangs- (vgl. Abbildung 73) bzw. die Sequenz des Primers BV B2r als Endsequenz trugen. Damit wurde gezeigt, dass mittels PCR erfolgreich das von den Primern vorgegebene DNA-Fragment amplifiziert wurde. Die DNA-Fragmente der Sequenzen 27-1, 27-2 und 40-1, 40-2 wurden auf Übereinstimmung mit bisher publizierten Sequenzen in der Datenbank BLAST<sup>[135]</sup> der NCBI untersucht. Diese Suche ergab, dass Sequenzen der Proben 27-1 und 27-2 des Stammes Tü 2717 mit einem Stück der genomischen DNA des Stammes *Streptomyces coelicolor* und *Streptomyces avermitilis* zu 98%ige übereinstimmten. Da der Stamm Tü 2717 als positive Referenz in die PCR-Experimente eingebracht worden waren, hätte im optimalen Fall erwartet werden können, dass die Suche in BLAST eine Übereinstimmung mit *urdM* ergibt. Offensichtlich waren die Primer nicht spezifisch genug, um *urdM* aus der riesigen genomischen DNA (~ 8 Mbp bei Streptomyceten) zu selektieren, was nicht bedeutet, dass die designten Primerpaare nicht spezifisch genug wären, um die BMVO-Gene aus den kleineren Cosmiden (<85 kbp) zu selektieren.

Das Ergebnis der Suche in BLAST nach Übereinstimmungen der Sequenzen der DNA-Fragmente 40-1 und 40-2 aus Gö 40/10 mit Sequenzen in der BLAST-Datenbank<sup>[135]</sup> zeigte, dass die Sequenzen der Proben 40-1 und 40-2 eine überraschende Homologien zu Fragmenten der genomischen DNA eines *Penicillium*-Stammes aufwiesen. Eine Bewertung dieses Ergebnisses ist zu früh, da die Sequenz, die in der PCR amplifiziert wurde zu kurz ist und keine literaturbekannten konservierten Regionen aufwies.

Interessanter Weise zeigte die Sequenzanalyse, dass die erhaltenen DNA-Fragmente aus Tü 2717 vermutlich in direkter Nachbarschaft zu einer Rossmann-Schleife liegen (Abbildung 73), da dies der Fall für die 98% homologe Sequenz von *Streptomyces coelicolor* ist. Dies entspricht genau dem Primerdesign des verwendeten forward-Primer BV B1f.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment



**Abbildung 73:** Alignment von sechs Aminosäure-Sequenzen, u.a. *Streptomyces coelicolor* (3. Reihe) und der vier ansequenzierten Proben (27-1, 27-2, 40-1, 40-2). Rossmann-Schleife grün unterlegt, Primer For 1 rot unterlegt.

Um ein selektives Primerpaar zu erhalten, wurde ein neues Primerpaar 5 aus der Aminosäure-Sequenz abgeleitet. Die AS-Sequenz des forward-Primers 5 war im Vergleich zur AS-Sequenz des ursprünglichen forward-Primers BV B1f um zwei AS in Richtung N-Terminus verschoben und beinhaltet damit als N-terminale AS das C-terminale Glycin der Rossmannschleife (GxGxxG). Somit sollte der neue forward-Primer 5 sowohl selektive Teile der konservierten Region der BVMO wie auch der Rossmann-Schleife enthalten (For 5, lila in Abbildung 68). Insgesamt wurden vier forward-Primer für die AS-Sequenz GLMLA abgeleitet (BV 51f – BV 54f). Um ein größeres DNA-Fragment mit Hilfe der PCR zu amplifizieren, und damit in der BLAST-Datenbanksuche<sup>[135]</sup> eindeutiger Ergebnisse zu erhalten, wurden vier weitere reverse Primer 5 (BV 51r – BV 54r) von der Aminosäure-Sequenz GGKLA abgeleitet, die eine konservierte Region in einem Abstand von 850 – 900 bp zum forward-Primer darstellt. Gleichzeitig können die Primerpaare 1 und 5 in einer Nested-PCR kombiniert werden. Damit wurde erhofft selektive BVMO-Primer generiert zu haben, die nun Identifizierung und Isolierung der BVMO-Gene ermöglichen.

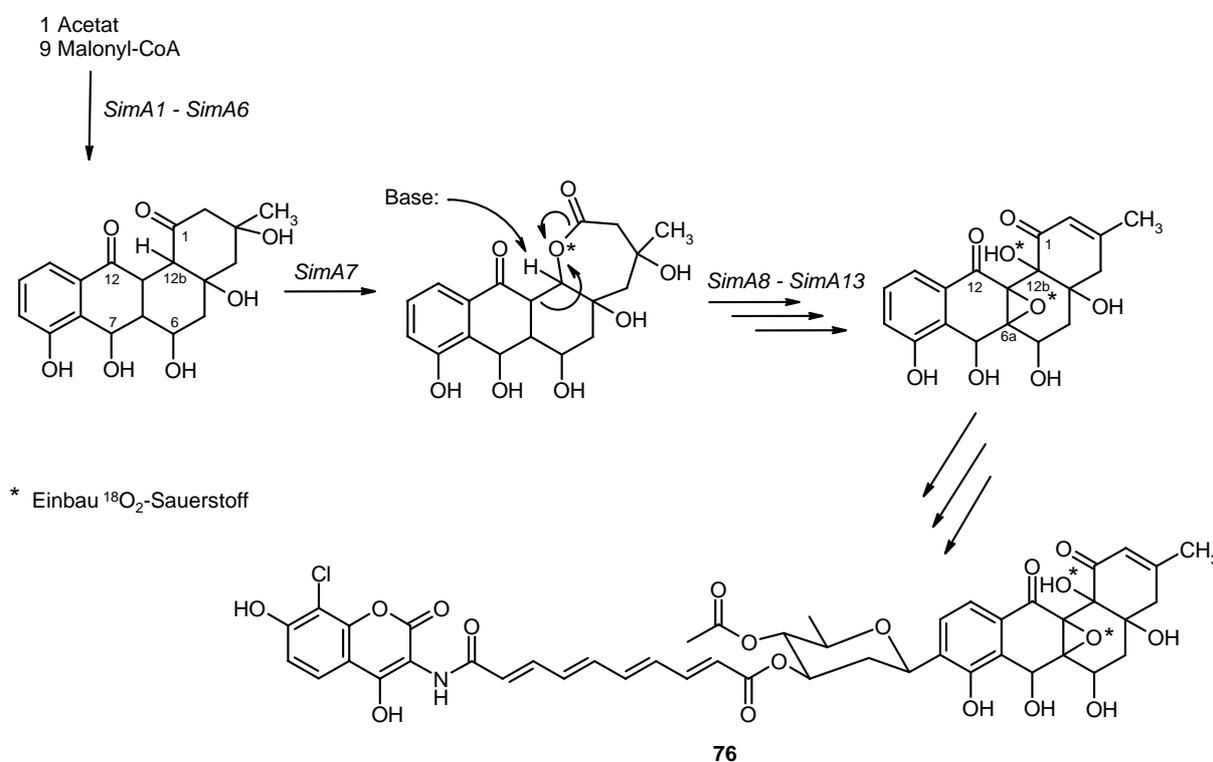
## 1.6. Diskussion und Ausblick

Das Ziel, das in diesem Kapitel verfolgt wurde, war das Design von selektiven BVMO-Primern, anhand derer eine neue und selektive Sonde für die Gene der Baeyer-Villiger-Monooxygenase zu konstruieren ist. Die Isolierung des Biosyntheseclusters des Collinolactons (7) war das Fernziel, da hier unbeantwortete Fragen zur Biosynthese mit besonderem Augenmerk auf die postulierte [6+4]Cycloaddition zu klären waren. Die Mitwirkung einer BVMO in dem post-PKS Abschnitt der Biosynthese des Collinolactons (7) konnte durch detaillierte Analyse der Biogenese aller Atome und Vergleich mit der BVMO-abhängigen Biosynthese anderer Sekundärmetabolite herausgearbeitet werden.

Um eine Sonde zu generieren, mussten zunächst konservierte Regionen einer BVMO ermittelt und in PCR-Experimenten auf ihre Selektivität getestet werden. In diesem Fall sollte die BVMO-Sonde radioaktiv oder fluoreszierend markiert werden und über Klone, die die genomische DNA des Collinolactonbildners Gö 40/10 enthalten, getestet werden.

Anhand eines Alignments (Abbildung 68) literaturbekannter Enzym-Sequenzen für Proteine, die eine Baeyer-Villiger-Oxidation katalysieren, konnten acht konservierte Regionen definiert werden. Von den Aminosäure-Sequenzen dieser konservierten Regionen wurden Primer abgeleitet, die in PCR-Experimenten erfolgreich getestet wurden. Als DNA-Templat für die PCR-Versuche wurde genomische DNA des Stammes Gö 40/10 und Tü 2717 verwendet. Durch PCR-Experimente mit der DNA des Stammes Tü 2717 konnte mit dem Primerpaar BV 11f und BV 12r ein ~ 500 bp großes DNA-Fragment amplifiziert werden, das nach Isolierung, Sequenzierung und vergleichender Suche in der Datenbank BLAST<sup>[135]</sup> eine 98%ige Übereinstimmung mit einem Ausschnitt der genomischen DNA der Stämme *Streptomyces coelicolor* und *avermitilis* zeigte. Für den Stamm Gö 40/10 konnte bislang keine Ähnlichkeit zu Ausschnitten genomischer DNA von Streptomyceten nachgewiesen werden. Tü 2717 wurde als positive Referenz mit in die Untersuchungen einbezogen, da auf dem Biosynthesecluster mit *UrdM* ein Enzym codiert ist, das der Literatur zufolge eine BVO katalysiert.<sup>[132]</sup> Wenngleich es die konzipierten Primer bislang nicht ermöglichten, den *UrdM* Biosynthesecluster aus der genomischen DNA von Tü 2717 zu isolieren, so konnten die erhaltenen Ergebnisse verwendet werden, um neue Primer 5 zu entwickeln. Sollte dieser Primer erfolgreich mittels PCR eine Oxygenase aus genomischer DNA von Tü 2717 oder Gö 40/10 selektieren, so erscheint ihr Einsatz an der Cosmidbank erfolgsversprechend.

Neben den in Kapitel A. V1.3 beschriebenen literaturbekannten Beispiel für Baeyer-Villiger-Oxidationen wurde ein weiteres Beispiel einer putativen Oxygenase gefunden. Der Stamm *Streptomyces* sp. Tü 6040 produziert die Sekundärstoffe der Familie der Simocyclinone. Sie zeigen ein Angucyclinon-Grundgerüst mit Zucker-, Tetraen- und Coumarineinheiten. A. BECHTHOLD konnte in einer Kooperation den Simocyclinon-Biosynthesegencluster des Stammes Tü 6040 isolieren und teilweise in seiner Funktion aufklären. Das Enzym *SimA7* zeigte bei einem Datenbankvergleich Ähnlichkeit zu einer putativen Oxygenase *Urde* aus dem Stamm Tü 2717.<sup>[139]</sup> M. HOLZENKÄMPFER führte im Rahmen ihrer Dissertation<sup>[140]</sup> Fütterungsexperimente an *Streptomyces antibioticus* Tü 6040 in <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-angereicherter Sauerstoffatmosphäre durch und erhielt das Einbaumuster von Luftsauerstoff im Angucyclinon-Grundgerüst für Simocyclinon D8 (**76**) für die Hydroxylgruppe an C-12b und für das Epoxid zwischen C-12a und C-6a.<sup>[141]</sup> Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Literaturbeispiele und dem experimentellen Ergebnis von M. HOLZENKÄMPFER, konnte ein hypothetischer Mechanismus der Hydroxylierung an dem Kohlenstoffatom C-12b unter Beteiligung einer Baeyer-Villiger-Oxidation im Rahmen dieser Arbeit aufgestellt werden (Abbildung 74).



**Abbildung 74:** Hypothetischer Aufbau des Angucyclinon-Grundgerüsts des Simocyclinons D8 (**76**) mit Beteiligung einer Baeyer-Villiger-Monooxygenase (*SimA7*) unter Berücksichtigung der Fütterungsexperimente in <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-angereicherter Sauerstoffatmosphäre von M. HOLZENKÄMPFER.

Anhand des Alignments von AS-Sequenzen ausgewählter Baeyer-Villiger-Monooxygenasen (*UrdM*, *JadF*, *LndM2*, *MtmOIV*) mit der AS-Sequenz von *SimA7* kann gezeigt werden, dass die AS-Sequenz MLAGEL (rot unterlegt), von der die Primer (BV11f und BVB1f – BVB5f) abgeleitet wurden und das Rossmann-Motiv (GxGxxG, grün unterlegt), auch im Biosynthesegencluster der Simocyclinone als konservierte Regionen auftreten (Abbildung 75). Neben der mechanistischen Betrachtung konnte somit auch anhand der Sequenzähnlichkeit gezeigt werden, dass es sich bei *SimA7* mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Baeyer-Villiger-Monooxygenase handelt.

An diesem weiteren Beispiels konnte gezeigt werden, dass die konservierten Regionen, die in das vorgestellte Primerdesign einfließen auch in der Aminosäure-Sequenz von *SimA7* zu finden sind. Dies zeigt, dass der Gedankenansatz zur Konstruktion einer BVMO-Sonde zur Isolierung des Genclusters des Collinolactons (7) durchaus erfolgsversprechend sein kann.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

UrdM          MVAP-----SLDVDVIVV GAGPVGL MLAGEL LRRTGGV RVTVLERLAE 42
JadF          MTEP RRAGAPAPESPDAPDTPVLLDADVVVI GAGPTGL MLAGEL RLGG-ADVIVLESRET 59
LndM2         MAD-----IHTKTQVVVV GAGPVGL MLAGEL RLGG-ADVIVVERLDT 41
SimA7         -----MDAQVIVV GAGPAGL MLAGEL RLAG-VDVVVLERLAQ 36
MtmOIV        MHNSN-----ADDAALTTD VVVV GGGPVGL MLAGEL RAGG-VGALVLEKLVE 46
              :*:::* .**.* : **.*

```

**Abbildung 75:** Alignment ausgewählter Baeyer-Villiger-Monooxygenaseenzyme (*UrdM*, *JadF*, *LndM2* und *MtmOIV*), und der AS-Sequenz von *SimA7*. Rossmann-Schleife grün unterlegt, Primer For 1 rot unterlegt.

## 2. Biologische Aktivitäten des Collinolactons und seiner Derivate

In ersten Untersuchungen zur biologischen Aktivität wurden die Metabolite 7, 59, 60, 61 und 62 im Plattendiffusionstest bezüglich ihrer Wirkung gegen die Testkeime *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Mucor hiemalis* und *Aspergillus* sp. untersucht. Keine dieser Vertreter zeigte bei Auftragen von 15 µL einer Konzentration von 1 mg/mL eine Aktivität gegen diese Bakterien bzw. Pilze.

### Test auf cytotoxische Aktivität†

Da das Collinolacton-Produkt, das H.-J. SCHIEWE isoliert hatte, cytotoxische und cytostatische Eigenschaften aufwies, wurde Collinolacton (**7**) von Prof. Dr. W. BEIL<sup>†</sup> auf eine mögliche cytotoxische Aktivität gegen drei Tumorzelllinien HMO2 (Magencarcinom), HEPG2 (Lebercarcinom) und MCF7 (Mammacarcinom) gemäß der NCI-Richtlinien<sup>[142]</sup> getestet. Für das Collinolacton (**7**) konnte bis zur höchsten Prüfkonzentration von 10 µg/mL keine Aktivität festgestellt werden, obwohl eine solche schon einmal getestet wurde. Trotz der negativen Ergebnisse aus den Tests des Naturstoffs **7** wurden die sieben Collinolacton-Derivate (**59**, **60**, **61**, **62**, **66**, **67**, **68**) ebenfalls auf cytotoxische Aktivität gegen die oben genannten Zelllinien bei Prof. Dr. W. BEIL getestet. Die Derivate (**59**, **60**, **61**) zeigten eine Hemmung des Zellwachstums von Tumorzellen *in vitro*. Die Ergebnisse der Testung sind in Tabelle 14 zusammengestellt.

Substanz	HM02		HepG2		MCF7	
	GI <sub>50</sub>	TGI	GI <sub>50</sub>	TGI	GI <sub>50</sub>	TGI
Collinolacton ( <b>7</b> )	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
4- <i>O</i> -Acetyllinolacton ( <b>59</b> )	8.8	> 10	7.5	> 10	0.3	5.1
4- <i>O</i> -Benzoyllinolacton ( <b>60</b> )	6.5	8.5	6.5	> 10	2.4	6.0
4- <i>O-p</i> -Brombenzoyllinolacton ( <b>61</b> )	7.0	> 10	7.4	> 10	0.9	6.8
4- <i>O-o</i> -Brombenzoyllinolacton ( <b>62</b> )	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
Monoepoxycollinolacton ( <b>66</b> )	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
15-Hydroxy-triepoxyllinolacton ( <b>67</b> )	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10
6,7,8,9-Tetrahydrocollinolacton ( <b>68</b> )	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10	> 10

**Tabelle 14:** Ergebnisse der Cytotoxizitätstests, alle Angaben in µg/mL, GI<sub>50</sub>: Growth Inhibition 50%, TGI: Total Growth Inhibition. Aktive Derivate des Collinolactons (**7**) grau unterlegt.

Die drei cytostatisch wirksamen Derivate zeigten gegen alle drei getesteten Zelllinien in Konzentrationen unter 10 µg/mL eine Wachstumsinhibierung von 50% (GI<sub>50</sub>). Auffallend ist die selektive Wirkung der drei Derivate (**59**, **60**, **61**) gegen die Zelllinie MCF7. Es konnte eine

† Für die Durchführung der Cytotoxizitätstest danke ich Herrn Prof. Dr. W. BEIL, Institut für Pharmakologie, Medizinische Hochschule Hannover.

vollständige und potente Inhibierung des Wachstums (TGI) und cytotoxische Aktivität (LC<sub>50</sub>) beobachtet werden.

*Test auf Mikrotubuli-modifizierende Wirkung<sup>‡</sup>*

Collinolacton (**7**) und seine sieben Derivate **59** – **62**, **66** – **68** wurden im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung von Herrn Dr. F. SASSE<sup>‡</sup> auf eine mögliche cytostatische/cytotoxische Aktivität durch einen Einfluss auf die Mikrotubulistabilität getestet.

Die acht Proben wurden zunächst mit L929-Mausfibroblasten auf Proliferationshemmung getestet. L929-Mausfibroblasten sind Zellen aus dem subkutanen Gewebe einer männlichen C3H/An-Maus. Die Zellen wachsen adhärent und haben eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie. Das Read-out des MTT-Assays ergab folgende IC<sub>50</sub>-Werte, die in Tabelle 15 zusammengefasst wurden.

Danach hemmt das nicht-derivatisierte Collinolacton (**7**) sowie seine Epoxide- (**66**, **67**) und das Tetrahydro-Derivat (**68**) die Proliferation der Mauszellen nicht. Die aktivste Verbindung hingegen ist das 4-*O*-Benzoylcollinolacton (**60**). Es folgen *o*-Brombenzoyl- (**62**) mit 6 µg/mL und *p*-Brombenzoyl-Derivat (**61**) mit 10 µg/mL. Das 4-*O*-Acetylcollinolacton (**59**) zeigt mit 20 µg/mL eine schwache Aktivität.

Substanz	IC <sub>50</sub> in µg/mL
Collinolacton ( <b>7</b> )	> 40
4- <i>O</i> -Acetylcollinolacton ( <b>59</b> )	20
4- <i>O</i> -Benzoylcollinolacton ( <b>60</b> )	0.7
4- <i>O-p</i> -Brombenzoylcollinolacton ( <b>61</b> )	10
4- <i>O-o</i> -Brombenzoylcollinolacton ( <b>62</b> )	6
14-Methylen-15-hydroxy-6,7-monoepoxycollinolacton ( <b>66</b> )	> 40
15-Hydroxy-triepoxycollinolacton ( <b>67</b> )	> 40
6,7,8,9-Tetrahydrocollinolacton ( <b>68</b> )	> 40

**Tabelle 15:** Ergebnisse aus dem Mikrotubulistabilitätstest. IC<sub>50</sub>: Konzentration bei der halbmaximale Hemmung erreicht wird.

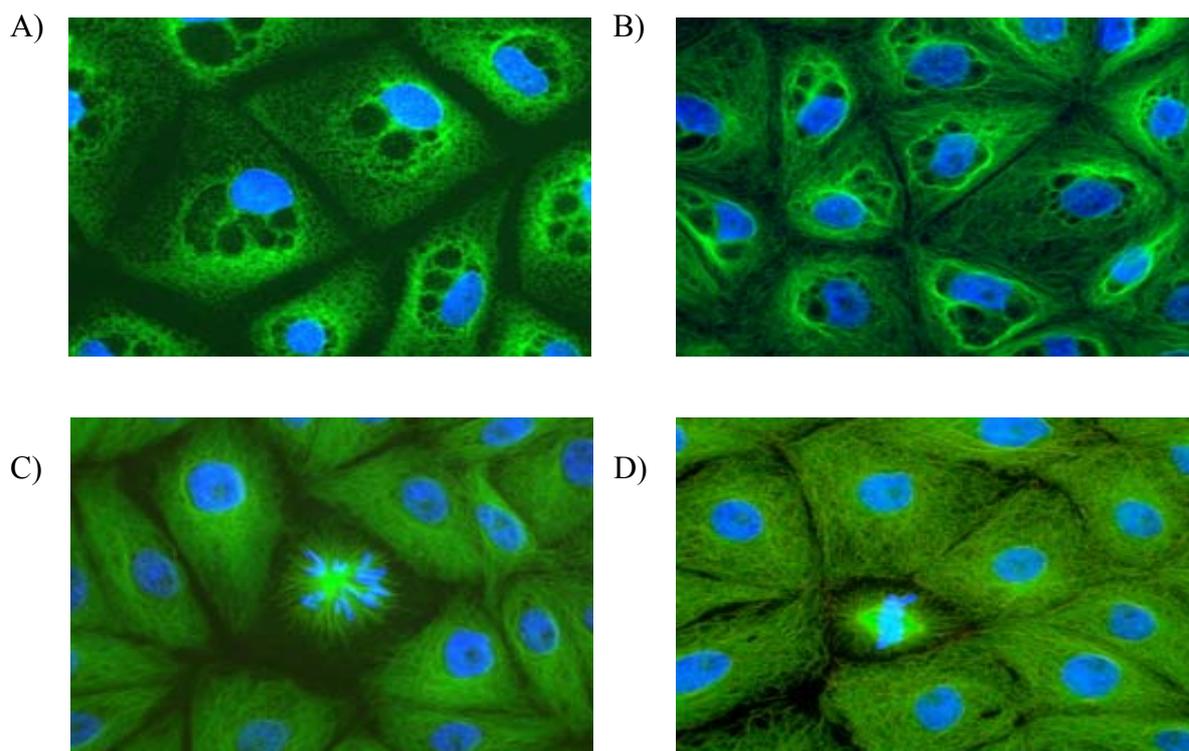
Die drei aktivsten Verbindungen **60** – **62** wurden auf ihren Wirkmechanismus hin näher untersucht. Es wurden PtK2-Zellen mit 20 µg/mL des jeweiligen Collinolactonderivats **60** –

<sup>‡</sup> Für die Durchführung der Mikrotubulistabilitätstests danke ich Herrn Dr. F. SASSE vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig.

**62** über Nacht inkubiert. Die PtK2-Zellen aus der Niere einer australischen Beutelratte (*Potorous tridactylis*) sind flach adhärenente wachsende Zellen mit Epithel-ähnlicher Morphologie. Verglichen mit den L929-Mauszellen wachsen sie langsamer und sind wegen ihrer flachen Struktur äußerst geeignet für Immunfluoreszenzfärbung der Mikrotubuli.

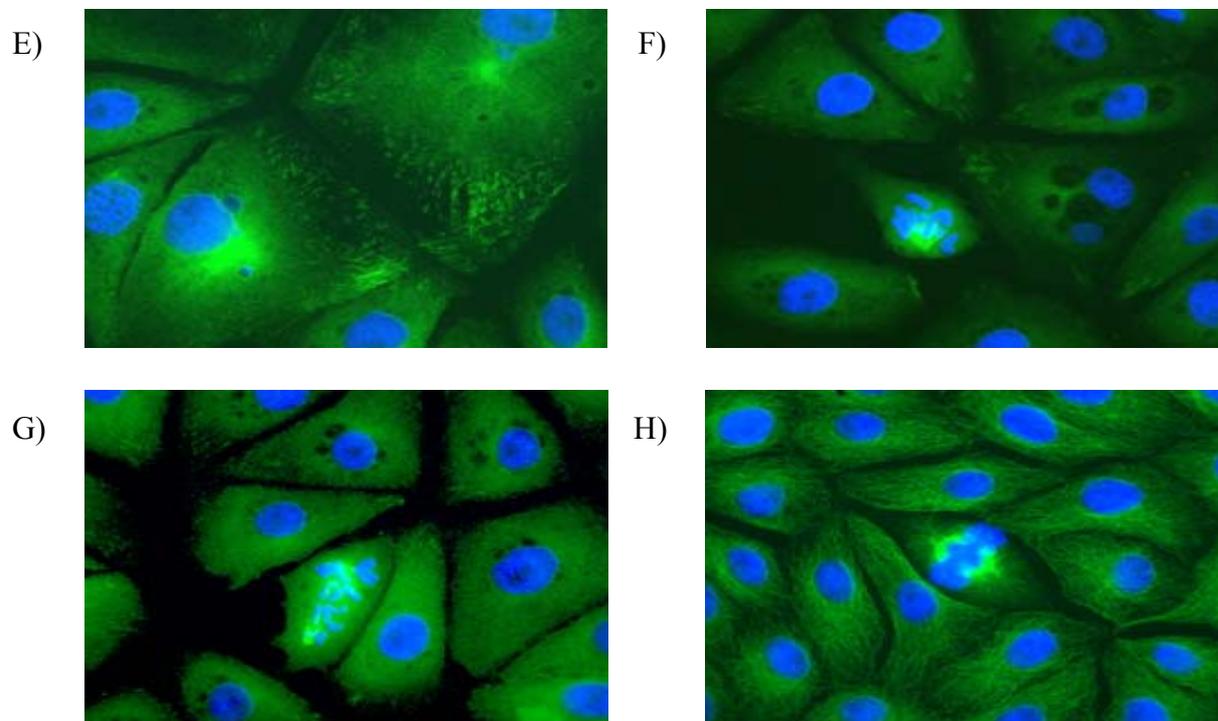
Es konnten folgende Phänomene beobachtet werden. Die Benzoyl-Verbindung **60** induziert eine Vakuolisierung im Endoplasmatischen Retikulum (A), die auch im Mikrotubulinetzwerk sichtbar wird (B) (Abbildung 76). Die Mikrotubuli selbst sind weniger betroffen.

Das Mikrotubulinetzwerk der PtK2-Zellen, die mit 4-*O-p*-Brombenzoylcollinolacton (**61**) behandelt wurden, zeigte keine besondere Veränderung. Hingegen zeigte eine hohe Anzahl an mitotischen Zellen eine monoastrale Halbspindelbildung statt des normalen, bipolaren Spindelapparates (C) (Abbildung 76). Das Wachstum der Zellen wurde mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 20 µg/mL inhibiert.



**Abbildung 76:** Beobachtete Phänomene: Vakuolisierung im ER (A) und im Mikrotubulinetzwerk (B) nach Inkubation der Zellen mit 4-*O*-Benzoylcollinolacton (**60**), sowie monoastrale Spindelbildung (C) nach Inkubation der Zellen mit 4-*O-p*-Brombenzoylcollinolacton (**61**) und normale bipolare mitotische Spindeln von PtK2-Zellen (D, Kontrolle). Mikrotubuli wurden durch Immunfluoreszenz grün markiert, während Zellkerne und Chromosomen mit DAPI blau gefärbt wurden.

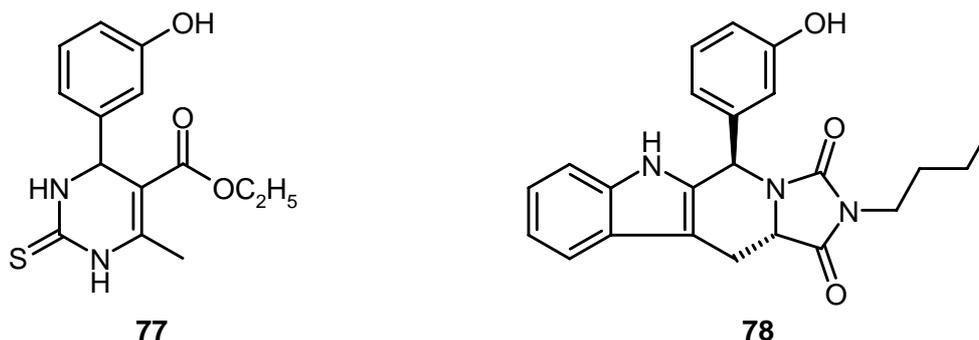
Das 4-*O-o*-Brombenzoylcollinolacton (**62**) zeigt im *in vitro* Zelltest einen Abbau des Mikrotubulinetzwerkes (E). Zusätzlich finden sich auch hier Halb- (F) oder Krüppelspindeln (G) (Abbildung 77).



**Abbildung 77:** Beobachtete Phänomene nach Inkubation der Zellen mit 4-*O-o*-Brombenzoylcollinolacton (**62**): Abbau des Mikrotubulinetzwerkes (E), sowie monoastrale Spindelbindung (F & G) und normale bipolare mitotische Spindeln von PtK2-Zellen (H, Kontrolle). Mikrotubuli wurden durch Immunofluoreszenz grün markiert, während Zellkerne und Chromosomen mit DAPI blau gefärbt wurden.

Den seltenen Phänotyp der Monoastralbildung haben erstmals T. U. MAYER und S. L. SCHREIBER mit dem danach benannten Monastrol (**77**) beschrieben.<sup>[143]</sup> Monastrol (**77**) ist eine Verbindung aus einer DOS-Bibliothek, die in einem Screening der chemisch synthetischen Genetik entdeckt worden ist. In weiteren Experimenten ist gezeigt worden, dass Monastrol (**77**) sehr selektiv auf das Kinesin Eg5 wirkt ( $IC_{50} = 14 \mu\text{g/mL}$ ).<sup>[144]</sup> Kinesine sind Motorproteine, die an zellbiologischen Vorgängen wie der Organisation und Funktion der Spindel und dem Langstreckentransport von Vesikeln und Organellen beteiligt sind. Im Unterschied zu anderen bekannten Naturstoffvertretern wie Taxol (**4**), Discodermolid oder den Epothilonen, die allesamt Mikrotubuli-stabilisierend wirken, oder zu Halochondrin B, den Spongistatinen oder den Vincaalkaloiden, die Mikrotubuli-destabilisierend wirken, ist das Monastrol (**77**) somit kein Spindelgift im herkömmlichen Sinne. Vielmehr war es die erste Verbindung, die die mitotische Maschinerie durch Wechselwirkung mit einem Motorprotein

inhibiert, und nicht durch direkte Wechselwirkung mit den Mikrotubuli. Der Angriff erfolgt somit an einer anderen Stelle im Zellcyclus, weil es das Kinesin Eg5 als Target attackiert. Eine weitere Verbindung, die zu monopolen Spindelbindung führt, ist das HR22C16 (**78**). HR22C16 (**78**) ist ebenfalls in einem Screening der vorwärtsgerichteten chemischen Genetik entdeckt worden. Als Target konnte auch hier Kinesin Eg5 identifiziert werden ( $IC_{50} = 0.8 \mu\text{g/mL}$ ).<sup>[145]</sup>



**Abbildung 78:** Strukturen der Kinesin Eg5-Inhibitoren Monastrol (**77**) und HR22C16 (**78**).

*Bioaktivitätstest auf Mikrotubuli-modifizierende Wirkung und EG5-Inhibition<sup>§</sup>*

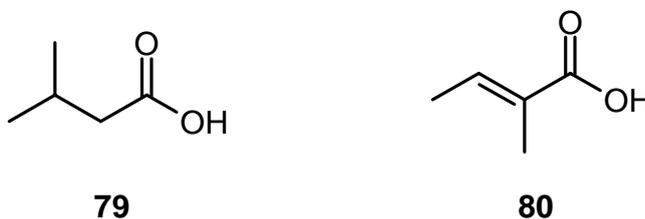
Die drei Benzoylderivate **60** – **62** und das nicht-derivatisierte Collinolacton (**7**) wurden zu Untersuchungen auf Mikrotubuli-modifizierende Wirkung an das MPI für Biochemie nach München zu Dr. T. U. MAYER geschickt. Es sollte die Aktivität der Derivate auf Kinesin Eg5 und ihre Selektivität getestet werden. Die Untersuchungen sind in Bearbeitung, so dass die Ergebnisse hier noch ausstehen.

Die drei aktivsten Derivate des Collinolactons (**60** – **62**) zeigen äußerst unterschiedliche Phänomene der Proliferationshemmung. Es stellt sich die Frage, warum das Collinolacton (**7**) selbst nicht aktiv ist. Strukturell ist zu bemerken, dass nur die an 4-OH veresterten Derivate **59** – **62** aktiv sind. Der Acetylrest zeigt nur eine sehr schwache Aktivität, hingegen der Benzoylrest die stärkste. Wird der Benzoylrest durch ein Bromatom stark vergrößert, so ist das Derivat, welches das Bromatom nah (*ortho*, **62**) am Collinolacton-Grundgerüst trägt aktiver, als das Derivat, das den Bromrest an der entferntesten Stelle (*para*, **61**) vom

<sup>§</sup> Für die Durchführung der Tests zur Mikrotubuli-Modifizierung danke ich Herrn Dr. T. MAYER vom Max-Planck-Institut für Biochemie (MPI) in München.

Collinolactonskelett trägt. Bisher ist nicht bekannt, dass Benzoesäure alleine solche Aktivitäten hervorrufen kann. Mit zwei weiteren Derivaten soll geklärt werden, inwiefern nur ein Benzylrest die Aktivität vermitteln kann, oder ob Substanzen anderer Größe und räumlicher Anordnung ebensolche Aktivitäten und Phänomene der Mikrotubuli-modifizierenden Wirkung hervorrufen können.

Es werden derzeit Derivate hergestellt, bei denen Collinolacton (7) zum einen mit Isobuttersäure (79) und zum anderen mit Tiglinsäure (80) verestert wird. Beide C<sub>4</sub>-Carbonsäuren stehen mit ihrer Größe direkt zwischen Essigsäure und Benzoesäure, sind aber untereinander gleich groß und unterscheiden sich allein in ihrer räumlichen Anordnung.



**Abbildung 79:** C<sub>4</sub>-Carbonsäuren: Isobuttersäure (79) und Tiglinsäure (80).

Tiglinsäure als linearer Vertreter und Isobuttersäure als etwas raumgreifender sollen das Bild der Aktivitätsabschätzung von Collinolacton (7) und seinen Derivaten 59 – 62, 66 – 68 komplettieren.

Mit den hier dargestellten Ergebnissen können die vier aktiven Derivate 59 – 62 als cytotoxisch und cytostatisch wirkende Substanzen angesehen werden. Die *in vitro* durchgeführten Tests zur biologischen Aktivität konnten anhand der Hemmung von Pilzen (*Candida albicans*, *Mucor hiemalis* und *Aspergillus* sp.) als weitere Vertreter eukariotischer Zellen in Plattendiffusionstests *in vivo* nicht nachgestellt werden. Die Pilze ließen sich durch die Derivate des Collinolactons 59 – 62 in ihrem Wachstum nicht hemmen.

## VI 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid aus *Streptomyces* Tü 3634

### 1. Verbindungsklasse der 1-*O*-Acylglykoside

Neben der Bedeutung von Kohlenhydraten im Allgemeinen Stoffwechselgeschehen, als Energieträger, Speicherstoff und Informationsträger spielt im Sekundärmetabolismus die Verknüpfung eines nicht-zuckerhaltigen Aglykons mit einer Zuckerkomponente eine besondere Rolle, da hierdurch eine Modulation der biologischen Wirkung erreicht werden kann.<sup>[146]</sup> Einige Antibiotika sind auch auf molekularer Ebene bezüglich ihrer Wirkungsweise betrachtet worden, wie z. B. Anthracycline, Angucyclinone, Endiine oder Makrolide. Hier zeigte sich das Vorhandensein von Zuckern als essentiell für deren biologische Aktivität und Bindungselektivität.

*O*-glykosidische Bindungen zwischen der anomeren Hydroxylgruppe eines Zuckers und anderen Hydroxylgruppen (eines zweiten Zuckers oder eines anderen Bindungspartners) sind ubiquitär verbreitet. Im Gegensatz dazu ist die Bildung von Acylglykosiden, in denen die anomere Hydroxylfunktion mit einer Carbonsäure verestert ist, sehr selten. Das Vorkommen solcher Verbindungen beschränkt sich meist auf niedermolekulare Naturstoffe des Sekundärmetabolismus.

Im Pflanzenreich finden sich hauptsächlich Monoester der D-Glucose, wobei die Aglyka den verschiedensten Substanzklassen angehören und ihre Ester unterschiedlichste biologische Aktivitäten zeigen. Man findet neben langkettigen Fettsäure-<sup>[147]</sup>, Monoterpen-<sup>[148]</sup> (**81**) und Carotenoidestern<sup>[149]</sup> der Glucose auch viele Beispiele für Hydroxyzimtsäurederivate, wie **82**, oder Ester hydroxylierter Benzoesäuren, die aber im Vergleich zu den entsprechenden *O*-Glucosiden deutlich weniger verbreitet sind.<sup>[150]</sup>

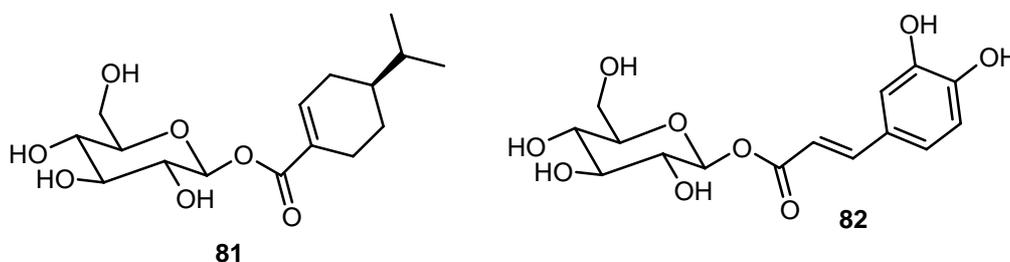
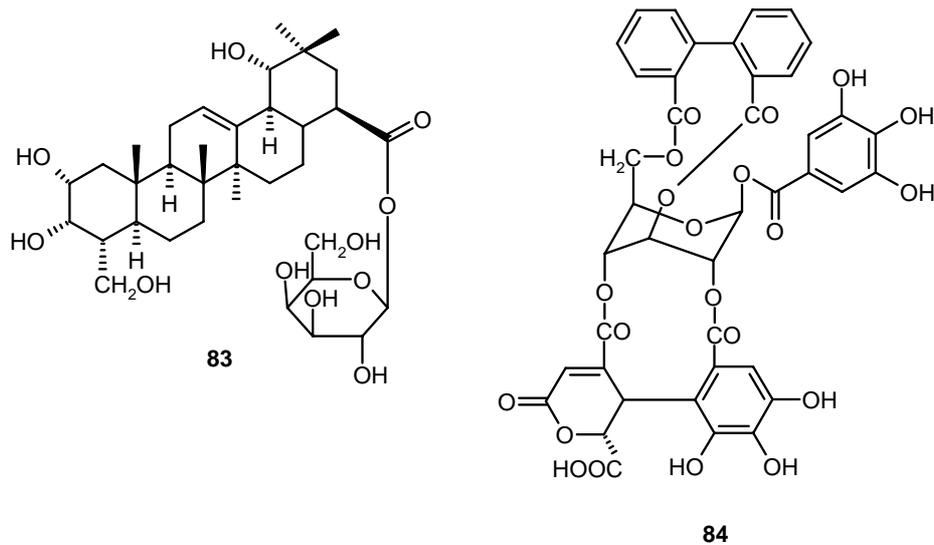
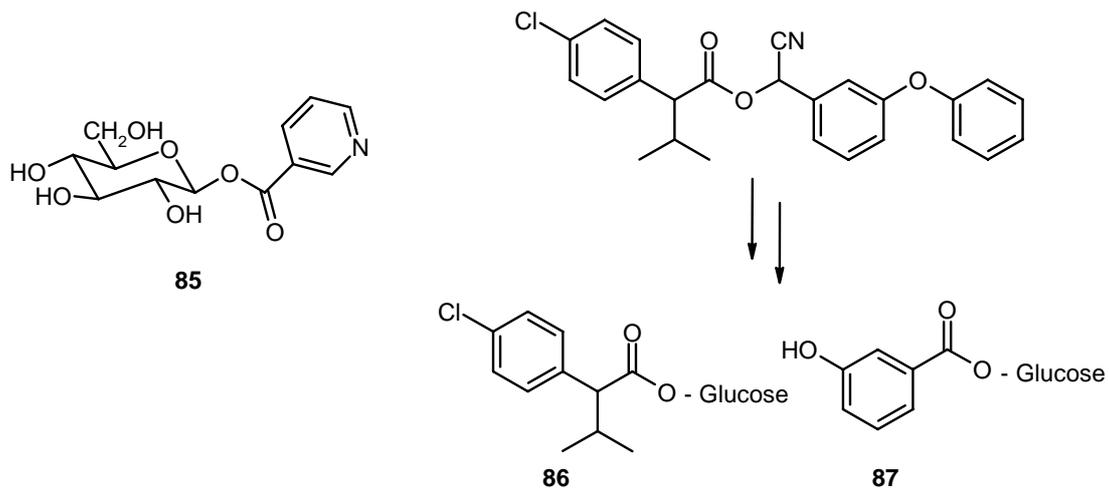


Abbildung 80: *O*-Acylglykoside **81** und **82** aus der Pflanzenwelt.



**Abbildung 81:** 1-O-Acylglykoside **83** und **84** aus der Pflanzenwelt.

Zu der großen Substanzklasse der Saponine, die aus mehreren Pflanzenfamilien beschrieben sind, gehören über 50 verschiedene Triterpensaponine wie **83**<sup>[151]</sup>, deren acylisch gebundene D-Glucose neben anderen Zuckern auch Teil eines Oligosaccharidrestes sein kann. Eine andere Großfamilie pflanzlicher Acylglucoside sind die Tannine, wie **84**<sup>[152]</sup>, die aufgrund ihrer stark gerbenden und adstringierenden Wirkung seit Jahrtausenden in der Gerberei Verwendung finden. Hierbei handelt es sich um mehrfach mit Gallussäure veresterte Glucosederivate oder ihre Di- und Tetramere.

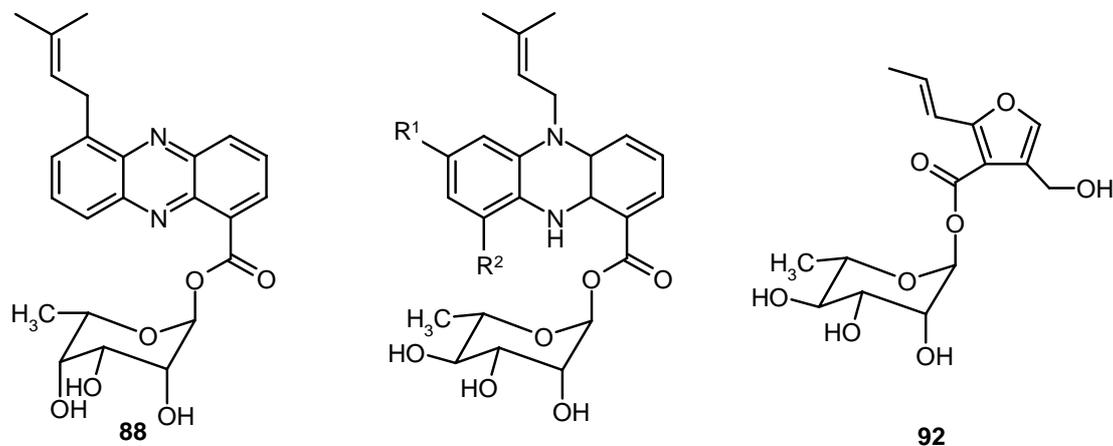


**Abbildung 82:** Detoxifikation von Xenobiotika durch Abbau des 1-O-Acylglucosids.

Mehrere Beispiele belegen, dass die Konjugation mit Glucose auch ein effizienter Weg zur Detoxifikation acider Xenobiotika ist. So kann man beispielsweise aus mit Nikotinsäure

behandelten Tabakpflanzen den entsprechenden Glucoseester (**85**) isolieren.<sup>[153]</sup> Auch bei Insekten ist ein vergleichbarer Mechanismus bekannt. Als Beispiel seien resistente Käfer der Gattung *Leptinotarsa* genannt, die das Insektizid Fenvalerat zu den Produkten **86** und **87** abbauen.<sup>[154]</sup>

Während bei Pflanzen als Zuckerbaustein Glucose weit verbreitet ist, findet man bei mikrobiellen Sekundärmetaboliten überwiegend Desoxyhexosen, die biosynthetisch aus Glucose hervorgehen. Acylglykoside aus Mikroorganismen sind bisher jedoch selten. Zu nennen ist hier zum einen das aus *Streptomyces* sp. isolierte Phenazoviridin (**88**)<sup>[155]</sup>, eine Phenazincarbonsäure, die mit 6-Desoxy- $\alpha$ -L-talose verestert ist. Es ist als Radikalfänger wirksamer als das als Antioxidans bekannte  $\alpha$ -Tocopherol. Zum anderen kennt man die Aestivophoenine A – C (**89** – **91**) aus *Streptomyces purpeofuscus*, die ebenfalls Radikalfängereigenschaften besitzen. Als Zuckerkomponente findet sich hier  $\alpha$ -L-Rhamnose.<sup>[156,157]</sup> Ein weiteres Rhamnosid ist das in *Streptomyces* GT 61150 gefundene 2-(1-Propen-1-yl)-4-hydroxymethyl-3-furanylcarbonyl- $\alpha$ -L-rhamno-pyranosid (**92**), das über einen gemischten Acetat-Glycerin Biosyntheseweg aufgebaut wird.<sup>[158]</sup>



A (**89**): R<sup>1</sup> = H                      R<sup>2</sup> = COPhenyl

B (**90**): R<sup>1</sup> = CH<sub>2</sub>CHC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sup>2</sup> = COPhenyl

C (**91**): R<sup>1</sup> = CH<sub>2</sub>CHC(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sup>2</sup> = H

**Abbildung 83:** 1-O-Acylglykoside aus Streptomyceten: Phenazoviridin (**88**), Aestivophoenine A – C (**89** – **91**) und das 2-(1-Propen-1-yl)-4-hydroxymethyl-3-furanylcarbonyl- $\alpha$ -L-rhamno-pyranosid (**92**).

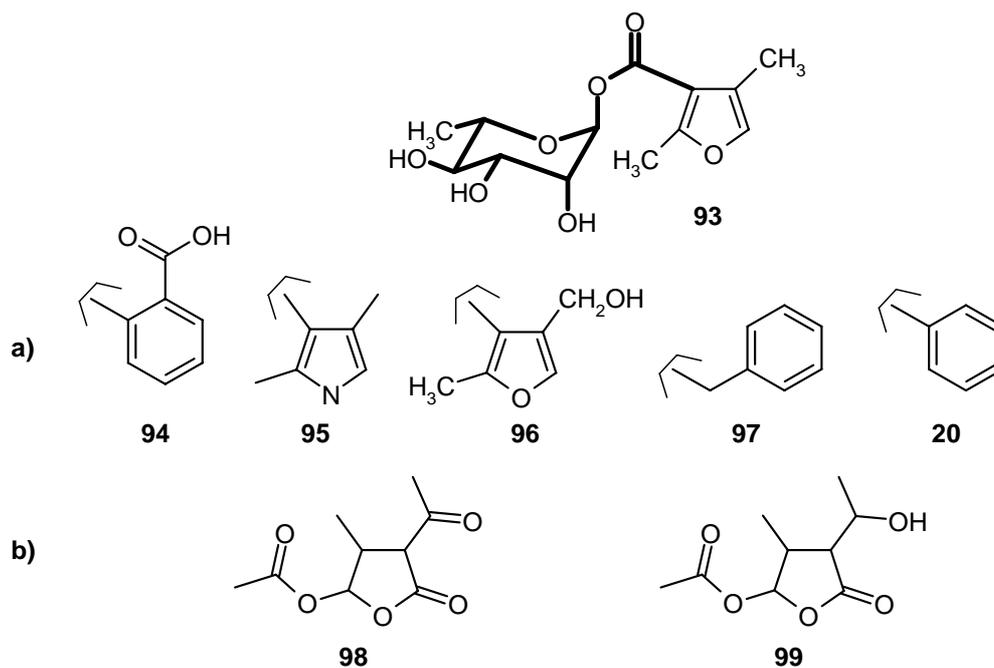
## 2. Der Produzentenstamm *Streptomyces griseoviridis* Tü 3634

Von S. GROND konnten aus Kulturextrakten von *Streptomyces griseoviridis* (Stamm Tü 3634) das mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> intensiv grün anfärbende 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**20**) isoliert werden. Die Verbindung **20** enthält eine Benzoesäure, die über eine Carboxylgruppe an  $\alpha$ -L-Rhamnose *O*-glykosidisch gebunden ist. Die Biosynthese des 6-Desoxyzuckers kann auf allgemein bekannte Stoffwechselwege zurückgeführt werden. Im Rahmen ihrer Dissertation wurde anhand von Fütterungsexperimenten mit [U-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]Glycerin ein Biosyntheseweg postuliert, der davon ausgeht, dass die Startereinheit, in diesem Falle Benzoesäure (**104**, Abbildung 89), direkt aus Shikimat hervorgeht und nicht wie bei Pflanzen gewöhnlich, über Prephenat und Phenylalanin (**105**).<sup>[45]</sup> Diese Biosynthesehypothese sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Fütterung von <sup>13</sup>C-markiertem [1,7-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Shikimat überprüft werden. Durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen sollte eine reproduzierbar hohe Ausbeute an 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnosid (**20**) erhalten werden, so dass aussichtsreiche <sup>13</sup>C-Fütterungsexperimente durchgeführt werden konnten.

### 2.1. Metabolitenspektrum des Stammes Tü 3634

Der Stamm *Streptomyces griseoviridis* Tü 3634 ist durch zahlreiche Fütterungsexperimente im Sinne der Vorläufer-dirigierten Biosynthese recht gut untersucht. Die Biosynthese der gebildeten Hauptmetabolite 2,4-Dimethyl-3-furanylcarbonyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**93**) und des Benzoylderivates (**94**) sowie die Betrachtung des Biosynthesepotentials durch spezielle Variationen der Fermentationsbedingungen waren Gegenstand bisheriger Forschung.<sup>[45]</sup>

Bei den Fütterungsexperimenten zur Vorläufer-dirigierten Biosynthese konnten eine Vielzahl von  $\alpha$ -L-Rhamnopyranosid-Derivaten erzeugt werden. Ohne Zufütterung einer stammfremden Carbonsäure erhält man allein durch Variationen des Nährmediums und der Fermentationsgefäße (und damit insbesondere die Belüftung der Kultur) sechs verschiedene  $\alpha$ -L-Rhamnopyranoside **93** – **97** und **20** (Abbildung 84). Durch Vorläufer-dirigierten Biosynthese mit dem Stamm Tü 3634 konnte die Verbindungsklasse der 1-*O*-Acylrhamnoside auf über 20 Verbindungen erweitert werden. Neben den 1-*O*-Acylrhamnosiden produziert der Stamm Tü 3634 zwei Butyrolactone **98** und **99**.<sup>[160]</sup>



**Abbildung 84:** Vom Stamm Tü 3634 natürlich gebildete  $\alpha$ -L-Rhamnopyranoside **93** – **97** und **20** und die  $\gamma$ -Butyrolactone **98** und **99**.

## 2.2. Optimierung der Fermentationsbedingungen zur Ausbeutesteigerung

Für die Durchführung von Biosyntheseuntersuchungen ist ein verlässliches Wachstum von *Streptomyces griseoviridis* Tü 3634 notwendige Voraussetzung. Deshalb mussten zuerst die Kultivierungsparameter mit dem Ziel einer größtmöglichen Produktion an 1-O-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**20**) optimiert werden. Der Stamm konnte als N<sub>2</sub>-Einlagerung aus der Stammsammlung der Abteilung A. ZEECK übernommen werden. Die N<sub>2</sub>-Einlagerung wurde auf M2<sup>+</sup>- oder Hafer-Agarplatten mit einer sterilen Impföse ausgestrichen und fünf bis sieben Tage bei 28°C inkubiert. Während dieser Zeit verfärbte sich das gut versportete Luftmycel zimtbraun. Als kurzzeitige Konservierung des Stammes wurden M2<sup>+</sup>- oder Hafer-Agarplatten gewählt, die bis zu drei Monaten bei 4°C gelagert werden konnten. Zur Langzeitkonservierung wurden N<sub>2</sub>-Einlagerungen hergestellt (B. XV1.2). Bei Streptomyceten ist eine gute Produktion von Sekundärstoffen in der Regel in Flüssigkulturen (Schüttelkolben oder Fermenter) möglich. Erkenntnisse aus der Vorläufer-dirigierten Biosynthese, die von S. GROND während ihrer Dissertation erhalten wurden, sollten helfen, die Ausbeute an 1-O-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**20**) zu steigern. S. GROND beobachtete, dass 1-O-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**20**) als natürlicher Metabolit aus Standardfermentationen in Ausbeuten von 2 – 4 mg/L produziert wurden. Überraschenderweise wurde bei Experimenten zur Vorläufer-dirigierten Biosynthese durch Zufütterung von stammfremden Carbonsäuren wie

Isophthal-, Terephthal-, 4-Hydroxy-3-nitrobenzoe- und Isodehydracetsäure auch das 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**20**) in sehr hohen Ausbeuten (5 – 8 mg/L) isoliert.<sup>[45]</sup> Deshalb wurde versucht, die Ausbeute von **20** durch Zufütterung einer stammfremden Carbonsäure während der Fermentation zu steigern, um optimale Bedingungen für die Fütterung markierter Vorläufer zu erhalten.

Die Kultivierung von Tü 3634 erfolgte im 1 L Rührblattfermenter in Hafer Nährmedium über einen Zeitraum von ca. 72 h. Die Vorläufer wurden ab der 12. Wachstumsstunde – kurz vor Beginn der Rhamnosidbildung – kontinuierlich über acht Stunden mit Hilfe einer Schlauchdosierpumpe in die Kulturbrühe gefördert. Die Carbonsäuren (7.3 mmol) wurden hierzu in 80 – 100 mL Wasser gelöst, die Lösung auf einen pH = 6.5 eingestellt und sterilfiltriert. Ebenfalls ab der 12. Inkubationsstunde wurde eine pH-Sperre von  $6.5 \pm 0.7$  eingestellt. Es wurden drei Carbonsäuren dem Stamm gefüttert, namentlich Terephthal-, Isophthal- und Vitamin C. In Tabelle 16 sind die Mengen der isolierten Reinstoffe aus den Fütterungsexperimenten zusammengefasst, die zur Ausbeutesteigerung durch die Vorläufer-dirigierte Biosynthese durchgeführt wurden.

Carbonsäure	Fütterung in g/L	Ausbeute an $\alpha$ -L-Rhamnosid ( <b>20</b> ) in mg/L
keine	-	1.4
Terephthalsäure	1.21	2.0
Isophthalsäure	1.21	2.2
Vitamin C	1.29	2.4

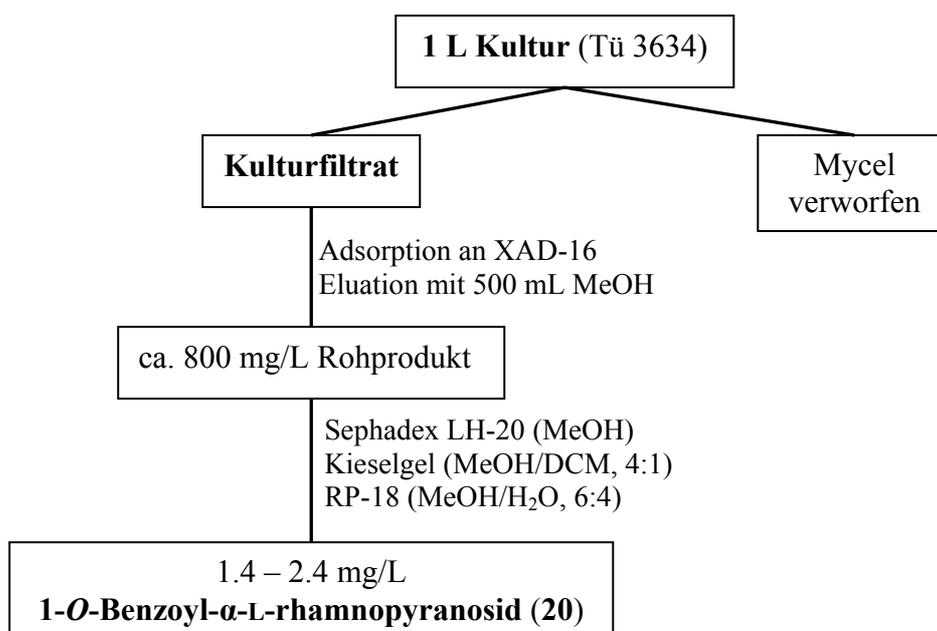
**Tabelle 16:** Zusammenfassung der Ergebnisse zur Ausbeutesteigerung von 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**20**). Als Referenz wurde die Ausbeute einer Fermentation ohne Carbonsäurezusatz von **20** mit angegeben.

Neben der Fermentation in Hafermedium wurde als zweites die Kultivierung in Medium S getestet. Dies erbrachte jedoch keinen Erfolg, obwohl der Kulturbrühe 7.3 mmol Terephthalsäure zugefüttert wurden. Es konnte kein 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**20**) nachgewiesen werden, dafür wurde das 2-Aminobenzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid in 0.9 mg/L Ausbeute isoliert. Die literaturbekannte Ausbeutesteigerung von **20** durch Zufütterung von stammfremden Carbonsäuren, konnte leider nicht in dem erwarteten Maße reproduziert werden. Dennoch wurde unter Zufütterung von Vitamin C eine leichte Ausbeutesteigerung auf 2.4 mg/L erzielt. Die im Folgenden beschriebenen Fermentationen wurden unter Zugabe von Vitamin C und DMSO (einmalig 5 mL/L in 10 mL Wasser, sterilfiltriert, 11. Inkubationsstunde) durchgeführt. DMSO wurde als Additiv zugesetzt, um die Zellwände für

die markierte Shikimisäure permeabler zu machen. Die Produktion von **20** wurde durch die Zugabe von DMSO nicht beeinträchtigt, wie in einem Referenzexperiment gezeigt wurde.

### 2.3. Aufarbeitung und Isolierung

Zur Isolierung wurde die zimtfarbene Kulturbrühe zunächst mit 0.5 M HCl bzw. 0.5 M NaOH auf pH ca. 5.0 eingestellt. Anschließend wurde die Kulturbrühe mit ausreichend Hyflocelite versetzt und das Mycel von dem Kulturfiltrat durch Filtration getrennt. Das Mycel wurde verworfen. Das Kulturfiltrat wurde an Amberlite® XAD-16 adsorbiert und mit MeOH eluiert (500 mL). Das Rohextrakt (ca. 800 mg/L) wurde an Sephadex LH-20 (MeOH), Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 4:1) und an RP-18 (MeOH/H<sub>2</sub>O, 6:4, Mitteldruck) chromatographiert.

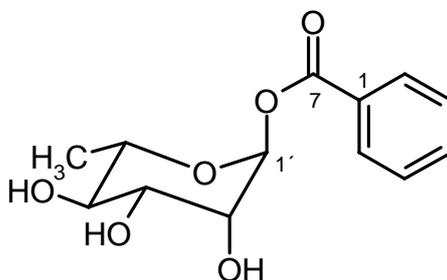


**Abbildung 85:** Schema zur Aufarbeitung und Isolierung von 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**20**).

### 3. Charakterisierung des 1-*O*- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosids

Eine charakteristische und für die Aufarbeitung hilfreiche Eigenschaft des gelben, öligen  $\alpha$ -L-Rhamnosids **20** ist die markante grüne Anfärbung mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Sprühreagenz. Gegenüber Säuren verhält sich der Naturstoff **20** labil, weshalb NMR-Analysen in CDCl<sub>3</sub> vermieden wurden. In Kulturlösung ist die Substanz bei 4°C und einem pH-Wert zwischen

4.9 und 6.8 über 10 Tage stabil. Man beobachtete gute Löslichkeit in Aceton, Methanol, Dichlormethan und Ethylacetat.



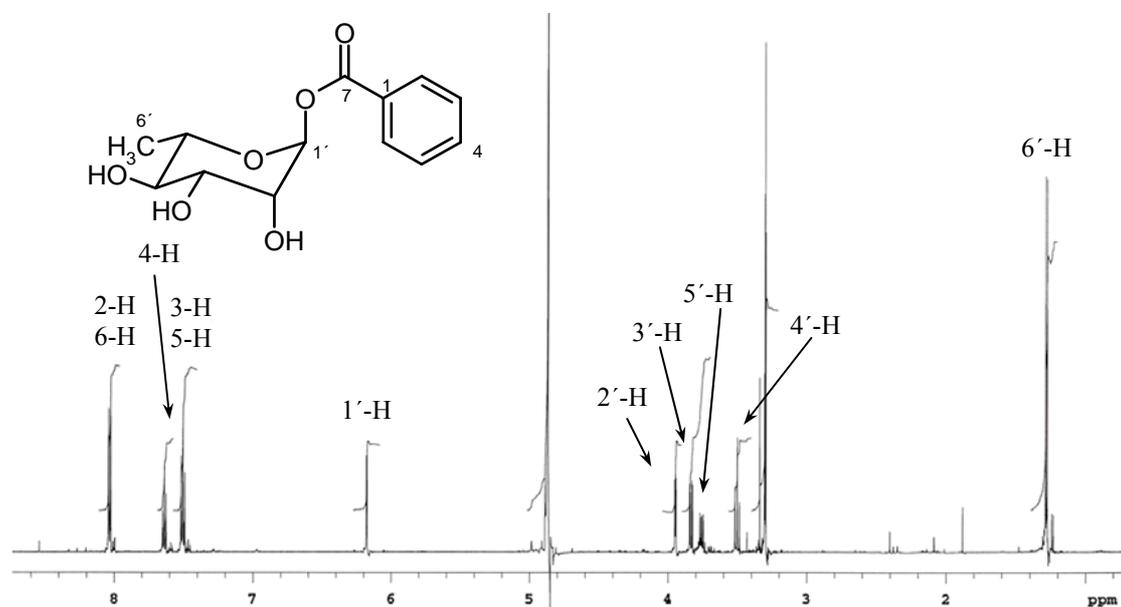
**Abbildung 86:** Struktur des 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosids (**20**).

Zur Charakterisierung des isolierten Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnosids (**20**) aus *Streptomyces griseoviridis* Tü 3634 wurden die experimentellen Daten mit den Literaturwerten<sup>[159,160]</sup> verglichen. Das DCI-Massenspektrum des reinen Naturstoffs **20** lieferte einige Fragmentpeaks mit  $m/z = 303$   $[M+NH_3+NH_4]^+$ ,  $286$   $[M+NH_4]^+$ ,  $244$   $[M-CO_2]^+$  und  $181$   $[C_6H_{11}O_5+NH_4]^+$ , aus der sich die Summenformel  $C_{13}H_{16}O_6$  und die Molmasse zu  $268$  g/mol ableiten ließ.

Die Auswertung des Infrarotspektrums belegte das Vorhandensein eines Carbonsäureesters ( $\tilde{\nu}_{\max} = 1726$   $cm^{-1}$ ) und die Existenz einiger Hydroxylgruppen ( $\tilde{\nu}_{\max} = 3384$   $cm^{-1}$  (breit)). Desweiteren wurden für den Sekundärmetaboliten charakteristische Schwingungsbanden bei  $\tilde{\nu}_{\max} = 2979, 2916, 1601, 1451, 1320$  und  $1271$   $cm^{-1}$  gefunden. Das UV-Spektrum (in MeOH) zeigte zwei für den Naturstoff **20** charakteristische Absorptionsmaxima bei  $274$  und  $230$  nm. Die  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR-Daten des  $\alpha$ -L-Rhamnosids (**20**) und die Literaturdaten<sup>[159,160]</sup> sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Ein Vergleich der experimentellen Daten mit denen aus der Literatur<sup>[159,160]</sup> (Tabelle 17) zeigte zweifelsfrei, dass 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**20**) vorliegt. Im  $^1H$ -NMR-Spektrum waren die Signale eines acylgebundenen Rhamnosebausteins mit 1'-H bei  $\delta_H = 6.18$  zu erkennen. Neben den vier Protonen einer Benzoylgruppe bei  $\delta_H = 7.50 - 8.03$  (2-H - 6-H) konnte der Zuckerbaustein mit den chemischen Verschiebungen von  $\delta_H = 3.50 - 3.95$  identifiziert werden. Das Methylsignal der  $\alpha$ -L-Rhamnose zeigte eine chemische Verschiebung von  $\delta_H = 1.28$  und wurde zu einem Dublett aufgespalten, da in Nachbarschaft eine Methingruppe stand (Abbildung 87).

C-Atom	Exp. $\delta_C$ ppm	Lit. <sup>[159,160]</sup> $\delta_C$ ppm	Exp. $\delta_H$ ppm	Lit. <sup>[159,160]</sup> $\delta_H$ ppm
1	130.9	130.5		
2	130.7	130.7	8.03 (dd, $J = 1.5, 8.0$ )	8.03 (dd, $J = 1.5, 7.5$ )
3	129.8	129.8	7.50 (dd, $J = 7.5, 8.0$ )	7.50 (dd, $J = 7.5, 7.5$ )
4	134.8	134.8	7.64 (dd, $J = 2.5, 7.5$ )	7.64 (dd, $J = 1.5, 7.5$ )
5	129.8	129.8	7.50 (dd, $J = 7.5, 8.0$ )	7.50 (dd, $J = 7.5, 7.5$ )
6	130.7	130.7	8.03 (dd, $J = 1.5, 8.0$ )	8.03 (dd, $J = 1.5, 7.5$ )
7	166.0	166.0		
1'	96.0	95.9	6.18 (d, $J = 2.0$ )	6.18 (d, $J = 1.9$ )
2'	71.3	71.2	3.95 (dd, $J = 2.0, 4.0$ )	3.97 (dd, $J = 1.9, 3.5$ )
3'	72.3	72.3	3.84 (dd, $J = 4.0, 9.5$ )	3.83 (dd, $J = 3.5, 9.5$ )
4'	73.5	73.5	3.50 (dd, $J = 9.5, 9.5$ )	3.50 (dd, $J = 9.5, 9.5$ )
5'	72.6	72.6	3.76 (dq, $J = 6.5, 9.5$ )	3.76 (dq, $J = 6.3, 9.5$ )
6'	18.1	18.1	1.28 (d, $J = 6.5$ )	1.28 (d, $J = 6.3$ )

**Tabelle 17:** Vergleich der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten des Naturstoffs **20** mit Daten aus der Literatur<sup>[159,160]</sup> (600 MHz<sup>[exp]</sup>, 500 MHz<sup>[159,160]</sup>, CD<sub>3</sub>OD). Soweit nicht anders angegeben handelt es sich bei den Kopplungen um skalare  $^3J_{(\text{H,H})}$ -Kopplungen mit [ $J$ ] = Hz.



**Abbildung 87:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosids (**20**) in CD<sub>3</sub>OD (600 MHz) gemessen.

Die im nächsten Kapitel beschriebenen Untersuchungen zur Biosynthese des 1-*O*-Acyl-rhamnosids **20** durch Fütterung einer  $^{13}\text{C}$ -markierten Verbindung haben die vorgeschlagene Struktur zusätzlich abgesichert.

## 4. Die Biosynthese des 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosids

### 4.1. Bisherige Untersuchungen zur Biosynthese

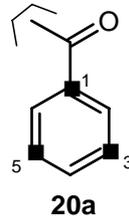
Das 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**20**), das aus *Streptomyces griseoviridis* Tü 3634 isoliert wurde, enthält eine Benzoesäure, die über eine Carboxylgruppe an  $\alpha$ -L-Rhamnose *O*-glykosidisch gebunden ist. Zum einen werden zwei intakte Glycerineinheiten über die Gluconeogenese zu Glucose verstoffwechselt, die in den Hexosephosphatpool eingespeist werden. Zum anderen können zwei nicht intakte Glycerineinheiten aus Vorläufern aus dem Pentosebisphosphatweg zu Hexasacchariden aufgebaut werden, die ebenfalls den Hexosephosphatpool speisen. Das Hauptaugenmerk sollte daher auf der Biosynthese des Aglykons **20a** liegen. Für die Biogenese des Aglykons **20a** kommt der Shikimisäureweg in Frage, was mit Hilfe von  $^{13}\text{C}$ -markierten Vorläufern belegt werden sollte.

Der Shikimisäureweg ist ein wichtiger Biosyntheseweg in Pflanzen und Bakterien zum Aufbau von Primär- und Sekundärmetaboliten. Als Primärmetaboliten werden auf diesem Weg z.B. die aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin (**102**), L-Thyrosin oder L-Tryptophan gebildet. Der Shikimisäureweg ist aber auch am Aufbau von Bausteinen der Sekundärmetabolite beteiligt, wie dem Chloramphenicol, Vancomycin oder Novobiocin aus Mikroorganismen. Genauso werden Biosynthesebausteine von Pflanzen, wie der Xanthone und Isoflavone, über ihn gebildet.<sup>[161]</sup>

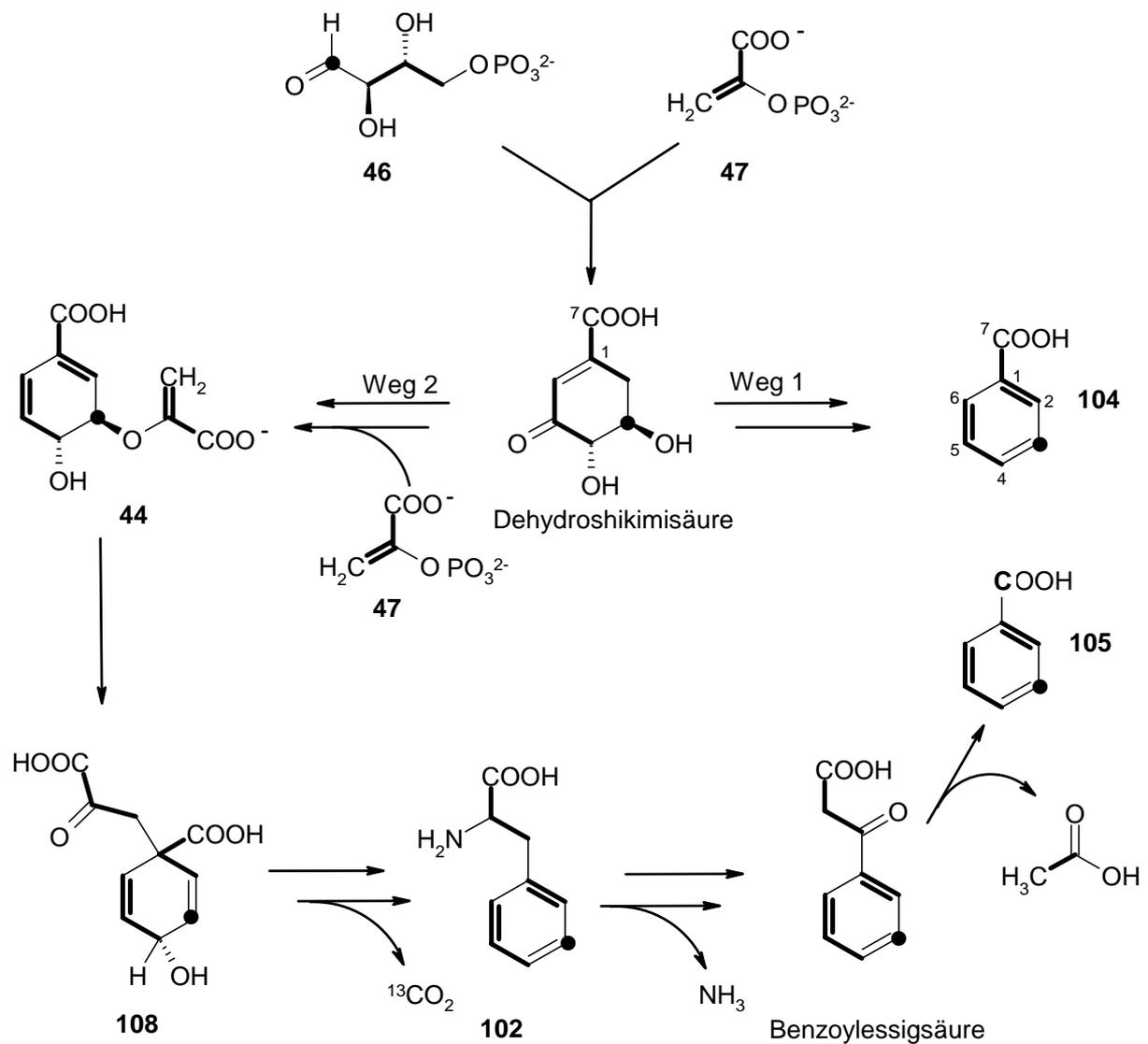
#### *Vorarbeiten zur Biogenese des 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosids*

Die im Folgenden zusammengefassten Fütterungsexperimente sind von S. GROND im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt worden.<sup>[45]</sup> Es erfolgte kein Einbau bei der Fütterung von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Natriumacetat. Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Aglykon (**20a**) von 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**20**) um ein Polyketid handelt. [ $^{13}\text{C}_6$ ]Glucose wird in die Rhamnosyleinheit inkorporiert, für das Benzoyl-Aglykon ist kein Einbau nachzuweisen, weder durch Erhöhung der Signalintensitäten noch durch das Auftauchen von  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$ -Kopplungen. Im Gegensatz dazu ist im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **20** aus einem Fütterungsexperiment mit [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ]Glycerin eine Anreicherung von formal drei

Signalen C-1, C-3 und C-5 durch Signalintensitätserhöhung zu beobachten. Wegen der chemischen Äquivalenz der Kerne C-3 und C-5 kann aus diesem Ergebnis nicht abgeleitet werden, welcher der beiden Kerne angereicht wurde.



**Abbildung 88:** Anreicherungsmuster aus dem Fütterungsexperiment mit  $[2-^{13}\text{C}]$ Glycerin im Aglykon **20a**.

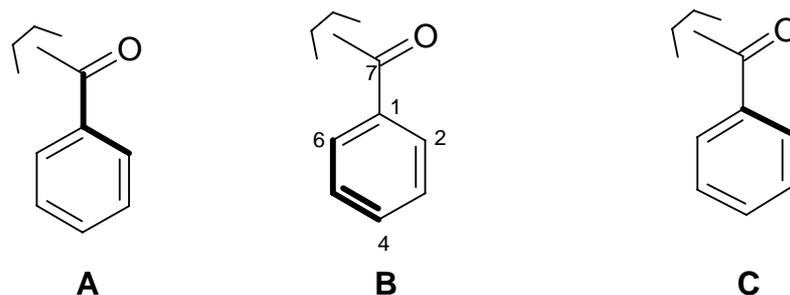


**Abbildung 89:** Postulierte Markierungsmuster des Aglykons (**104** bzw. **105**) von Rhamnosid 20 nach Fütterung von  $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]$ Glycerin zur Aufklärung des Biosyntheseweges.

Durch den fehlenden Einbau von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Acetat oder Glucose wurde vermutet, dass der Shikimisäureweg an dem Aufbau des Aglykons des 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosids (**20**) beteiligt ist. Die Biosynthese von unsubstituierten Benzoesäuren wird vor allem bei Pflanzen und Pilzen beschrieben. In ihrer Biosynthese wird die Benzoesäure als Intermediat über Shikimisäure aus Phenylalanin (**102**) gebildet. Shikimisäure selbst wird durch Kondensation von Phosphoenolpyruvat (**47**) und Erythrose-4-phosphat (**46**) gebildet.<sup>[162,163]</sup> [ $\text{U-}^{13}\text{C}_3$ ]Glycerin geht wie in Abbildung 89 gezeigt in den Biosyntheseweg der Shikimisäure ein.

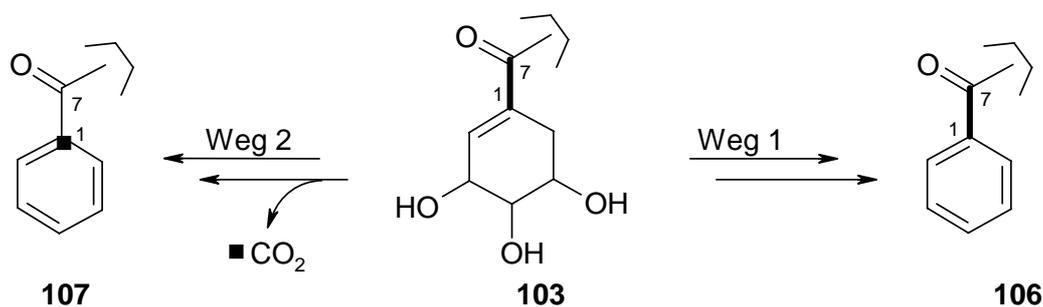
Prinzipiell sind zwei Wege zur Biosynthese des Aglykons, ausgehend von Shikimisäure denkbar (Abbildung 89). Zum einen ist der direkte Aufbau der Benzoesäure aus Shikimisäure denkbar, was nach Fütterung von [ $\text{U-}^{13}\text{C}_3$ ]Glycerin zu dem Markierungsmuster **104** führt, bei dem zwei intakte  $\text{C}_3$ -Einheiten C-7/C-1/C-2 und C-4/C-5/C-6 zu erwarten sind. Zum anderen könnte die Benzoesäure über den gewöhnlichen „plant-like“ Biosyntheseweg über Phenylalanin **102** führen und das Markierungsmuster **105** ergeben, das aus einer intakten  $\text{C}_3$ -Einheit C-4/C-5/C-6, einer  $\text{C}_2$ -Einheit C-1/C-2 und einer Anreicherung an C-7 besteht. Die Fütterung von [ $\text{U-}^{13}\text{C}_3$ ]Glycerin war notwendig, da die Fütterung von [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ]Glycerin die Unterscheidung zwischen den Biosynthesewegen nicht zulässt (Abbildung 88).

Die Fütterung von [ $\text{U-}^{13}\text{C}_3$ ]Glycerin führte zu einem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum, das teilweise komplexe Spinsysteme höherer Ordnung aufwies. Nicht alle Kopplungskonstanten für die Signale des Aglykons **20a** konnten direkt aus den Spektren bestimmt werden. Es folgte ein deduktives Vorgehen zur Unterscheidung der Einbaumuster **104** und **105** (Abbildung 89). Dabei wurde die Methode der rechnergestützten Spinsimulation zur Berechnung der Signalmuster der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von **104** und **105** verwendet. Alle möglichen Isotopomeren der einzelnen Spinsysteme wurden berechnet und mit den gemessenen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum verglichen. Zur Berechnung der Spinsysteme einzelner Isotopomere wurden die bekannten chemischen Verschiebungen und die Größen der Kopplungskonstanten benutzt. Der Vergleich von gefundenen und simulierten Kopplungsmustern der Benzoylgruppe stützte eine Interpretation der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren, nach der es drei Isotopomere geben muss, die in Abbildung 90 dargestellt wurden.



**Abbildung 90:** Markierungsmuster dreier Isotomere des Aglykons von  $\alpha$ -L-Benzoylrhamnosids (**20a**), abgeleitet aus dem Fütterungsexperiment mit  $[U-^{13}C_3]$ Glycerin.

Die eindeutige Aufklärung des Biosyntheseweges erforderte eine zweifelsfreie Zuordnung eines der Isotopomeren A oder C zum gefundenen  $^{13}C$ -Kopplungsmuster. Daher war es sinnvoll, durch ein weiteres Fütterungsexperiment mit  $[1,7-^{13}C_2]$ Shikimisäure den Biosyntheseweg des Aglykons von **20** zu klären. Die für dieses Einbauexperiment zu erwartenden Markierungsmuster sind in Abbildung 91 zusammengefasst. Der direkte Einbau (Weg 1) von Shikimisäure (**103**) würde über den intakten Einbau der  $C_2$ -Einheit C-1/C-7 und der daraus resultierenden  $^1J_{C,C}$ -Kopplung angezeigt werden (Benzoylaglykon **106**). Der Einbau der  $[1,7-^{13}C_2]$ Shikimisäure über Phenylalanin (**102**) würde im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum nur die Anreicherung an C-1 zur Folge haben, denn das  $^{13}C$ -angereicherte Kohlenstoffatom C-7 würde aufgrund einer Decarboxylierung (Abbildung 91) abgespalten werden (Benzoylaglykon **107**). Somit wäre im  $^{13}C$ -NMR-Spektrum die Anreicherung an C-1 durch Erhöhung der Intensität am Kohlenstoffatom C-1 zu beobachten.



**Abbildung 91:** Hypothetische Einbaumuster nach Fütterung  $[1,7-^{13}C_2]$ Shikimisäure zur Unterscheidung des Biosynthesewegs zum Aglykon von **20**.

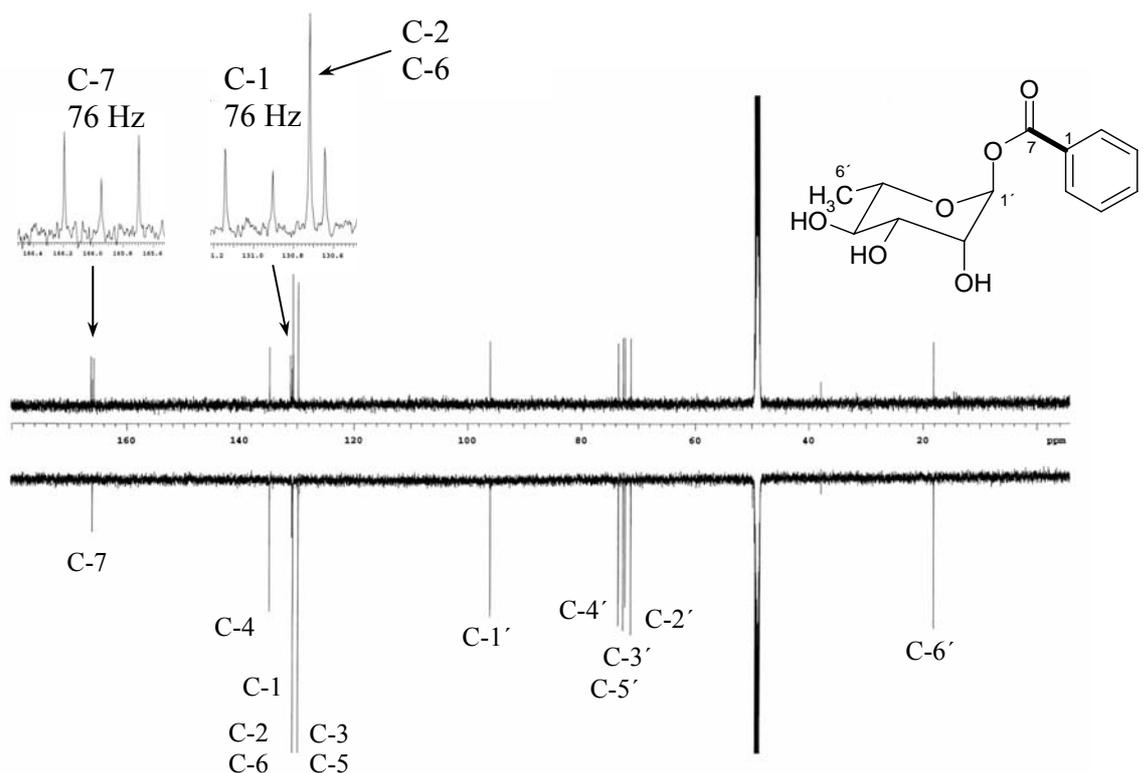
#### 4.2. Fütterungsexperiment mit [1,7-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Shikimisäure\*\*

Um die Stoffwechselverträglichkeit des Vorläufers sicherzustellen, wurden Vorversuche unternommen, in denen dem Stamm die unmarkierte Verbindung zugefüttert wurde. Es gab keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung des Sekundärstoffwechsels. Für die Biosyntheseuntersuchungen kultivierte man den Stamm Tü 3634 in einem 1 L Fermenter. Zur Erhöhung der Ausbeute an 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**20**) wurde ab der 11. Fermentationsstunde 7.3 mmol/L Vitamin C (1.29 g) über eine Schlauchdosierpumpe kontinuierlich über zehn Stunden zugegeben. Zusätzlich wurde dem Stamm DMSO (5 mL/L in 10 mL/L Wasser, sterilfiltriert) einmalig beigelegt. Die Fütterung des <sup>13</sup>C-markierten Vorläufers wurde in der 12. Wachstumsstunde begonnen und über neun Stunden aufrechterhalten. Die Fermentation wurde nach 60 Stunden beendet. Nach standardisierter Aufarbeitung (B. XV4) und Isolierung konnten 2 mg/L des 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosids (**20**) erhalten werden.

Das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum aus diesem Fütterungsexperiment zeigte neben den <sup>13</sup>C-NMR-Signalen der Verbindung **20** zwei Dubletts der Kohlenstoffsignale C-1/C-7 ( $\delta_C = 130.9, 166.0$ ), die eine Kopplungskonstante von 76 Hz aufwiesen. Da beide Kohlenstoffsignale ein Dublett von 76 Hz zeigten, konnte davon ausgegangen werden, dass ein intakter Einbau der <sup>13</sup>C-markierter Shikimisäure stattgefunden hatte und die C<sub>7</sub>-Einheit in das Benzoylaglykon **20a** eingeschleust wurde.

---

\*\* An dieser Stelle sei H. G. Floss gedankt, der mir das [1,7-<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]Shikimat für das Fütterungsexperiment zur Verfügung stellte.



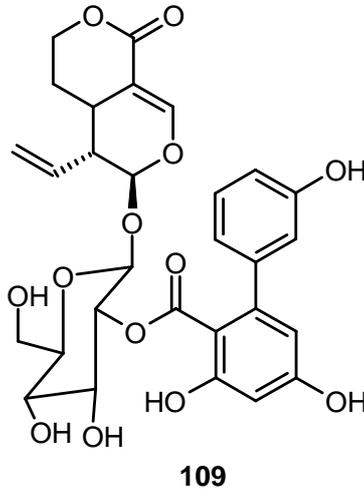
**Abbildung 92:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von 1-O-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**20**) aus dem Fütterungsexperiment mit  $[1,7\text{-}^{13}\text{C}_2]$ Shikimat (150.8 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Die  $^1J_{(\text{C},\text{O})}$ -Kopplung von C-1 und C-7 von 76 Hz ist in den Dehnungen dargestellt. Das Referenzspektrum von **20** ohne Anreicherung zeigt nach unten.

### 4.3. Diskussion

Die experimentellen Daten belegen, dass das Benzoylaglykon des  $\alpha$ -L-Rhamnopyranosids (**20**), das vom Stamm Tü 3634 gebildet wird, *de novo* aus einem Shikimat-Intermediat gebildet wird. Es wird nicht über Prephenat (**108**) und Phenylalanin (**102**) zur Benzoesäure (**105**) aufgebaut wird. Analoge Beobachtungen konnten bei Fütterungs-experimenten an Stamm- oder Wurzelkulturen von *Swertia chirata* gemacht werden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass das 3-Hydroxybenzoat von Amarogentin (**109**) aus einem Intermediat des frühen Shikimisäurewegs gebildet und nicht über Zimtsäure aufgebaut wird.<sup>[164]</sup>

Die gefundenen alternative Biosyntheseroute der Benzoesäure konnte klar von der gewöhnlichen „plant-like“ Biotransformation, die von Shikimat und Chorismat (**44**) zu Benzoat *via* Prephenat (**108**), Phenylalanin (**102**) und Zimtsäure verläuft, durch Fütterungsexperimente mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Vorläufern getrennt und nachgewiesen werden. Erst jüngst wurde zusätzlich von einer „plant-like“ Biosynthese der Benzoesäurestartereinheit von Enterocin in dem Bakterium *Streptomyces maritimus*<sup>[165]</sup> und Soraphen A in *Sorangium*

*cellulosum* berichtet, das durch Fütterungsexperimente von  $^{13}\text{C}$ - und  $^2\text{H}$ -markierten Vorläufern belegt wurde.<sup>[166,167]</sup>



**Abbildung 93:** Struktur des Aromagentin (**109**) aus *Swertia chirata*.

Die hier beschriebene alternative Route der Biosynthese eines Benzoats direkt aus Shikimat und nicht über Phenylalanin (**102**) ist für Mikroorganismen bisher in der Literatur nicht beschrieben worden und somit neu. Sie ist unter Umständen auch am Aufbau anderer Sekundärmetabolite beteiligt.

## VII Chemisch Biologisches Screening mit extremophilen Mikroorganismen

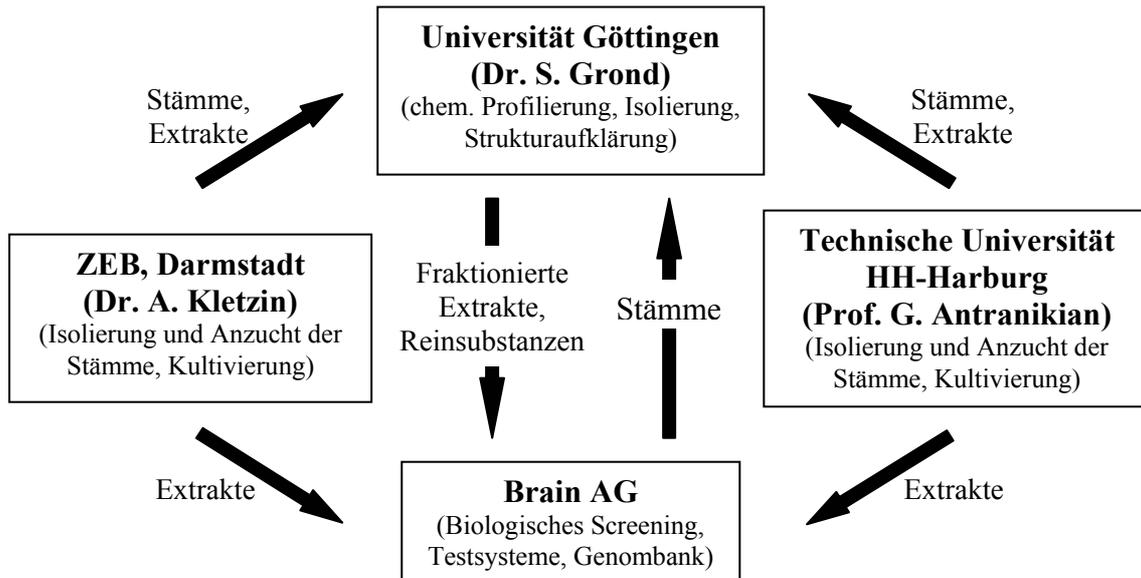
Extremophile Mikroorganismen leben in extremen Umgebungen. Sie wachsen beispielsweise bei Temperaturen von über 100°C, zeigen noch Wachstum bei einem Salzgehalt von bis zu 30% oder bei pH-Werten zwischen pH = 1 und pH = 3 sowie pH = 12 und pH = 14. Ihre Enzymausstattung ist diesen Habitaten angepasst und es können einzelne Enzyme in industriellen Verfahren als Biokatalysatoren mit hohen Anforderungen eingesetzt werden. Hier ersetzen sie herkömmliche, meist teure, langwierige und vor allem umweltschädliche Verfahren. Zugleich ermöglichen die Biokatalysatoren aus extremophilen Mikroorganismen gänzlich neue, umweltentlastende biotechnologische Herstellungsprozesse. Eingesetzt werden können sie in der Chemie- und Pharmaindustrie sowie in den Bereichen Kosmetik, Lebensmittel, Textil und Energieversorgung.

### 1. Projektbeschreibung

Der dritte Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen des DBU-Projektes „*Effiziente Produktion Neuartiger Wirkstoffe aus extremophilen Mikroorganismen durch Einsatz heterologer Expressionssysteme*“ (AZ 13142) durchgeführt. Dieses Projekt basiert auf einer Kooperation dreier Hochschularbeitsgruppen unter der Projekt-leitung der *Brain AG*. Die Projektstrukturen des DBU-Projekts sind in Abbildung 94 zusammengefasst. Ziel des Forschungsvorhabens war, aus extrem schwer kultivierbaren Mikroorganismen neue Naturstoffe auf Basis eines chemischen und biologischen Screenings zu isolieren, um an neue Leitstrukturen für die Wirkstoffforschung zu gelangen.

Das die Arbeitsgruppe S. GROND betreffende Teilprojekt C „*Wirkstoffisolierung, Validierung und Strukturaufklärung*“ hatte die Erschließung neuer Naturstoffe aus einer extremophilen Quelle mit anschließender Strukturaufklärung zum Ziel.

Die Isolate der extremophilen Mikroorganismen aus den verschiedensten Habitaten waren thermotolerante Archeaen oder Bakterien, über die der Arbeitskreis G. ANTRANIKIAN (TU Hamburg-Harburg) und die Arbeitsgruppe A. KLETZIN (Zentrum für Molekulare Evolution & Biodiversität e.V. Darmstadt, ZEB) zum Antragszeitpunkt bereits in ihren Stammsammlungen verfügten.



**Abbildung 94:** Kooperationen im Rahmen des DBU-Projekts.

Die Firma *Brain AG* übernahm das Biologische Screening. Dazu gehören genetischen Arbeiten, die die PCR-Typisierung, die Herstellung und das sequenzhomologe Screening der Genombanken einschloss. Außerdem wurden Extremophile aus der Stammsammlung der *Brain AG* in dem Projekt bearbeitet. Kultiviert wurden die Mikroorganismen, die in den Screeningansätzen durch positive Ergebnisse auffielen, in den Arbeitskreisen G. ANTRANIKIAN, S. GROND und A. KLETZIN. Die *Brain AG* übernahm die biologische Prüfung der fraktionierten Extrakte und Reinsubstanzen auf antimikrobielle Wirkung (Hefen und Bakterien) und cytotoxische Eigenschaften (CHO-, HEK293-Zellen) sowie Wirkung gegen multiresistente Keime (*Staphylococcus*). Ausgewählte, im Test auffällige, extremophile Stämme wurden in Göttingen im größeren Maßstab kultiviert. Die chemische Profilierung, die Naturstoffisolierung und die Strukturaufklärung lagen in der Hand des Arbeitskreises S. GROND in Göttingen.

Die gesammelten Daten aus dem Biologischen und Chemischen Screening wurden in eine gemeinsame Datenbank *Online SQL* der *Brain AG* eingetragen, zu der alle Kooperationspartner jederzeit Zugriff hatten.

## 2. Screening der extremophilen Mikroorganismen

### 2.1. Screeningmethoden

Die Möglichkeiten zur Entdeckung neuer Naturstoffe oder neuer pharmazeutischer Wirkstoffe sind sehr vielfältig. Das älteste Verfahren, das von S. A. WAKSMAN eingeführte Biologische Screening<sup>[168]</sup>, beruht auf Wechselwirkungen zwischen Naturstoff und Testorganismus. Diese Methode führte in den 50iger Jahren zur Entdeckung einer Reihe neuer Antibiotika wie den Tetracyclinen.<sup>[169]</sup> Nachteil dieser Methode ist, dass biologisch weniger aktive oder nur in geringer Konzentration vorhandene Substanzen oftmals unentdeckt bleiben. Mit zunehmenden Verständnis von Krankheiten auf genetischer und molekularer Ebene entwickelte sich ein Target-orientiertes Screening<sup>[170]</sup>, mit dem versucht wird, durch den Einsatz von Enzym- und Rezeptorassays auf molekulare Ursachen einzelner Krankheiten und pharmazeutische Anwendung zu testen. In der Industrie wird diese Vorgehensweise heute im Rahmen des High-Throughput-Screenings (HTS) angewandt. Dieses wird mit Robotern, die durch Einsatz von Mikrotiterplatten große Substanzbibliotheken oder zahlreiche Extraktproben in kürzester Zeit verarbeiten können, durchgeführt. Nachteilig bei diesem Ansatz ist die Abhängigkeit von bestimmten Testsystemen, deren Relevanz bei bestimmten Krankheiten keineswegs immer geklärt ist. Interessante Sekundärmetabolite, die in den Systemen, aufgrund zu geringer Wirkstoffkonzentration, nicht ansprechen, werden auf diesem Weg nicht erkannt. Zudem können durch synergistische Effekte falsch positive Ergebnisse erzielt werden, was die Auswertung zusätzlich erschwert.

Neben den biologischen, wirkungsorientierten Methoden bietet das von H. ZÄHNER<sup>171</sup> und A. ZEECK<sup>172</sup> in der Wirkstoffsuche eingeführte Chemische Screening, welches auf H. UMEZAWA<sup>173</sup> zurückgeht, die Möglichkeit, neue Sekundärstoffe allein durch chemische Reaktionen mit speziellen Reagenzien zu entdecken. Die mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennten Rohprodukte der verschiedenen Organismen werden mit verschiedenen Sprühreagenzien angefärbt, wobei sich einzelne Naturstoffe aufgrund ihrer unterschiedlichen funktionellen Gruppen durch spezifische Färbungen zu erkennen geben. Nach der Isolierung der Reinsubstanz erfolgen Strukturaufklärung, chemische Charakterisierung und biologische Testierung.

Im Chemischen Screening gehen nur wenige physikochemische Informationen zum Substanzspektrum eines Organismus verloren; dies ist auch deshalb günstig, weil selbst zunächst biologisch inaktive Substanzen noch als Leitstrukturen dienen können. Es kann

davon ausgegangen werden, dass alle Naturstoffe eine biologische Aktivität besitzen<sup>[174]</sup>, diese jedoch aufgrund des Fehlens geeigneter Testsysteme nicht immer erkannt wird.

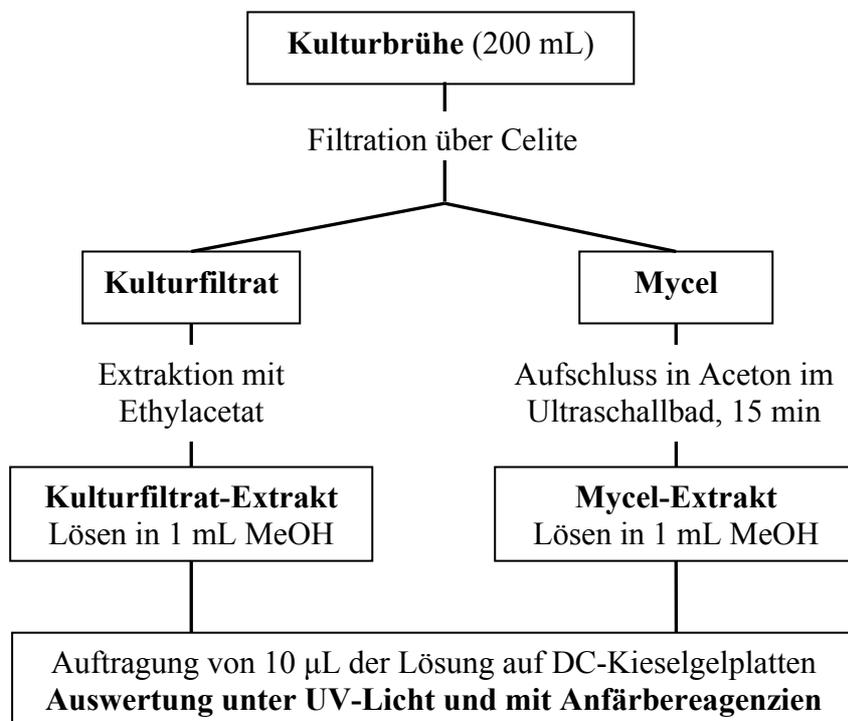
Nachteilig am Chemischen Screening sind die nur halbautomatisierte Durchführbarkeit und der hohe Anteil nicht digitalisierbarer Daten. Außerdem werden wie beim Biologischen Screening immer wieder bereits bekannte Metabolite isoliert. Um solche Substanzen bereits frühzeitig zu identifizieren, wurde das Chemische Screening zum Physikochemischen Screening, in dem die Detektion der Metabolite mit Hilfe gekoppelter HPLC-Systeme erfolgt, weiterentwickelt. Durch Einsatz von Datenbanken lassen sich bereits bekannte Metabolite anhand ihrer Retentionszeiten und physikalischen Daten frühzeitig erkennen (Dereplikation). Methodisch kommen hier die gekoppelten Methoden HPLC-DAD<sup>[175]</sup>, HPLC-MS<sup>[176]</sup> und HPLC-NMR<sup>[177]</sup> oder deren Kombination zum Einsatz.

Um die Vorteile sowohl des Biologischen als auch des Chemischen Screenings auszunutzen, wurden in den letzten Jahren kombinierte Systeme entwickelt. Bei diesen erfolgt parallel zu einer HPLC-Trennung mit physikochemischen Detektoren die biologische Testierung. Tritt eine biologische Aktivität auf, so lässt sich dieser UV- und MS-Daten zuordnen, was die gezielte Isolierung der für die Wirkung verantwortlichen Substanz erleichtert.

## **2.2. Durchführung des Chemisch-Biologischen Screenings**

Im Rahmen des DBU-Projektes wurden zehn extremophile Stämme (3-005 – 3-015) im Chemisch-Biologischen Screening bearbeitet. Die zehn Stämme stammten aus der Stammsammlung der *Brain AG*. Um die Potenz der Sekundärstoffbildung zu prüfen, wurden die extremophilen Stämme im Chemischen Screening in vier verschiedenen Medien, wie Soja-Mannit (SM), Hafer, Malz-Hefe-Glucose (M2) und Stärke-Glucose-Glycerin (SGG), in Schüttelkolben kultiviert. Im SGG-Medium stehen z. B. Glycerin, Glucose und Stärke als Kohlenstoffquellen zur Verfügung. Caseinpepton und Hefeextrakt dienen als Schwefel- und Stickstoff-Quellen. Um möglichst alle für das Wachstum lebensnotwendigen Nährstoffe bereitzustellen, wurden ausschließlich komplexe Nährmedien verwendet. Um das Problem des hohen Fettgehalts zu umgehen, das z. B. bei der Kultivierung in Hafermedium besteht, verwendet man im SM-Medium fettarmes Sojamehl, um die Produktion von Fettsäuren zu vermindern. Diese erschweren Aufarbeitung und Detektion der Metabolite. Ein weiteres Problem bei der Verwendung komplexer Nährmedien ist die mögliche Isolierung von Nährmedienbestandteilen oder deren Transformationsprodukten.

Bei der Durchführung des Screenings wurde Vorkulturen mit je 50 mL Nährmedium in einem 300 mL Erlenmeyer-Kolben mit drei Schikanen angesetzt, die mit einem Achtel einer Agarplatte angeimpft und 2 d bei 50°C und 180 rpm inkubiert wurden. Für die Hauptkultur wurden je Nährmedium zwei Kolben 3 – 4 d (je nach pH-Wert) bei 50°C und 180 rpm inkubiert. Die Hauptkulturen impfte man mit 3 mL/Kolben der Vorkultur an. Das Screening wurde mit Vor- und Hauptkultur durchgeführt um die Stabilität und die Reproduzierbarkeit der Sekundärstoffproduktion zu gewährleisten. Die Kulturbrühen wurden auf pH ~ 5.0 eingestellt und standardisiert mittels Extraktion mit Ethylacetat aufgearbeitet (Abbildung 95). Die erhaltenen Extrakte wurden jeweils in 1 mL Methanol aufgenommen und 10 µL dieser Lösung auf DC-Kieselgelplatten aufgetragen. Um ein möglichst großes Polaritätsspektrum abzudecken, entwickelte man die Kieselgelplatten in zwei verschiedenen Laufmittelsystemen. Zum einen in CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1 für die Detektion unpolarer Komponenten, zum andern in *n*-BuOH/AcOH/MeOH 4:1:5 für die polaren Komponenten. Die Analyse des Metabolitenspektrums erfolgte über visuelle Detektion unter UV-Licht (254 und 366 nm) sowie über Farbreaktionen mittels Ansprühreagenzien wie Anisaldehyd, Ehrlichs Reagenz und Orcin. So lassen sich z.B. mit Anisaldehyd Steroide und höhere Alkohole, mit Ehrlichs Reagenz Amine und mit Orcin Zucker nachweisen.<sup>[189]</sup>



**Abbildung 95:** Aufarbeitungsschema des chemischen Screenings mit extremophilen Mikroorganismen.

Neben den chemischen Nachweisverfahren wurden jeweils 5% der Extrakte bei der *Brain AG* auf ihre biologische Aktivität hin untersucht. Im Plattendiffusionstest wurde dabei unter anderem auf antimikrobielle Aktivitäten geprüft. Die Indikatororganismen, die dazu verwendet wurden, waren Hefen der Gattung *Saccaromyces*, *Pichia*, *Candida* und *Sporobolomyces* oder Bakterien wie *E. coli*, *Bacillus*, *Staphylococcus* und *Mycobacterium*. Zusätzlich wurden Kulturextrakte mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Anschließend wurden sie umgedreht auf mit Indikatororganismen angeimpfte Platten gelegt, inkubiert und ausgewertet. Alternativ besprühte man die DC-Platten direkt mit einer Suspension aus Medium und Indikatororganismus. Die Aussagekraft dieser Assays ist insofern größer, als das ein Hemmhof jetzt direkt einem Spot auf dem DC und damit einer bestimmten Fraktion des Extrakts, manchmal sogar einer bestimmten Substanz, zugeordnet werden konnte, was die spätere chemische Analyse erleichterte.

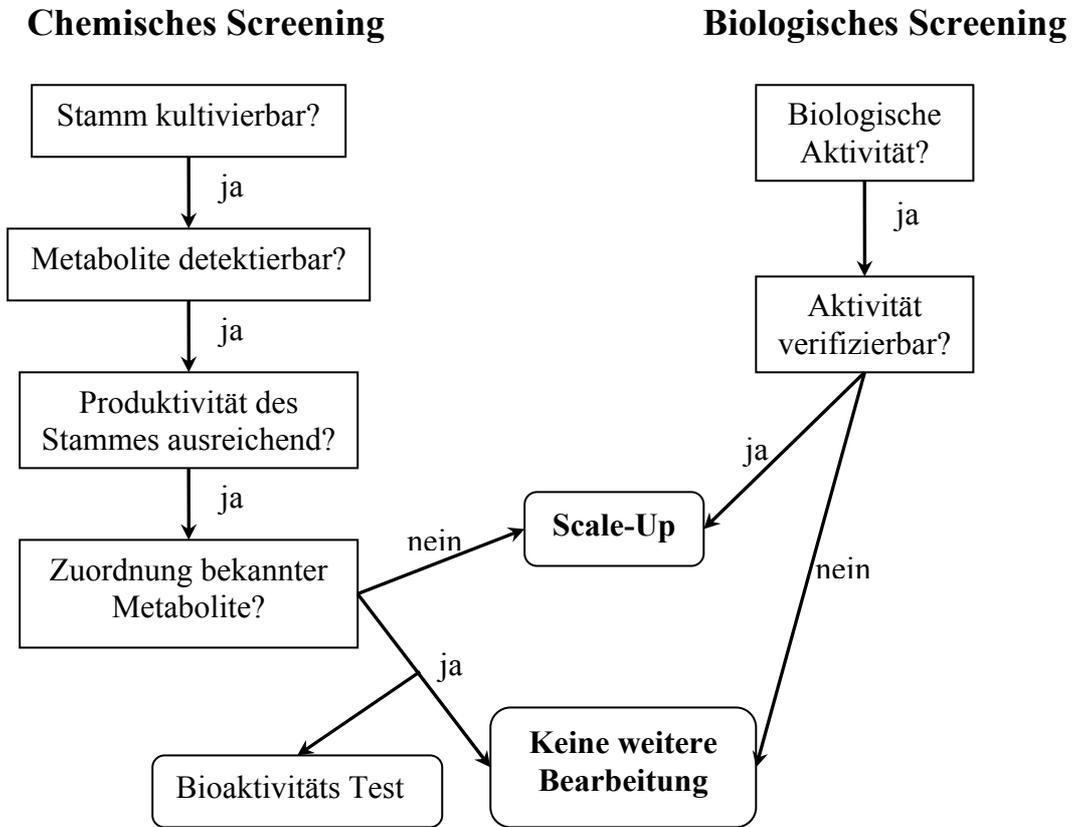
Kulturextrakte und aufgereinigte Substanzen wurden in biologischen Assays auf ihrer generelle Cytotoxizität hin geprüft. Hierbei dienten eukaryotische Zelllinien (CHO, HEK293) als sensitive Targets, deren Überlebensrate nach Inkubation mit den zu testenden Substanzen bestimmt wurde. Als Auswahlkriterium für die Aktivität einer Testsubstanz wurde eine Überlebensrate von < 5% beim Einsatz einer definierten Verdünnung festgelegt.

Die aufgereinigten Substanzen, die in den unspezifischen Overlay-Tests antimikrobielle Wirkung gezeigt hatten, wurden ferner gegen eine Auswahl multiresistenter *Staphylococcus*-Stämme getestet. Klinisch besonders interessant sind dabei Resistenzen gegen Ciprofloxacin, Amoxicillin oder Mupirocin.

Die Auswahlkriterien anhand derer entschieden wurde, ob ein extremophiler Stamm, der im Chemischen oder Biologischen Screening auffiel, im größeren Maßstab kultiviert werden sollte, sind in Abbildung 96 zusammengefasst. Im Idealfall besteht eine Kohärenz zwischen den Ergebnissen aus dem Chemischen und dem Biologischen Screening, aber auch ein positives Ergebnis aus einem der Screeningsysteme kann eine weitere Bearbeitung nach sich ziehen.

Um die isolierten Metabolite möglichst rasch in bekannte und neue Metabolite zu separieren, wurden anhand der Daten aus der NMR-Spektroskopie oder der Massenspektrometrie eine Suche in den Datenbanken „*Dictionary of Natural Products*“ (DNP, *Chapman & Hall/CRC*)<sup>[178]</sup> und „*AntiBase*“ (*Chemical Concepts*)<sup>[179]</sup> durchgeführt. Beispiele für diese Vorgehensweise sind bei der Charakterisierung der isolierten bekannten Metabolite beschrieben. Aber auch bei neuen Substanzen können Datenbanken durch die Suche nach

Aglyka oder Strukturfragmenten erste Aufschlüsse auf das Grundgerüst liefern und so die Strukturaufklärung vereinfachen.



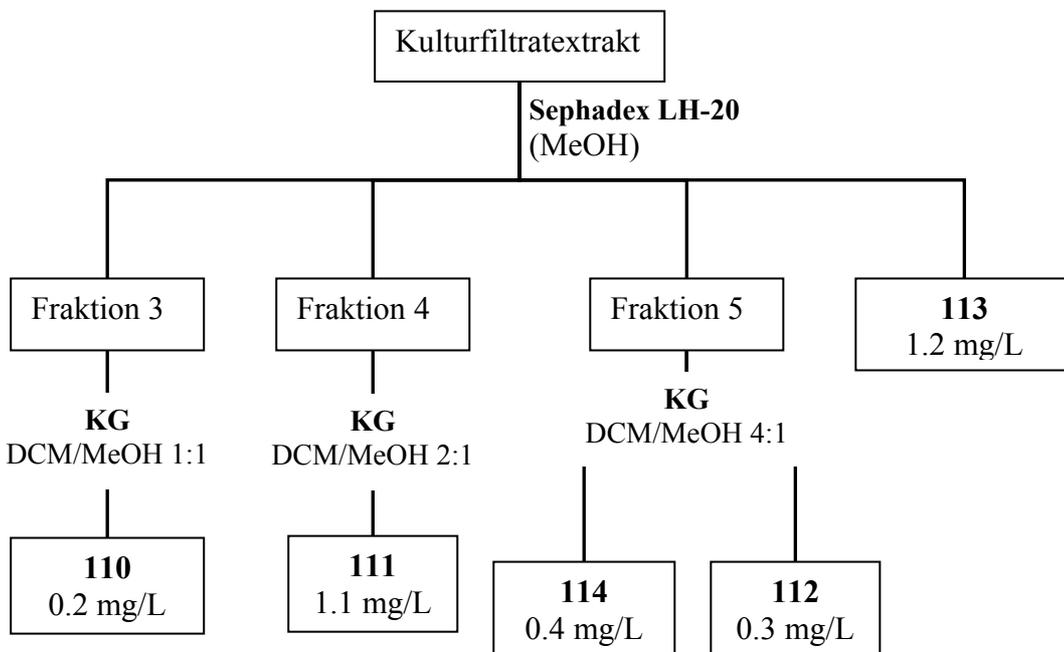
**Abbildung 96:** Auswahlkriterien für die weitere Bearbeitung von im Screening auffälligen extremophilen Mikroorganismen.

Bei der Auswertung der Chromatogramme des Chemischen Screenings fiel auf, dass das Metabolitenspektrum aller Stämme bei dem Laufmittelsystem *n*-BuOH/AcOH/MeOH 4:1:5 besser separiert war, als das Metabolitenspektrum der gleichen Stämme, die im Laufmittelsystem CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1 chromatographiert wurden. Ferner zeigten die Extrakte der Nährmedien SGG und Hafer ein reichhaltigeres Metabolitenspektrum als die Nährmedien M2 und SM. Die Dünnschichtchromatogramme, die die Extrakte der Mycele zeigten, wiesen keine chemisch interessanten Metabolite auf. Die Chromatogramme, die mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> angefärbt wurden, zeigten das vielfältigste Metabolitenmuster. So wurde jeder Stamm in jedem Nährmedium anhand seines Metabolitenspektrums bewertet und eine Scale-Up-Fermentation mit den Stämmen in dem Nährmedium durchgeführt, das sich jeweils als interessant erwies. Anschließende Isolierung der Metabolite und Aufnahme von experimentellen Daten verhalfen zur Aufklärung der Strukturen.

### 3. *Streptomyces thermonitrificans* Stamm 3-008

Der Actinomycet *Streptomyces thermonitrificans* Stamm 3-008 fiel im Chemischen Screening im SM-Medium wegen seines Metabolitenspektrums auf (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1). Das Chromatogramm ergab vier getrennte Substanzen im  $R_f$ -Bereich von 0.3 – 0.5. Es wurde ein himmelblauer anfärbbare Stoff bei einem  $R_f$ -Wert von ca. 0.5, sowie ein altrosa Spot bei ca. 0.4, eine braun anfärbbare Substanz bei etwa 0.3 und ein blaugrauer Spot bei 0.25 nach Anfärbung mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> beobachtet.

Dieses Metabolitenspektrum konnte bei einem Scale-Up auf 10 L in einem Biostat E Fermenter mit SM als Nährmedium nicht reproduziert werden. Das Mycel wurde verworfen, weil es keine Sekundärmetabolite enthielt. Aus dem Kulturfiltrat dieses Fermentationsansatzes konnte zum einen 1-Methyl-iso-inosin (**110**) und zum anderen Indol-3-Milchsäure (**111**) in Ausbeuten von 0.2 mg bzw. 1.1 mg/L isoliert werden. Neben diesen beiden Metaboliten wurden außerdem drei häufig literaturbeschriebene Metabolite (**112** – **114**) gefunden (Abbildung 100). Die Isolierung der Metabolite ist in Abbildung 97 zusammengefasst.



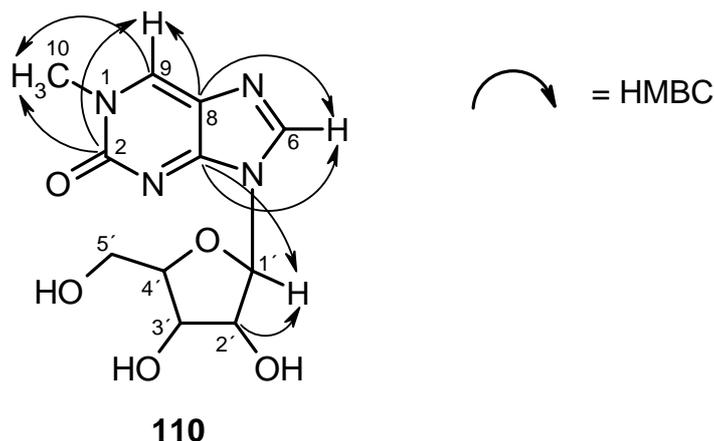
**Abbildung 97:** Flussdiagramm zur Aufarbeitung des Stammes 3-008.

### 3.1. 1-Methyl-iso-inosin (110)

Die farblose ölige Substanz (0.2 mg) wies einen  $R_f$ -Wert von 0.2 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1) und eine gelbe Anfärbbarkeit mit Anisaldehyd/ $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf. Im ESI-Massenspektrum sind zwei Signale  $m/z = 305$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  und  $587$   $[2\text{M}+\text{Na}]^+$  zu sehen. Damit ergab sich für die Verbindung eine nominelle Masse von 282. Das hochaufgelöste Massenspektrum bestätigte die Molekülmasse und es ergab eine Summenformel von  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_5$ . Dem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum waren Signale für eine Methyl-, eine Methylen-, sechs Methingruppen und drei quartäre Kohlenstoffe zu entnehmen. Im Protonenspektrum waren zwei charakteristische Methinsignale bei  $\delta_{\text{H}} = 8.29$  und  $8.32$  zu sehen, die jeweils als Singulett erschienen. Die zugehörigen Kohlenstoffatome fanden sich bei  $\delta_{\text{C}} = 149.9$  und  $141.3$ , was auf die Anwesenheit eines Stickstoff-Heterocyclus hindeutete. Desweiteren fanden sich Signale für vier Methin- ( $\delta_{\text{C}} = 72.1, 76.1, 87.5, 90.5$ ) und eine Methylen- ( $\delta_{\text{C}} = 63.0$ ), die jeweils sauerstoffsubstituiert sein sollten. Die Methylgruppe, die als Singulett im Protonenspektrum erschien ( $\delta_{\text{H}} = 3.61$  und  $\delta_{\text{C}} = 34.5$ ), ließ darauf schließen, dass es sich hier um eine heteroatomgebundene Methylgruppe handelte. Das eine der drei quartären Kohlenstoffatome konnte als Carbonylfunktionen, wegen der chemische Verschiebung von  $\delta_{\text{C}} = 158.8$  identifiziert werden. Ferner wurde eine Methingruppe mit einer chemischen Verschiebung von  $\delta_{\text{H}} = 5.99$  und  $\delta_{\text{C}} = 90.5$  in den NMR-Spektren beobachtet, die auf ein anomeres Proton eines Zuckers schließen ließen. Auf den Grundlagen dieser Daten führte die Datenbanksuche<sup>[178,179]</sup> zu Inosin, dass an N-1 methyliert ist. Die spektroskopischen Daten des Inosins sind identisch mit denen aus der Literatur. Inosin gehört zu den Nucleosiden und ist erstmals 1936 von J. GULLAND und E. HOLIDAY beschrieben worden.<sup>[180]</sup> Sein methyliertes Iso-Derivat ist bislang nur als Kristallstruktur in der Literatur beschrieben.<sup>[181]</sup>

Über ein HMBC-Experiment konnte bewiesen werden, dass **110** die Iso-Form des Inosins zugrunde liegt, bei der die Carbonylgruppe an C-2 und nicht an C-9 gebunden ist. Ausgewählte HMBC-Korrelationen sind in Abbildung 98 zusammengefasst.

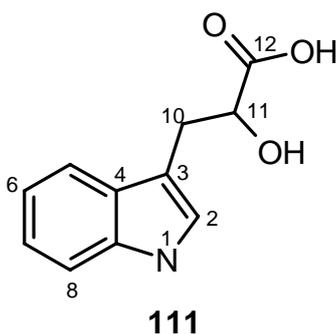
Methyl-1-iso-inosin ist als Sekundärmetabolit aus Streptomyceten bislang nicht beschrieben worden. Durch Synthese wurde die Verbindung dargestellt, die als Kristallstruktur beschrieben wurde.<sup>[181]</sup> Eine Biologische Aktivität konnte in Plattendiffusionstest nicht beobachtet werden und ist bisher nicht beschrieben worden.



**Abbildung 98:** Struktur von 1-Methyl-iso-inosin (**110**) mit ausgewählten HMBC-Korrelationen.

### 3.2. Indol-3-milchsäure (**111**)

Die farblose ölige Substanz (1.1 mg) wies in  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1 kein Laufverhalten auf, dafür zeigte sie im polaren Laufmittelsystem ( $n\text{-BuOH}/\text{AcOH}/\text{MeOH}$  4:1:5) einen  $R_f$ -Wert von 0.9. Die Verbindung zeigte eine intensiv rote Anfärbbarkeit mit Anisaldehyd/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Das ESI-Massenspektrum ergab nur in negativem Mode ein auswertbares Signal mit  $m/z = 204$  als Signal höchster Masse. Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigte neben vier aromatischen Methingruppen ( $\delta_{\text{C}} = 110 - 125$ ) auch zwei Methingruppen, die aufgrund ihrer chemischen Verschiebung von  $\delta_{\text{C}} = 74$  und  $124$ , in Nachbarschaft zu einem Heteroatom stehen sollten. Ferner konnte auf eine Carbonsäure geschlossen werden, da das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum ein quartäres Kohlenstoffatom mit der chemischen Verschiebung von  $\delta_{\text{C}} = 181.3$  aufwies. Dem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum waren ferner drei quartäre Kohlenstoffatome ( $\delta_{\text{C}} = 112.0, 129.2, 138.0$ ) und eine Methylengruppe ( $\delta_{\text{C}} = 32.2$ ) zu entnehmen. Die Datenbanksuche einer Verbindung mit elf Kohlenstoffatomen und der Annahme, dass die Molekülmasse 205 entspräche, führte in *AntiBase*<sup>[179]</sup> zu der Struktur von Indol-3-milchsäure (**111**) mit der Summenformel  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_3$  (Abbildung 99). Da für **111** bei einer Literaturrecherche keine spektroskopischen Daten gefunden wurden, wurden NMR-spektroskopische Daten des Ethylester-Derivates<sup>[182]</sup> zur Aufklärung herangezogen. Die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten der Literaturverbindung stimmen gut mit den gefundenen überein. Indol-3-milchsäure (**111**) wurde als erstes 1911 von F. EHRLICH und K. JACOBSEN beschrieben, die feststellten, dass die Verbindung aus Tryptophan gebildet wird, das durch eine Hefe (*Oidium lactis*) verdaut wird.<sup>[183,184]</sup> Für **111** ist eine antifungische Aktivität gegen *Candida albicans*<sup>[179]</sup> beschrieben, die in Plattendiffusionstests nicht nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 99:** Struktur von Indol-3-milchsäure (**111**).

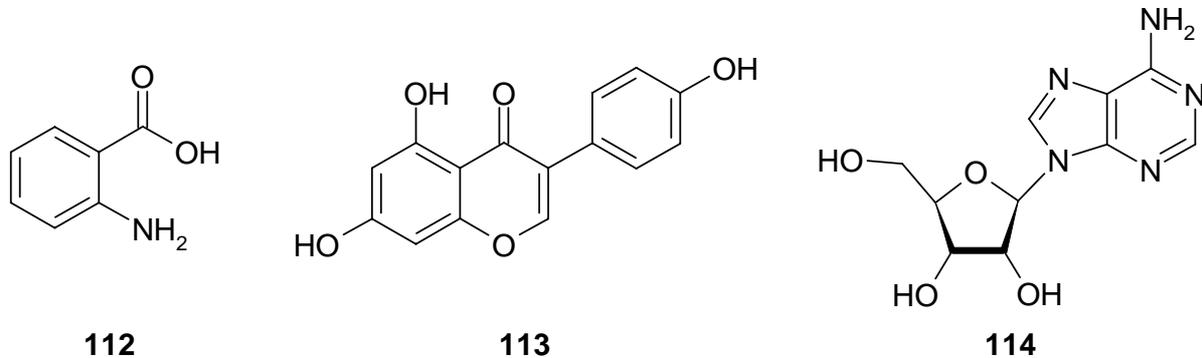
### 3.3. Bekannte Metabolite

Aus dem Fermentationsansatz konnten drei bekannt Metabolite isoliert werden. Anthranilsäure (**112**) (0.3 mg) hat eine intensiv gelbe Anfärbbarkeit mit Ehrlichs Reagenz und einen  $R_f$ -Wert von 0.3 ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1). Das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigte vier aromatische Kohlenstoffatome bei  $\delta_{\text{C}} = 115 - 135$  und ein quartäres C-Atom bei  $\delta_{\text{C}} = 173$ , das einer Carbonsäure zugeordnet werden konnte. Ferner bestätigte das EI-Massenspektrum die Molekülmasse von 137 g/mol als  $[\text{M}]^+$  mit der Summenformel von  $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2$ . Anthranilsäure (**112**) ist als aromatische Carbonsäure im Shikimisäure-Biosyntheseweg als Vorläufer von Tryptophan bekannt.

Genistein (**113**) (1.2 mg) als Vertreter der Isoflavonoide konnte anhand des EI-Massenspektrums und der  $^1\text{H}$ -NMR-Daten identifiziert werden. Die sechs aromatischen Protonen  $\delta_{\text{H}} = 6.0 - 7.4$ , das aliphatische Proton bei  $\delta_{\text{H}} = 3.3$  und die Molekülmasse von 270  $[\text{M}]^+$  bestätigten das Vorliegen von Genistein (**113**). Genistein (**113**) ist das wichtigste Isoflavonoid in Soja und somit ein Bestandteil des Nährmediums (Soja-Mannit) in dem der Stamm 3-008 kultiviert wurde. Genistein (**113**) kann östrogene Wirkungen haben, aber auch Prozesse innerhalb der Krebsbildung (Angiogenese) hemmen und krebsfördernde Enzyme blockieren. Dieses Isoflavonoid hat außerdem antioxidative Wirkungen und regt im Immunsystem die natürlichen Killer-Lymphozyten an.<sup>[185]</sup>

Es konnte Adenosin (**114**) (0.4 mg) isoliert werden. Die Summenformel lautet  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$ . Das ESI-Massenspektrum gibt ein Signal höchster Masse mit  $m/z = 801$  für  $[3\text{M}]^+$  an. Adenosin (**114**) ist das bei weitem wichtigste Nukleosid, weil es nicht nur in den Polynukleotiden DNA und RNA vorkommt, sondern als freies Triphosphat (ATP) den universellen Energieüberträger der Zelle bildet. Es ist außerdem Teil vieler wichtiger

Coenzyme, sowie einiger Antibiotika und Vitamine. Chemisch baut sich das Adenosin aus der Base Adenin und dem Zucker Ribose, bzw. 2'-Desoxyribose auf.<sup>[186]</sup>



**Abbildung 100:** Drei bekannte Vertreter aus Streptomyceten: Anthranilsäure (**112**), Genistein (**113**) und Adenosin (**114**).

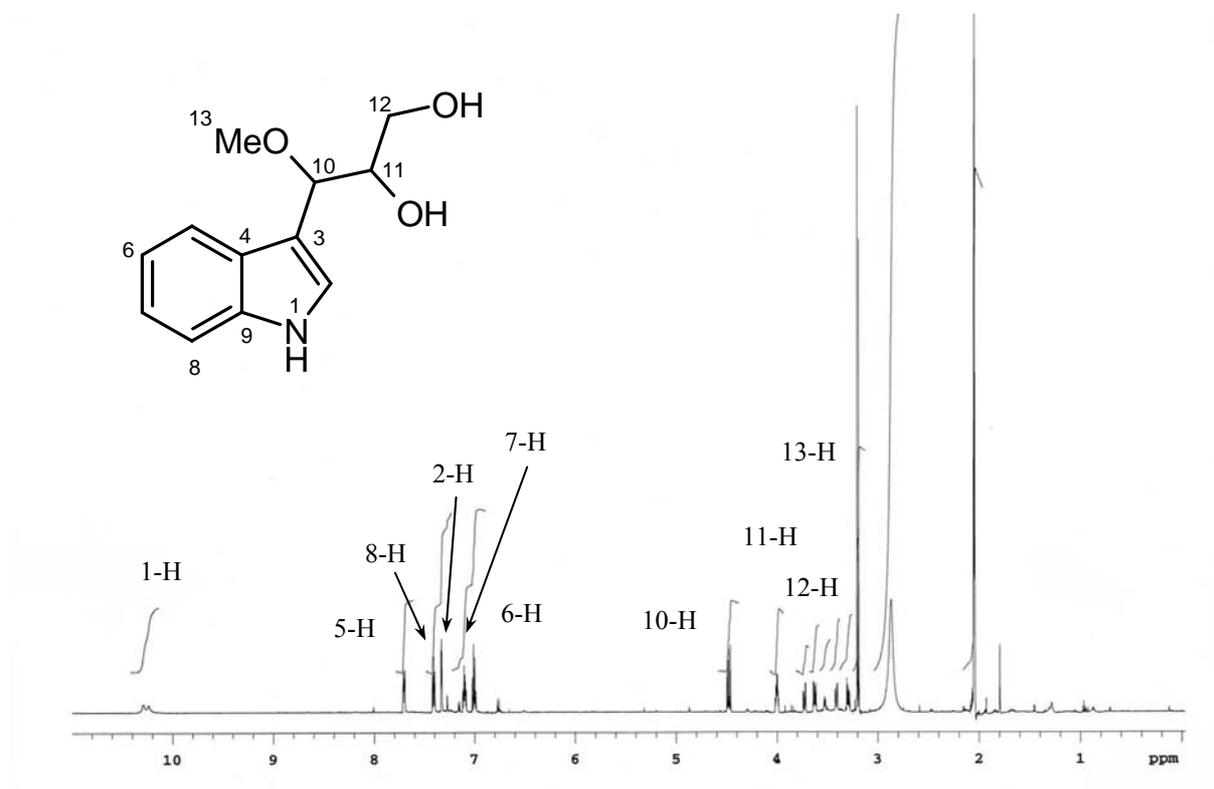
#### 4. *Saccharomonospora* sp. Stamm 3-009

Der Stamm *Saccharomonospora* sp. 3-009 fiel im chemischen Screenings wegen zweier im Dünnschichtchromatogramm mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tief violett anfärbenden Verbindungen auf. Ferner bildete der Stamm in allen vier Nährmedien, die schon im Stamm 3-008 beobachtete Anthranilsäure. Das 10 L Scale-Up (Hafer) wurde bei der *Brain AG* durchgeführt. Aus dem Kulturfiltrat dieses Fermentationsansatzes konnte 3-Indol-10-methoxypropan-11,12-diol (**115**) und 4-Hydroxyphenylelessigsäure (**116**) in Ausbeuten von 1.0 mg bzw. 0.4 mg/L isoliert werden. Zusätzlich wurde im biologischen Screening eine extrem cytotoxische Fraktion verifiziert, deren aktive Komponente aber bislang nicht isoliert werden konnte. Sie zeigte auf dem Dünnschichtchromatogramm kein spezifisches Anfärbeverhalten.

##### 4.1. 3-(2,3-Dihydroxy-1-methoxypropyl)-indol (**115**)

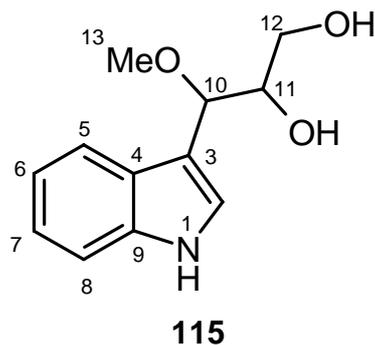
Die gelblich ölige Verbindung wies in CHCl<sub>3</sub>/MeOH 9:1 einen *R<sub>f</sub>*-Wert von 0.6 auf. Durch das Anfärben mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> erhielt man einen braunen Spot. Das ESI-Massenspektrum zeigte zwei Peaks mit *m/z* = 244 für [M+Na]<sup>+</sup> und 465 für [2M+Na]<sup>+</sup>, dessen Hochauflösung zu der Summenformel C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub> und der Molekülmasse von 221.26 führte. Das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum zeigte neben vier aromatischen Methingruppen auch drei Methingruppen, die in Nachbarschaft zu einem Heteroatom lagen. Dem <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum waren ferner drei quartäre Kohlenstoffatome, eine Methylengruppe und eine

heteroatomgebundene Methylgruppe zu entnehmen. Der Vergleich der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren der isolierten Verbindung mit den NMR-Spektren der 3-Indolmilchsäure (**111**) zeigte, dass es sich bei dieser Verbindung um ein in drei Position substituiertes Indolgerüst handeln musste.



**Abbildung 101:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des 3-(2,3-Dihydroxy-1-methoxypropyl)-indol (**115**) in Aceton- $\text{d}_6$  (600 MHz) gemessen.

Die Struktur des Substituenten ergab sich aus der Auswertung der verbleibenden Signale. Anhand der chemischen Verschiebungen der zwei restlichen Methingruppen  $\delta_{\text{H}} = 4.03, 4.51$  und  $\delta_{\text{C}} = 75.5, 80.3$  war zu erkennen, dass sie sich in der Nachbarschaft von Heteroatomen und damit Sauerstoff befinden mussten. Ebenso konnte die Methylengruppe mit ihrer chemischen Verschiebung von  $\delta_{\text{H}} = 3.62, 3.74$  und  $\delta_{\text{C}} = 64.7$  in Nachbarschaft zu Sauerstoff stehend, angesehen werden. Die chemische Verschiebung einer Methylgruppe mit  $\delta_{\text{H}} = 3.22$  und  $\delta_{\text{C}} = 56.7$  wurde einer Methoxygruppe zugeordnet (Abbildung 101). Die Konnektivitäten zwischen den protonen tragenden Gruppen des Substituenten wurde durch die Auswertung eines COSY-Spektrums erfasst. Sie zeigten, dass es sich um ein 1-Methoxypropan-2,3-diol (**115**) als Substituent handelt, das an C-3 des Indols gebunden war (Abbildung 102).

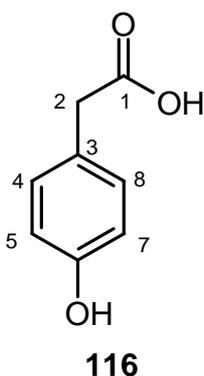


**Abbildung 102:** Struktur 3-(2,3-Dihydroxy-1-methoxypropyl)-indol (**115**) aus *Saccharomonospora* sp. Stamm 3-009.

Eine Suche nach 3-(2,3-Dihydroxy-1-methoxypropyl)-indol (**115**) in den Datenbanken *AntiBase*<sup>[179]</sup> und Chapman & Hall<sup>[178]</sup> ergab keinen Treffer. Auch in *Scifinder*<sup>[187]</sup> ließ sich kein Treffer erzielen. Demnach ist dieses Indolderivat mit dem 2,3-Dihydroxy-1-methoxypropan als Substituent an drei Position nicht literaturbekannt und somit neu. Eine Biologische Aktivität konnte in Plattendiffusionstest nicht beobachtet werden.

#### 4.2. 4-Hydroxyphenylelessigsäure (**116**)

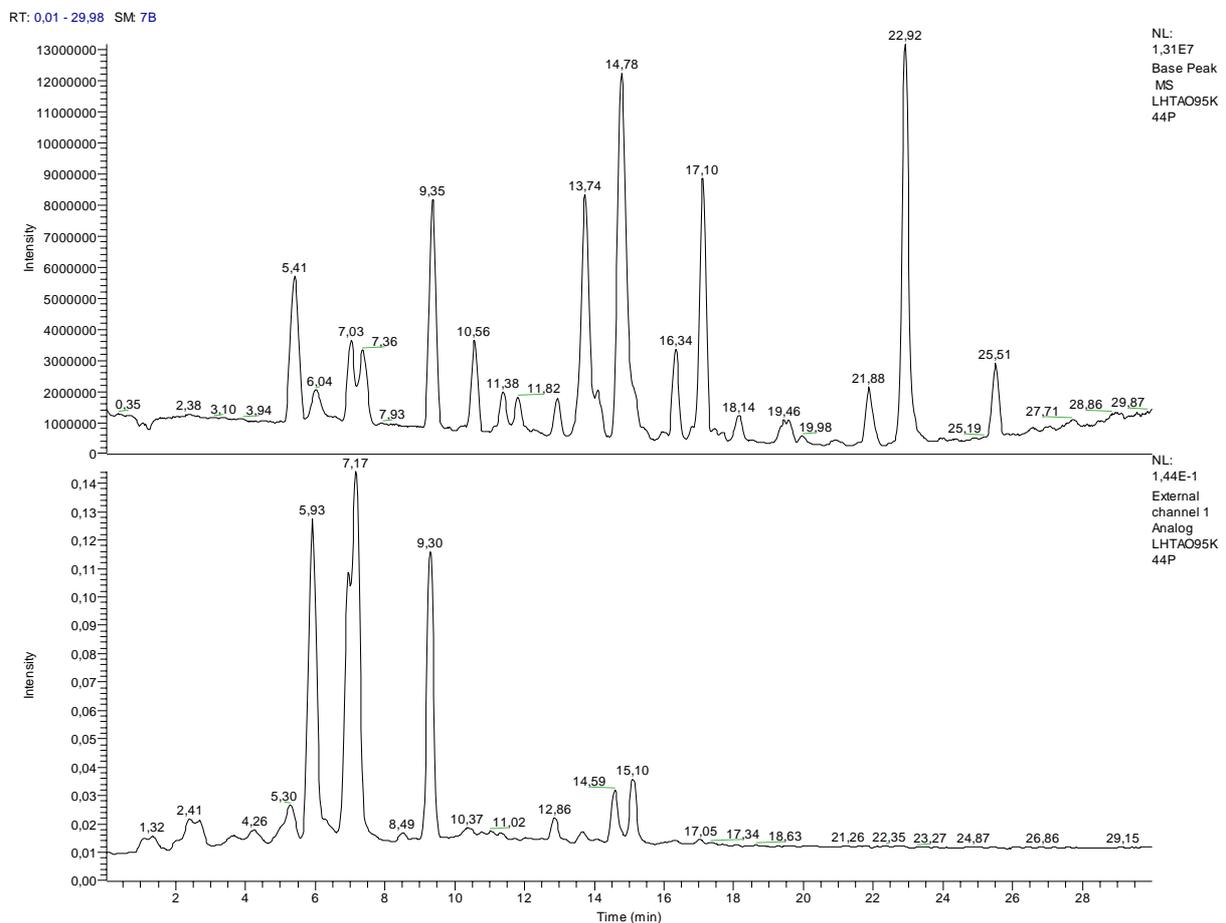
Das EI-Massenspektrum des farblosen Naturstoffes **116** zeigte bei  $m/z = 152$  den Peak höchster Masse, dessen Hochauflösung zu der Summenformel  $C_8H_8O_3$  führte. Im  $^1H$ -NMR-Spektrum traten Signale für einen 1,4-substituierten Aromaten ( $\delta_H = 6.70, 7.06$ ) und eine Methylengruppe in  $\beta$ -Stellung zu Sauerstoff ( $\delta_H = 3.22$ ) auf. Dem  $^{13}C$ -NMR-Spektrum war ein Signal für eine Carbonsäure zu entnehmen ( $\delta_C = 180.5$ ). Die Suche in *AntiBase*<sup>[179]</sup> führte zu *p*-Hydroxyphenylelessigsäure (**116**), dessen spektroskopische Daten gut mit den Literaturdaten übereinstimmen.<sup>[188]</sup>



**Abbildung 103:** Struktur der *p*-Hydroxyphenylelessigsäure (**116**) aus *Saccharomonospora* sp. Stamm 3-009.

### 4.3. Cytotoxische Substanz

Das Rohprodukt des Kulturfiltrates (1.6 g) wurde an Sephadex LH-20 (MeOH) in sechs Fraktionen aufgetrennt und von der *Brain AG* auf cytotoxische Aktivität getestet. Die vierte Fraktion des Rohproduktextraktes zeigte eine starke cytotoxische Aktivität. Weitere chromatographische Auftrennung der Fraktion 4 an Kieselgel (Cyclohexan/Essigester/Methanol 5:10:2) ergab sieben Fraktionen, die erneut auf ihre Aktivität getestet wurden. Die vierte Fraktion zeigte weiterhin eine hohe cytotoxische Wirkung, wurde jedoch aufgrund der geringen Masse (3.5 mg) nicht weiter aufgereinigt. Eine Analyse mit der HPLC-MS (HPLC 3, Säule 2, Programm 2) zeigte, dass sich in der Fraktion 4 sechs Hauptmetabolite befanden, die Massen von  $m/z = 140$  bis 250 aufwiesen (Abbildung 104).



**Abbildung 104:** HPLC-MS-Chromatogramm der cytotoxischen Fraktion. HPLC-Lauf (oben), UV-Lauf bei 254 nm (unten).

So wurde von der Firma *Brain AG* erneut eine Fermentation im 10 L Maßstab durchgeführt. Die starke cytotoxische Aktivität konnte bestätigt werden. Die Arbeiten sind soweit fortgeschritten, dass die cytotoxische Aktivität nach der Rohproduktsäule (~ 300 mg) zwei

verschiedenen Fraktionen zugeordnet werden konnte. Da die Substanz auf dem Dünnschichtchromatogramm keine Färbung ergibt, müssen weitere Trennungen an der HPLC erfolgen, die bislang nicht durchgeführt werden konnten.

### **5. *Streptomyces thermoviolaceus* Stamm 3-006**

Der Stamm *Streptomyces thermoviolaceus* 3-006 wurde aufgrund seines sehr reichhaltigen und mit Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bunt anfärbenden Metabolitenspektrum ausgewählt. Es wurde ein Scale-Up in dem Nährmedium SGG im 10 L Maßstab gemacht. Neben Adenosin (**114**) und Polypropylenglykol, Entschäumer (NIAX), konnten keine weiteren Naturstoffe isoliert werden. Das Problem war, dass die Massen an Metabolite alle < 1 mg waren, so dass keine saubere Isolierung möglich gewesen wäre. Das Metabolitenspektrum war anscheinend zu reichhaltig, so dass keine Hauptmetaboliten außer Adenosin (**114**) identifiziert werden konnten.

### **6. Diskussion und Ausblick**

Im Rahmen des DBU-Verbundprojektes sollten extremophile Mikroorganismen als Quelle neuer Naturstoffe erschlossen werden. Obwohl in den vergangenen 15 Jahren eine Vielzahl von Studien erschienen, die die Isolierung und Charakterisierung von biotechnologisch anwendbaren Exoenzymen wie Amylasen, Proteasen und Lipasen zum Inhalt hatten, ist das Sekundärmetabolitenspektrum extremophiler Mikroorganismen immer noch weitestgehend unaufgeklärt. Man erwartete Metabolite mit neuen und ungewöhnlichen Strukturen, die durch auffällige biologische Wirkungen zu neuen Leitstrukturen führen.

Von den zehn extremophilen Stämmen, die dem Screening unterzogen wurden, fielen zwei im Chemischen Screening durch ihr Verhalten in der Dünnschichtchromatographie auf (3-006 und 3-008). Nur ein Stamm (3-009) zeigte eine stark cytotoxische Aktivität. Leider konnte der Stamm 3-009 im Chemischen Screening nicht als interessant eingestuft werden, so dass die Ergebnisse aus Biologischem und Chemischem Screening nicht konform waren. Positiv anzumerken ist, dass alle extremophilen Mikroorganismen auf komplexen Nährmedien unter „Göttinger Bedingungen“ kultiviert werden konnten. Es wurden sieben Verbindungen isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt, davon waren sechs Verbindungen literaturbekannt. Das isolierte 3-(2,3-Dihydroxy-1-methoxypropyl)-indol (**115**) ist in den Datenbanken nicht verzeichnet und ist somit als neues Indolderivat einzustufen. In den Plattendiffusionstests

zeigten alle sieben Substanzen keine Aktivität. Auf Grundlage des bisherigen Projektstandes ist festzustellen, dass bisher keine neuen für die Wirkstoffsuche interessanten Leitstrukturen isoliert werden konnten. Dennoch sollte überdacht werden, ob nicht auch ein synthetisches Medium in das chemische Screening eingeschlossen werden sollte, um einen Vergleich zu haben, wie die extremophilen Stämme auf diese Medien reagieren. In den synthetischen Medien ist kein Fett enthalten, was fälschlich positive Ergebnisse durch aktive Fettsäuren im Biologischen Screening ausschließen würde und die Aufarbeitung der Extrakte erleichterte.

Ein wiederkehrendes Problem bei der Suche nach neuen Naturstoffen ist die Reisolierung bereits bekannter Substanzen. So wurden auch in diesem Projekt aus verschiedenen extremophilen Mikroorganismen literaturbekannte Sekundärmetabolite isoliert. Diese konnten durch den Einsatz von Naturstoffdatenbanken wie „*Dictionary of Natural Products*“ (DNP, *Chapman & Hall/CRC*)<sup>[178]</sup> und *Antibase (Chemical Concepts)*<sup>[179]</sup> recht schnell identifiziert werden, mussten jedoch vorher mit einigem Aufwand aufgereinigt werden, um für die Datenbankrecherche belastbare Strukturdaten zu gewinnen. Die Identifizierung bekannter Substanzen aus Extrakten ist z. B. mit Hilfe einer HPLC-UV-MS-Kopplung möglich. Dazu müssten jedoch zunächst Datenbanken angelegt werden, die einen großen Teil der bekannten ca. 30'000 mikrobiellen Sekundärmetabolite enthalten. Durch Vergleich und Kombination von Retentionszeiten, UV-Spektren, Molmassen und Fragmentierungsmustern könnten bekannte Substanzen schneller identifiziert werden. Dazu müssten die Rohextrakte jedoch einem vorgeschalteten Reinigungsschritt unterzogen werden, weil je nach Stamm und Medium unterschiedliche Anteile lipophiler und hydrophiler Begleitsubstanzen die Trennergebnisse und Daten verfälschen können. Sofern man an eine Automatisierung der Screening- und Identifizierungsprogramme denkt, müssen alle Teilschritte sorgfältig validiert werden.



## VIII Zusammenfassung der Ergebnisse

### 1. Strukturzuordnung und Biosynthese des Collinolactons

- 1) Durch Optimierung der Fermentationsbedingungen konnte das Collinolacton (**7**) aus dem Stamm Gö 40/10 und Tü 1892 in reproduzierbaren Mengen von 11 mg/L isoliert werden. Im Vergleich zu Vorarbeiten (0.25 mg/L), konnte die Ausbeute um das 44-fache gesteigert werden. Hierbei brachte vor allem die Fermentation im Airlift-Fermenter (SM, 28°C) bei 5 bar Überdruck unter Zugabe von Amberlite® XAD-2 eine sprunghafte Erhöhung der Ausbeute.
- 2) Die Optimierung der Aufarbeitung über Ethylacetat-Extraktion und Aufreinigung über Kieselgel- und RP-Chromatographie ließ eine verlässliche Isolierung des Collinolactons (**7**) aus der Fermentationsbrühe zu. Collinolacton-Derivate für den biologischen Test wurden präparativ an der HPLC aufgereinigt.
- 3) Die Konstitution des *anti*-Collinolactons (**7<sub>anti</sub>**) konnte anhand von 1 D-, 2 D-NMR- und Massenspektren (ESI und HR-ESI) und mittels UV- und IR-Daten sowie dem Drehwert unter Vergleich mit Literaturdaten<sup>[44]</sup> eindeutig bewiesen werden.
- 4) Durch Wechsel des NMR-Lösungsmittel zu C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> für die 1 D- und 2 D-NMR-Spektroskopie konnte die Struktur der Minderkomponente *syn*-Collinolacton (**7<sub>syn</sub>**) erstmals zweifelsfrei beschrieben werden. Somit wurde der Strukturvorschlag von H.-J. SCHIEWE, der eine *E/Z*-Isomerie für das Collinolacton (**7**) vorschlug, revidiert.
- 5) Durch 1 D- und 2 D-NOESY-Experimente, temperaturabhängige <sup>1</sup>H-NMR-Messungen und quantenchemische Berechnungen von <sup>13</sup>C-NMR-Verschiebungen der Collinolacton-Isomeren und -Rotameren konnte gezeigt werden, dass *anti*- und *syn*-Collinolacton (**7**) die gleiche relative Stereokonfiguration aufweisen. Demnach handelt es sich bei Collinolacton um eine einheitliche Verbindung, bei der **7<sub>syn</sub>** via Rotation des Fragmentes C15/C14/C19 um die Bindungen C13a/C14 und C15/C15a mit **7<sub>anti</sub>** in einem dynamischen Gleichgewicht steht (Abbildung 31). Das Collinolacton (**7**) liegt als *anti/syn*-Konformerengemisch in Bezug auf C-19 und C-16 in einem Verhältnis von 4:1 bei 25°C vor.
- 6) Die Biogenese aller Kohlenstoffatome konnte in Vorarbeiten von H.-J. SCHIEWE durch Fütterung von <sup>13</sup>C-markierten Vorläufern geklärt werden. Collinolacton (**7**) wird aus drei Propionateinheiten und sechs Acetateinheiten aufgebaut. Die Biogenese des 1-O-

Atoms aus Luftsauerstoff konnte durch Fermentationen des Stammes Tü 1892 unter  $^{18}\text{O}_2$ -angereicherter Atmosphäre aufgeklärt werden.

- 7) Ein hypothetischer Biosyntheseweg für das Collinolacton (**7**) wurde unter Berücksichtigung aller Fütterungsexperimente aufgestellt. Demnach verläuft die Biosynthese über die Bildung eines Nonaketids *via* PKS I beginnend mit Propionat. Nach Lactonisierung postulieren wir den Aufbau des tricyclischen Cyclodecatriens durch konzertierte [6+4]Cycloaddition und die oxidative Ringerweiterung durch Einbau von Luftsauerstoff mit Hilfe einer Baeyer-Villiger-Monooxygenase.

## 2. Derivatisierungen des Collinolactons

Für Kristallisationsversuche am Collinolacton (**7**) wurden die Derivate **59** – **62** hergestellt, die leichter kristallisieren sollten. Ferner sollten Derivate synthetisiert werden, die keine *anti/syn*-Rotationsisomerie in der NMR-Spektroskopie zeigen. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass Collinolacton (**7**) als cytotoxisch und cytostatisch einzustufen ist, so dass es interessant war, Collinolacton (**7**) und seine Derivate (**59** – **62**, **66** – **68**) einer Bioaktivitätsstudie zu unterziehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt sieben neue Collinolacton-Derivate durch Reaktionen an 4-OH und am Cyclodecatrien dargestellt (Abbildung 57).

- 1) Vier Derivate konnten über eine Veresterung an der Hydroxylgruppe von C-4 generiert werden. Es konnten das Acetat **59**, das Benzoat **60** und zwei Brombenzoate (*ortho*- (**62**) und *para*- (**61**)) gewonnen werden. Als Reagenzien kamen Anhydrid in Pyridin, freien Säure mit EDCI/DMAP als Kupplungsagens und schließlich Säurechlorid/DMAP zum Einsatz. Die guten Ausbeuten (bis zu 91%) dieser nicht optimierten Reaktionen zeigten, dass es effektive Zugänge zu Collinolactonestern gibt.
- 2) Die Auswertung der NMR-Spektren zeigte, dass alle an C-4 modifizierten Verbindungen **59** – **62** eine Verdopplung des Spektrensatzes durch Rotationsisomerie aufweisen. Durch  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und HSQC-NMR-Daten wurden alle vier Derivate getrennt für *anti*- und *syn*-Rotamer aufgeklärt und ihre Summenformeln durch HR-ESI-MS bestätigt.
- 3) Die Derivate **59** – **62**, die durch Veresterung für Kristallisationsexperimente dargestellt wurden, konnten nicht kristallisiert werden, was vermutlich auf das Vorliegen von Rotameren zurückzuführen ist.
- 4) Derivatisierungen wurden am Trien vorgenommen mit dem Ziel, die Isomerisierungstendenz aufzuheben. Drei Derivate waren zugänglich, die nur ein

Konformer in den NMR-Spektren anzeigten. Es konnten zwei epoxidierte **66** und **67** und ein tetrahydriertes **68** Derivat dargestellt werden.

- 5) Die Epoxidderivate **66** und **67** wurden durch Umsetzungen mit unterschiedlichen Moläquivalenten *m*-CPBA (1 eq. und 4 eq.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dargestellt. Es ist bemerkenswert, dass durch Synthese der zwei Derivate **66** und **67** eine Aussage über die Stabilität und Reaktivität der Doppelbindungen des Cyclodecatriens getroffen werden konnte.
- 6) Das 6,7,8,9-Tetrahydrocollinolacton (**68**) entstand bei der Hydrierung mit Pd/C als Katalysator.
- 7) Im Einklang mit der unter 3) angestellten Vermutung konnte aus den Derivaten der Cyclodecatrien-Modifikationen ein Kristall erhalten werden. Das Monoepoxid-Derivat **66** ergab Kristalle aus einer Lösung der Konzentration von 3 mg/mL in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> bei -20°C. Die Röntgenstrukturanalyse der Kristalle wird in der Arbeitsgruppe G. SHELDRIK durchgeführt und ist derzeit noch in Bearbeitung.

### 3. Molekularbiologische Untersuchungen zum Collinolacton

Das Ziel der Molekularbiologischen Untersuchungen war die Identifizierung des Biosynthesegenclusters von Collinolacton (**7**). Dazu sollte eine BVMO-Sonde konstruiert und auf eine Cosmidbank des Collinolacton-Produzenten angewendet werden. Eine Analyse des Biosynthesegencluster des Collinolactons (**7**) werden die postulierte Biosynthese belegen können, bei der neben einer Baeyer-Villiger-Oxidation eine bislang unbekannte [6+4]Cycloaddition eine Rolle spielt.

- 1) Aus der von *Combinature* erhaltenen Cosmidbank mit 81 PKS I positiven Klonen wurde eine Kartierung der Cosmide vorgenommen. Die Cosmid-DNA wurde isoliert, mit *Bam*HI verdaut, per Gelelektrophorese getrennt und per Southern Blot fixiert. Die Cosmide wurden in acht Familien unterteilt, von denen jeweils ein Cosmid als favorisiertes ausgewählt wurde (CB-2214-39, -41, -43, -53, -65, -68, -94 und -95).
- 2) Für das Primerdesign wurde die Literatur nach Baeyer-Villiger-Monooxygenasen gesichtet. Es wurden sechs Gene (*urdM*, *pgaM*, *jadF*, *IndM2*, *mtmOIV* und *rubN*) gefunden, die auf Sequenzähnlichkeit untersucht wurden. Dabei wurden acht spezifische konservierte Bereiche identifiziert, von denen 4 Primerpaare (jeweils forward und reverse) abgeleitet wurden.

- 3) Zur Prüfung der Primerpaare wurde diese zunächst zur Amplifizierung anverdauter genomischer DNA der Stämme Gö40/10 und Tü 2717 angewandt. Es wurde erfolgreich ein etwa 500 bp großes DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert, das nach Transformation, Kultivierung und Isolierung und Ansequenzierung der amplifizierten DNA eine 98%ige Übereinstimmung mit Teilen von genomischer Streptomyces DNA aus *Streptomyces coelicolor* aufwies. Wenngleich noch kein BVMO-Gen isoliert werden konnte, so lag das gefundene DNA-Fragment in unmittelbarer Nachbarschaft zu einer FAD-bindenden Rossmann-Schleife, wie sie für BVMO typisch ist und führte zum Design eines verbesserten, fünften Primerpaars.

#### 4. Cytotoxische Aktivität der Collinolacton-Derivate

- 1) Drei Derivate des Collinolactons **59** – **61** fielen im Cytotoxizitätstest (W. BEIL, MHH) auf. Sie zeigten gegen die drei getesteten Zelllinien bis zu einer Konzentration von 10 µg/mL eine Wachstuminhibierung von 50% (GI<sub>50</sub>). Auffallend ist die Zellspezifität von **59** – **61** gegen die Mammacarcinom-Zelllinie MCF7. Es konnte eine vollständige und potente Inhibierung des Wachstums (TGI) beobachtet werden.
- 2) Drei Derivate des Collinolactons **60** – **62** fielen im Proliferationshemmungstest (F. SASSE) auf. Der Mechanismus der Mikrotubuli-modifizierenden Wirkung wurde näher untersucht.
- 3) 4-*O*-Benzoylcollinolacton (**60**), das aktivste Derivat (IC<sub>50</sub>-Wert = 0.7 µg/mL), induzierte eine Vakuolisierung im Endoplasmatischen Retikulum, was auch im Mikrotubulinetz sichtbar wurde. Die Mikrotubuli selbst waren nicht daran beteiligt.
- 4) Das 4-*O*-*o*-Brombenzoylcollinolacton (**62**) mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 6 µg/mL baute das Mikrotubulinetz ab, so dass Halb- und Krüppelspindeln vorlagen.
- 5) Das 4-*O*-*p*-Brombenzoylcollinolacton (**61**) mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 10 µg/mL beeinflusste das Mikrotubulinetz nicht, dafür lagen in den Zellkernen auffallend viele Halbspindeln vor.

#### 5. Beiträge zur Biosynthese des 1-*O*-Benzoylrhamnopyranosids

- 1) Durch Zufütterung von Vitamin C zur wachsenden Kultur von Stamm Tü 3634 konnte eine zuverlässige 1-*O*-Benzoylrhamnosid-produktion (**20**) von 2.5 mg/L erzielt werden. Die Optimierung der Aufarbeitung ließ eine effektive Isolierung von **20** zu.

- 2) Die Fütterung mit [1,7-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]Shikimat belegt, dass das Benzoylaglykon des  $\alpha$ -L-Rhamnopyranosids **20** *de novo* aus einem Shikimat-Intermediat gebildet wird. Damit wurde der laut Literatur übliche Biosyntheseweg über Prephenat und Phenylalanin zur Benzoesäure ausgeschlossen.
- 3) Die hier beschriebene, alternative Route der Biosynthese von Benzoaten ist für Mikroorganismen bisher nicht literaturbekannt und beschreibt somit ein neues Prinzip. Sie ist damit unter Umständen auch an dem Aufbau anderer Sekundärmetabolite beteiligt.
- 4) Die Analyse zeigte, dass die Biosynthese von Sekundärstoffen auf den verschiedenen Stoffwechselwegen effizient durch die Auswertung von <sup>13</sup>C-NMR-Spektren aus Fütterungsexperimenten mit <sup>13</sup>C-markierten Vorläufern bewiesen werden kann.

## 6. Sekundärmetabolite aus extremophilen Mikroorganismen

Im Rahmen des DBU-Projektes wurden zehn thermophile Bakterienstämme (3-006 – 3-010) aus der Stammsammlung der *Brain AG* in einem chemischen und biologischen Screening auf vier verschiedenen Nährböden auf ihre Sekundärmetabolitenproduktion untersucht. Es wurden zwei Stämme (3-006 und 3-008) zur weiteren Bearbeitung ausgewählt, die durch ein interessantes Metabolitenspektrum auffielen. Ein Stamm (3-009) fiel im biologischen Screening der Firma *Brain AG* wegen einer extrem cytotoxischen Aktivität auf. Diese drei Stämme wurden im 10 L-Maßstab kultiviert, um ausreichend Rohprodukt zur Isolierung der Reinsubstanzen zu gewinnen. Mit Hilfe spektroskopischer Methoden (1 D- 2 D-NMR, UV- und IR-Spektroskopie) und der Massenspektrometrie wurden sieben Verbindungen (**110** - **116**) unter anderem mit Hilfe einer Datenbankrecherche identifiziert. Es wurden eine neue Verbindung, ein bekanntes Syntheseprodukt und fünf bekannte Sekundärmetaboliten isoliert. Keine dieser Verbindungen war im Plattendiffusionstest biologisch aktiv.

### 6.1. *Streptomyces thermonitrificans* Stamm 3-008

- 1) Es konnte das 1-Methyl-isoinosin (**110**) durch 1 D-, 2 D-NMR und Massenspektrometrie in seiner Struktur aufgeklärt werden. 1-Methyl-isoinosin (**110**) ist als Syntheseprodukt literaturbekannt.<sup>[181]</sup> Es wurde bisher nicht aus Streptomyceten isoliert und zeigte keine biologische Aktivität in Plattendiffusionstests

- 
- 2) Die Indol-3-Milchsäure (**111**) wurde anhand eines ESI-Massenspektrums und Abgleich mit Daten aus *AntiBase*<sup>[179]</sup> identifiziert. Der Vergleich von 1 D-NMR-Daten mit der Literatur konnte das Vorliegen der Indol-3-Milchsäure (**111**) bestätigen.<sup>[182]</sup> **111** zeigte keine biologische Aktivität in Plattendiffusionstests, obwohl eine antifungische Aktivität beschrieben ist.<sup>[179]</sup>
  - 3) Anthranilsäure (**112**), Genistein (**113**) und Adenosin (**114**) konnten anhand der <sup>1</sup>H-NMR-Daten, Massenspektren und mit Zuhilfe von Datenbanken rasch identifiziert werden. Sie sind sehr häufige Intermediate von Stoffwechselwegen (**112**, **113**) oder stammen aus dem Nährmedium selbst (**113**).

## 6.2. *Saccharomonospora* sp. Stamm 3-009

- 1) Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie konnte die Struktur des neuen Indolderivates 3-(2,3-Dihydroxy-1-methoxypropyl)-indol (**115**) in seiner Struktur aufgeklärt werden. Vergleiche mit allen Datenbanken<sup>[178,179,187]</sup> ergab keine Übereinstimmung. Es konnte keine biologische Aktivität festgestellt werden.
- 2) Das Vorliegen von *p*-Hydroxyphenyllessigsäure (**116**) konnte anhand des EI-Massenspektrums und Abgleich mit der Datenbank identifiziert und bestätigt werden.<sup>[188]</sup>

---

## IX Ausblick

### 1. Collinolacton

- 1) Um die absolute Stereochemie der sechs Chiralitätszentren zu klären, ist die Kristallstruktur von Collinolacton (**7**) oder einem seiner Derivate notwendig.
- 2) Die NMR-Analyse und die Massenanalyse führten zu unterschiedlichen Summenformeln mit der Differenz eines Sauerstoffatoms für die zwei Epoxidderivate **66** und **67**. Zur Klärung dieses Widerspruchs ist die Röntgenstrukturanalyse des Monoepoxidderivates **66** von besonderem Interesse.
- 3) Es gilt zu klären, ob eine chromatographische Aufreinigung der Derivate **66** – **68** über RP-Material zu besseren Ausbeuten führt.
- 4) Um den Biosynthesegencluster zu isolieren, müssen die molekularbiologischen Arbeiten fortgeführt werden. Mit den verbesserten Primern kann nun die Cosmidbank gescreent werden und bei erfolgreicher Amplifizierung könnte eine erste Baeyer-Villiger-Monooxygenasesonde generiert werden. Über die Baeyer-Villiger-Monooxygenasesonde sollte der Biosynthesegencluster von Collinolacton (**7**) zugänglich werden.
- 5) Der Biosynthesegencluster des Collinolactons (**7**) ist von besonderem Interesse, um die postulierte Biosynthese zu belegen. Vor allem die ungewöhnliche Bildung des tricyclischen Cyclodecatriens via [6+4]Cycloaddition bedarf der molekularbiologischen Charakterisierung.
- 6) Ein zusätzlicher, wünschenswerter Beleg der postulierten Biosynthese wäre die Isolierung der biosynthetischen Vorstufe Collinoketon (**56**). Die Variation von Nährmedien und die Fütterung von Ancymidol (**53**) brachten bisher keinen Erfolg.
- 7) Nach Darstellung und biologischer Testung zweier weiterer Derivate des Collinolactons (Veresterung mit Tiglin- (**80**) und Isobuttersäure (**79**)) könnten weitere Überlegungen angestellt werden, welche neuen Derivate interessante biologische Aktivitäten aufweisen würden. Eine vielversprechende Möglichkeit wäre die Kupplung von Zuckerbausteinen an Collinolacton (**7**).
- 8) Die bei der Bioaktivitätsprofilierung des 4-*O-p*-Brombenzoylcollinolacton (**61**) aufgefallene Monoasterbildung kennt man bislang nur vor zwei weiteren Substanzen, dem Monastrol (**77**) und dem HR22C16 (**78**). Als mögliches Target wird das Motorprotein Kinesin Eg5 weiter untersucht.<sup>[145]</sup>

## **2. Chemisches Screening mit extremophilen Mikroorganismen**

- 1) Die im Biologischen Screening aufgefallene, stark cytotoxische Substanz muss über preparative HPLC zur Reinsubstanz aufgereinigt und in ihrer Struktur aufgeklärt werden.
- 2) Es sollte überdacht werden, ob nicht auch ein synthetisches Medium in das chemische Screening eingeschlossen wird, um einen Vergleich zu haben, wie die extremophilen Stämme auf dieses Medium reagieren und mehr Masse an Sekundärmetaboliten produzieren.

## B. EXPERIMENTELLER TEIL

### X Allgemeines

#### 1. Instrumentelle Analytik

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

**UV-Spektren (UV):** *Varian Cary 3E*, alle Spektren wurden in Methanol als Lösungsmittel aufgenommen, soweit nicht anders vermerkt. Die Wellenlänge  $\lambda$  ist in nm angegeben, der molare Absorptionskoeffizient  $\varepsilon$  hat die Einheit  $1000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$  und berechnet sich wie folgt:

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

mit  $Abs$  = Absorption,  $M$  = Molmasse,  $c$  = Konzentration,  $d$  = Schichtdicke.

Bei einer Schichtdicke von  $d = 1 \text{ cm}$  und einer Lösung mit dem Volumen  $V = 10 \text{ mL}$  ergibt

$$\text{sich somit: } \varepsilon \text{ } 1000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1} = \frac{Abs \cdot M \text{ [g/mol]} \cdot 10}{\text{Einwaage [mg]}}.$$

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

**Circulardichroismus-Spektren (CD):** *Jasco* Modell J-500, die molaren Elliptizitäten  $\theta$  sind in  $10^{-1} \text{ deg cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ , gegeben. UV und CD wurden bei der gleichen Konzentration gemessen, die bei der jeweiligen Verbindung angegeben wurde.

**Drehwerte:** Polarimeter *Perkin-Elmer* Modell 241, die Drehwerte  $[\alpha]_D^{20}$  sind in  $10^{-1} \text{ deg cm}^2 \text{ g}^{-1}$ , die Konzentrationen in mg/mL angegeben.

**Massenspektren: EI-MS:** *Finnigan* MAT 95, 70 eV, Hochauflösungen wurden mit Perfluorkerosin als Vergleichsubstanz gemessen, die relativen Intensitäten beziehen sich auf den Peak höchster Intensität und sind in Klammern angegeben. **DCI-MS:** *Finnigan* MAT 95, 200 eV, Reaktandgas  $\text{NH}_3$ . **ESI-MS:** *Finnigan* LC-Q. **HR-ESI-MS:** *Bruker* APEX-Q IV, Feldstärke 7 Tesla.

**$^1\text{H}$ -NMR-Spektren:** *Varian* Inova 600 (600 MHz), *Varian* Inova 500 (500 MHz), *Varian* Mercury 300 (300 MHz), *Varian* Unity 300 (300 MHz), *Bruker* AMX 300 (300 MHz). Chemische Verschiebungen sind in  $\delta$ -Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard angegeben, Kopplungskonstanten  $J$  in Hz. Alle  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden als Spektren erster Ordnung interpretiert, soweit Signalaufspaltung und Kopplungskonstanten angegeben sind. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quint = Quintett, sext = Sextett, sept = Septett, hept = Heptett, m = Multipllett, br = breit.

**$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren:** *Varian* Inova 600 (150.8 MHz), *Varian* Inova 500 (125.7 MHz), *Varian* Mercury 300 (75.5 MHz), *Varian* Unity 300 (75.5 MHz), *Bruker* AMX 300 (75.5 MHz), *Varian* Mercury 200 (50.3 MHz). Chemische Verschiebungen in  $\delta$ -Werten (ppm) relativ zum jeweiligen Lösungsmittel als internem Standard. Multiplizitäten: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett.

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

## 2. Chromatographie

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

**Dünnschichtchromatographie:** *Merck* HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 10 x 10 cm, Schichtdicke 0.2 mm; *Merck* DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm; *Merck* DC-Alufolien RP-18 F<sub>254s</sub>, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.2 mm. Angegeben sind  $R_f$ -Werte (Laufhöhen relativ zur Laufmittelfront).

**Sprühreagenzien:** Nach *Merck*, Anfärbereagenzien für die Dünnschicht- und Papier-Chromatographie.<sup>[189]</sup>

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

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

Ehrlichsreagenz (Nr. 91): 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wurde in einer Lösung aus 25 mL Salzsäure gegeben.

Orcin-Sprühreagenz (Nr. 120 - 122): 1 g Eisen-(III)-chlorid wurde in 100 mL Schwefelsäure gelöst und mit dem gleichen Volumen einer Orcinlösung (6% in Ethanol) versetzt.

MOPS-Sprühreagenz (Nr. 204): Molybdatphosphorsäurelösung (5 oder 10% in Ethanol).

**Adsorberharz**: *Serva* Amberlite<sup>®</sup> XAD-2, *Merck* und *Rohm und Haas* Amberlite<sup>®</sup> XAD-16.

**Säulenchromatographie**: Für Schwerkraftsäulen wurde Kieselgel 60, 0.2 – 0.05 mm (*Macherey-Nagel, ICN*), Kieselgel 60 RP-8, 35 – 70 µm (*Orpegen*), Kieselgel 60 RP-18, 40 – 63 µm (*Merck*) verwendet. Für die Gelchromatographie kam Sephadex<sup>®</sup> LH-20 (*Sigma Aldrich*) zum Einsatz.

**Mitteldruckchromatographie**: Pumpe: *Knauer*; Säule *Merck* Lobar<sup>®</sup> B, 40 – 63 µm.

### **Hochleistungs-Flüssigchromatographie Anlagen (HPLC):**

#### **Analytische HPLC mit DAD-Kopplung:**

**HPLC 1**: Pumpe: *Jasco* PU-2080plus; Mischkammer: *Jasco* LG-2080-02; Entgaser: *Jasco* DG-2080-53; PDA-Detektor: *Jasco* MD-210plus; Autosampler: *Jasco* AS-2055plus mit *Rheodyne* 100 µL Auftragsschleife; Säulenofen: *Jasco* CO-2065; Fraktionssammler: *Jasco* SF-3120; Chromatographiesoftware: *Jasco* Borwin<sup>™</sup> mit *Jasco* Borwin<sup>™</sup> PDA Version 1.50; Steuersoftware: *Jasco* Borwin<sup>™</sup> HSS-2000 Version 3.5.2.

**HPLC 2**: Pumpe: *Kontron* 322; Mischkammer: *Kontron* HPLC 360; Dioden-Array-Detektor: *Kontron* 440; Autosampler: *Kontron* 360 mit analytischer Auftragsschleife; Software: *Kontron* Kromasystem 2000<sup>™</sup> Version 1.60.

#### **Analytische HPLC mit MS-Kopplung:**

**HPLC 3**: Pumpe und Mischkammer: *Flux Instruments* Rheos 4000; Entgaser: *Flux Instruments* ERC-3415α; Autosampler: *Jasco* 851-AS mit variabler Auftragsschleife 0 – 100 µL; PDA-Detektor: *Finnigan* Surveyor; Massendetektor: *Finnigan* LC-Q; Steuersoftware

HPLC: *Flux Instruments* Janeiro; Chromatographie- und Steuersoftware PDA und MS-Detektor: *Finnigan Xcalibur*<sup>TM</sup> Version 1.3.

#### **Semipräparative HPLC:**

**HPLC 4:** Pumpe *Jasco* PU-1587; Mischkammer: *Jasco* 1000  $\mu$ L; UV-Detektor: *Jasco* UV-1575; Manuelles Probenauftragsventil: *Rheodyne* mit 2.0 mL Auftragsschleife; Chromatographiesoftware: *Jasco Borwin*<sup>TM</sup> Version 1.50; Steuersoftware: *Jasco* HSS-2000 Version 3.5.2.

#### **Hochleistungs-Flüssigchromatographie Säulen:**

**Analytisch: Säule 1** (Standardsäule für Analytik): *Jasco* Kromasil 100 C18, 5  $\mu$ m, 250 x 3 mm, Flussrate: 0.5 mL/min. **Säule 2** (Standardsäule für HPLC-MS): *Grom* Supersphere 100 RP-18 endcapped, 4  $\mu$ m, 100 x 2 mm mit Vorsäule *Grom* Supersphere 100 RP-18 endcapped, 4  $\mu$ m, 10 x 2 mm, Flussrate: 0.3 mL/min.

**Semipräparativ: Säule 3:** *Jasco* Kromasil 100 C18, 7  $\mu$ m, 250 x 20 mm, Flussrate: 17 mL/min.

#### **Gradientenprogramme und Laufmittelsysteme für die HPLC:**

**Programm 1** (Standardprogramm für die Analytik): Laufmittelsystem: Wasser (A) / Acetonitril (B), jeweils mit 0.1% TFA; Gradient: 20% auf 100% B in 20 min, 10 min bei 100% B, in 2 min auf 20% B, 5 min bei 20% B.

**Programm 2** (Standardprogramm für die HPLC-MS): Laufmittelsystem: Wasser (A) / Methanol (B), jeweils mit 0.05% Ameisensäure; Gradient: 20% auf 100% B in 20 min, 10 min bei 100% B, in 2 min auf 20% B, 5 min bei 20% B.

**Programm 3** (Aufreinigung von Collinolacton): Laufmittelsystem: Wasser (A) / Acetonitril (B), jeweils mit 0.1% TFA; Gradient: 20% auf 100% B in 20 min, 10 min bei 100% B, in 2 min auf 20% B, 5 min bei 20% B.

### **3. Mikrobiologische Methoden und Geräte**

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden unter den üblichen sterilen Bedingungen durchgeführt.<sup>[190]</sup>

**Nährmedienbestandteile:** Die verwendeten Nährmedienbestandteile wurden von folgenden Firmen bezogen:

---

<i>AppliChem</i> : Glycerin	<i>Neuform</i> : Hafermehl (Holo <sup>®</sup> Hafergold)
<i>Difco</i> : Agar und Bacto Trypton	<i>Oxoid</i> : Hefeextrakt
Fluka: D-Maltose	Riedel-deHaen: D-Mannit
<i>Henselwerk GmbH</i> : Sojamehl fettarm	<i>Roth</i> : D-Glucose und Stärke aus Kartoffeln
<i>Marcor</i> : Cornsteep Powder	<i>Sigma</i> : Sojapepton
<i>Merck</i> : Malzextrakt, Fleischpepton und Caseinpepton	

Nährmedien für Bakterienkulturen:

**Soja/Mannit (SM)**: Sojamehl 20 g/L, D-Mannit 20 g/L, pH 7.0.

**Medium 2 (M2)**: Malzextrakt 10 g/L, Hefeextrakt 4 g/L, D-Glucose 4 g/L, pH 7.0.

**Hafer**: Hafermehl 20 g/L, „Spur 11“ 2.5 mL/L, pH 6.8.

Spurenelementlösung „Spur 11“: CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 3 g/L, Fe(III)-citrat 1 g/L, MnSO<sub>4</sub> 0.2 g/L, ZnCl<sub>2</sub> 0.1 g/L, CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O 25 mg/L, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> x 10 H<sub>2</sub>O 20 mg/L, CoCl<sub>2</sub> 4 mg/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 10 mg/L.

**SGG**: D-Glucose 10 g/L, Glycerin 10 g/L, Stärke 10 g/L, Cornsteep Powder 2.5 g/L, Caseinpepton 5 g/L, Hefeextrakt 2 g/L, NaCl 1 g/L, CaCO<sub>3</sub> 3 g/L, pH 7.0.

**M1**: 5.0 g/L Pepton, 3.0 g/L Fleischextrakt, 15.0 g/L Agar auf einen Liter dest. H<sub>2</sub>O, pH 7.0.

**STA**: Medium als Agar-Platte von Brain erhalten.

Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf einen Liter Leitungswasser.

Nährmedien für molekularbiologische Arbeiten:

**LB**: Bacto Trypton 10 g/L, Hefeextrakt 5 g/L, NaCl 10 g/L, 975 mL bidest. H<sub>2</sub>O

**LB<sub>apr</sub>**: Bacto Trypton 10 g/L, Hefeextrakt 5 g/L, NaCl 10 g/L, 975 mL bidest. H<sub>2</sub>O Nach der Sterilisation Apramycin bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/mL zugegeben.

Apramycin wurde in Stammlösungen einer Konzentration von 50 mg/L bei -4°C gelagert.

**SOB**: Bacto Trypton 20 g/L, Hefeextrakt 5 g/L, NaCl 0.5 g/L, 250 mM KCl 10 mL/L, 950 mL bidest. H<sub>2</sub>O, pH 7.0

Alle Nährmedien wurden 30 min bei 121°C und einem bar Überdruck sterilisiert. Der pH-Wert wurde vor der Sterilisation mit 0.5 M HCl bzw. 0.5 M NaOH eingestellt. Festen Medien wurde entsprechend 22 g/L Agar hinzugefügt.

**Schüttler:** *Braun* Inkubationsschüttelschrank BS-4, *Braun Certomat*<sup>®</sup> RM, *Braun Certomat*<sup>®</sup> U+HK, *Braun Certomat*<sup>®</sup> BS-1.

**Fermenter:** Rührblattfermenter *Braun* Biostat M (1 L), *Braun* Biostat E (10 L), *Braun* Biostat U (50 L), Airlift-Fermenter (10 L), gebaut: *Uni Dortmund*, *Fischer & Porter* Gasflowmeter (45711M), *The Analytical Development Co. Ltd.* CO<sub>2</sub>-Analysator, Ingold O<sub>2</sub>-Elektrode.

**Stammhaltung:** Die Stammhaltung erfolgte auf Agarplatten. Bewachsene Agarplatten wurden mit Verschlussfolie (Parafilm<sup>®</sup> M, Fa. *Brand*) verschlossen und bei 4°C für maximal vier Monate gelagert.

#### 4. Molekularbiologische Methoden und Geräte

**Reagenzien:** Das Phenol/Chloroform wurde von *Roth*, die Ribonuclease A von *Sigma* und das Lysozyme von *Fluka* bezogen. Das Restriktionsenzym (*BamHI*) mit dessen Puffer, sowie BSA stammen von *New England Biolabs*. Für die Gelelektrophorese wurde der Farbstoff Blue Orange Loading Dye und eine 1 kb große DNA-Leiter (*Promega*) verwendet, sowie ein Gene-Ruler/DNA-Leiter-Gemisch von *Fermentas*. Tris Ultra Qualität und Agarose NEEO-Qualität wurden von der Firma *Roth* bezogen.

Pufferlösungen:

**AL 1:** Für 100 mL Lösung: 1 M Tris/HCl (pH 8.0) 5 mL, 0.5 M EDTA (pH 8.0) 2 mL, 93 mL ddH<sub>2</sub>O (steril), Lagerung bei 4°C. Kurz vor Gebrauch 10 mg RNase A (100 µg/mL) dazu geben.

**AL 2:** Für 50 mL Lösung: 10% Natriumdodecylsulfat (SDS) 5 mL, 10 M NaOH 1 mL, ddH<sub>2</sub>O (steril) 44 mL. Die Pufferlösung ist maximal drei Wochen haltbar.

**AL 3:** 3 M KOAc (pH 5.5, steril).

**TE:** 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA

**P 1:** 3 M NaOAc

**50 x TAE:** Tris/Base 242 g/L, Eisessig 57.1 mL/L, EDTA 18.6 g/L oder 100 mL/L 0.5 M EDTA, pH 8.0 mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen.

**1 x TAE:** 20 mL 50 x TAE (Stammlösung), 980 mL ddH<sub>2</sub>O.

**5 x TBE:** 54 g Tris/Base, 27.5 g Borsäure, 20 mL 0.5 M EDTA, pH 8.0 mit ddH<sub>2</sub>O auf 1 L auffüllen.

**1 x TBE:** 200 mL TBE (Stammlösung), 800 mL ddH<sub>2</sub>O.

Lösungen:

**10.3%ige Saccharose:** 51.5 g Saccharose auf 500 mL ddH<sub>2</sub>O

**Lysozym Stammlösung:** 10.27 g Saccharose, 2.5 mL 1 M Tris/HCl (pH 8.0), 5 mL 0.5 M EDTA (pH 8.0) auf 100 mL ddH<sub>2</sub>O auffüllen.

**Lysozym-Lösung:** 76.5 mg Lysozym in 15.3 mL Lysozym Stammlösung

**Denaturierungslösung:** 20 g NaOH, 87 g NaCl, 1 L ddH<sub>2</sub>O.

**Neutralisierungslösung:** 121.14 g Tris/Base, 87.7 g NaCl, 1 L ddH<sub>2</sub>O, pH 7.4.

**20 x SSC:** 175.3 NaCl, 88.2 NaCitrat, 1 L ddH<sub>2</sub>O, pH 7.0.

**Enzym: BamHI-Schnittstellen:** 5'...G | GATCC...3'  
3'...CCTAG | G...5'

**Antibiotika:** Eine Apramycin-Stammlösung von 50 mg Apramycin in 1 mL ddH<sub>2</sub>O (steril).

**Membran:** Für den Southern Blot wurde eine Hybond<sup>TM</sup>-N+ positiv geladene Nylon-Transfer-Membran von der Firma *Amersham Biosciences* mit einer Removal Rating von 0.45 µm verwendet.

**Zentrifugen:** *Eppendorf* Zentrifuge 5415D, *Sigma Laboratory* Zentrifuge 3 K 30, (Rotor 19777 und 12154), 4K10 (Rotor 11140), 4K15 (Rotor 12256).

**Elektroporation:** *Biorad* Gene Pulser II, *Biorad* Pulse Controller Plus.

**Termoblock:** *Stuart Scientific* Block Heater.

**Gelelektrophorese:** *Biorad* PowerPac 300.

**Vortex:** *Winn* Vortex-Genie.

**Photometer:** *Eppendorf* BioPhotometer.

**PCR-Maschine:** *Eppendorf* Mastercycler Gradient.

## **XI Collinolacton aus *Streptomyces* sp. Gö 40/10 und Tü 1892**

### **1. Stammhaltung**

Es wurden zwei unterschiedliche Variationen der Stammhaltung angewandt.

#### **1.1. Agarplatten**

Die SM-Agarplatten wurden entweder mit Sporen einer gut bewachsenen Agarplatte oder mit einem Drittel einer Stickstoffeinlagerung beimpft und bei 28°C bis zur vollständigen Sporulation (fünf Tage) inkubiert. Die Platten wurden bei 4°C nicht länger als drei Monate gelagert. Frisch inkubierte Platten wiesen weißes Luftmycel auf, das sich bei Lagerung grau färbte. Der Agar war dunkelgrün bis schwarz gefärbt.

#### **1.2. Langzeiterhaltung in flüssigem Stickstoff**

Von einer gut bewachsenen Agarplatte wurden mit einseitig zugeschweißten und mit einem Bleistück beschwerten sterilen Polypropylen-Halm Agarstückchen ausgestanzt, bis der Halm gefüllt war. Der Halm wurde in einen zweiten äußeren Halm gesteckt, der an beiden Enden zu geschmolzen wurde. Mehrere Halme in einem Cryoröhrchen wurden in einem Dewargefäß in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingelagert.

### **2. Standardkultivierung**

Kultivierungen in Schüttelkolben mit Schaumstoffkappen wurden in 250 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen bei 28°C und 250 rpm durchgeführt. Die Kolben enthielten 100 mL SM Nährmedium. Die Vorkulturen mit dem jeweiligen Produktionsmedium wurden mit 1 cm<sup>2</sup> großen Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft. Die Hauptkulturen wurden mit jeweils 5 mL einer 48 h alten Vorkultur beimpft und 72 h bei 28°C und 250 rpm inkubiert.

### 3. Variation der Kultivierungsbedingungen zur Ausbeutesteigerung

#### 3.1. Kultivierung in verschiedenen Nährmedien

Um ein optimale Produktion des Collinolactons (7) in verschiedenen Nährmedien zu studieren, wurden die Stämme Tü 1892 und Gö 40/10 in einem Ansatz von 300 mL in vier verschiedenen Nährmedien (M2, SM, SGG und Hafer) kultiviert. Die Ansätze wurden über Celite filtriert. Das Mycel wurde in 100 mL Aceton im Ultraschallbad aufgeschlossen. Nach einer erneuten Filtration des Mycels wurde die organische Phase im Vakuum entfernt. Das Kulturfiltrat wurde mit 2 x 100 mL Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde im Vakuum entfernt. Von den Rohextrakten wurde eine methanolische Lösung mit der Konzentration 3 mg/mL angefertigt, die über die HPLC-MS (Säule 2, Programm 2) analytisch ausgewertet wurde.

Weitere Versuche der Ausbeutesteigerung, wie unten aufgeführt wurden im Nährmedium SM mit dem Stamm *Streptomyces collinus* Tü 1892 (außer die Fermentation im 50 L-Maßstab) durchgeführt.

#### 3.2. Kultivierung in Schüttelkolben bei 180 rpm

Der Stamm Tü 1892 wurde in 250 mL Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen, befüllt mit 100 mL SM Nährlösung, beimpft mit einem 1 cm<sup>2</sup> großem Stück einer gut bewachsenen Agarplatte, bei 28°C und 180 rpm fermentiert. Nach 48 stündiger Kultivierung wurden mit 5 mL dieser Vorkultur wie oben beschrieben vorbereitete Hauptkulturen angeimpft. Nach 72 stündiger Kultivierung (28°C und 180 rpm) der Hauptkultur wurden die Kolben geerntet.

#### 3.3. Kultivierung in Schüttelkolben mit XAD-Zusatz

Die Kultivierung wurde in 250 mL Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen bei 28°C und 250 rpm durchgeführt. Die Kolben enthielten 100 mL SM Nährmedium. Die Vorkulturen mit dem jeweiligen Produktionsmedium wurden mit einem 1 cm<sup>2</sup> großen Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft. Die Hauptkulturen wurden mit jeweils 5 mL einer 48 h alten Vorkultur beimpft. Nach 12 h wurde jedem Kolben ca. 1.5 g steriles Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 zugefügt. Die Inkubation wurde 72 h bei 28°C und 250 rpm durchgeführt.

### 3.4. Kultivierung in 1 L Schüttelkolben

Die Kultivierung erfolgte in 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikane bei 28°C und 120 spm. Die Kolben enthielten 150 mL SM-Nährmedium. Es wurden Vor- und Hauptkulturen analog zu B. XI2 angefertigt.

### 3.5. Kultivierung in Fermentern

#### 1 L-Maßstab:

Die Kultivierung des Stammes Tü 1892 in einem 1 L Biostat M Fermenter wurde mit 900 mL Nährmedium SM und einem Tropfen Entschäumer (NIAX) durchgeführt. Das Animpfen erfolgte mit 100 mL einer 48 h alten Vorkultur, die analog zu B. XI2 angezogen wurden. Die Kultivierung im 1 L-Maßstab erfolgte bei 28°C, einer Luftzufuhr von 1.6 vvm und einer Rührerdrehzahl von 700 rpm. Die Kultivierung verlief unter einer pH-Sperre von  $\text{pH} = 7.3 \pm 1.2$ . Nach 72 h wurde der Fermenter geerntet.

#### 10 L-Maßstab:

Für die Kultivierung des Stammes Tü 1892 in einem 10 L Biostat E Fermenter wurden 9 L Nährmedium SM und zehn Tropfen NIAX autoklaviert. Das Animpfen erfolgte mit 1 L einer 48 h alten Vorkultur, die analog zu B. XI2 angezogen wurden. Die Kultivierung im 10 L-Maßstab erfolgte bei 28°C, einer Luftzufuhr von 1.0 vvm und einer Rührerdrehzahl von 300 rpm. Die Kultivierung verlief unter einer pH-Sperre von  $\text{pH} = 7.0 \pm 1.5$ . Nach 72 h wurde der Fermenter geerntet.

#### 50 L-Maßstab:

Der 50 L Biostat U Fermenter wurde mit 47.5 L SM-Medium und 13 g NIAX befüllt, autoklaviert und mit 48 h alten Vorkulturen des Stammes Gö 40/10 (9.6% des Fermentationsvolumens), die entsprechend B. XI2 vorbereitet wurden, angeimpft. Der Fermenter lief mit einer Rührerumdrehung von 200 rpm, einer Luftzufuhr von 0.66 vvm und bei 28°C. Die pH-Sperre wurde auf  $\text{pH} = 6.5 \pm 1.0$  eingestellt.

#### Airlift-Fermenter mit Überdruck:

Der Stamm Tü 1892 wurde im 10 L Airlift-Fermenter mit 9 L SM-Medium als Nährmedium kultiviert. Nach dem Autoklavieren wurde das Nährmedium mit 1 L einer 48 h alten Vorkultur beimpft (s. B. XI2). Die Fermentation erfolgte bei 28°C, 5 bar Überdruck, Luftzufuhr von 4 vvm und ohne pH-Sperre. Die Kulturen erntete man nach 72 h.

### Airlift-Fermenter mit XAD-Zusatz:

Die Fermentation verlief analog zu der Fermentation im Airlifter mit Überdruck. Nach 12 h wurde dem Fermenter 250 g in Wasser aufgeschlämmtes, autoklaviertes Amberlite® XAD-2 zugesetzt.

### **3.6. Kultivierung unter Belüftung**

Man impfte sieben 250 mL Schüttelkolben mit drei Schikanen (geschlossene Apparatur), die mit jeweils 100 mL Nährlösung SM befüllt wurden, mit 5 mL einer 48 h alten Vorkultur an und schüttelte bei 250 rpm und 28°C mit einer Luftzufuhr von 0.3 vvm. Der achte (letzte) Kolben in der geschlossenen Apparatur wurde mit 100 mL sterilem Wasser befüllt. Dadurch wurde vermieden, dass sich die komplette  $^{18}\text{O}_2$ -Apparatur entleerte. Die Fermentation wurde nach 72 h beendet.

### **3.7. Kultivierung unter Sauerstoffzusatz**

Die Kultivierung unter Sauerstoffzusatz erfolgte analog zur Kultivierung unter Belüftung. Ab der 36. Fermentationsstunde schloss man die Sauerstoffapparatur an, spülte dreimal mit Stickstoff und leitete dann 1.2 L Sauerstoff ein. Während der weiteren Fermentation wurde der verbrauchte Sauerstoff ersetzt, woraus sich ein Gesamtverbrauch von 2 L ergab. Die Kultivierung wurde nach 48 h beendet.

## **4. Standardaufarbeitung**

### **4.1. Aufarbeitung ohne XAD-Zusatz**

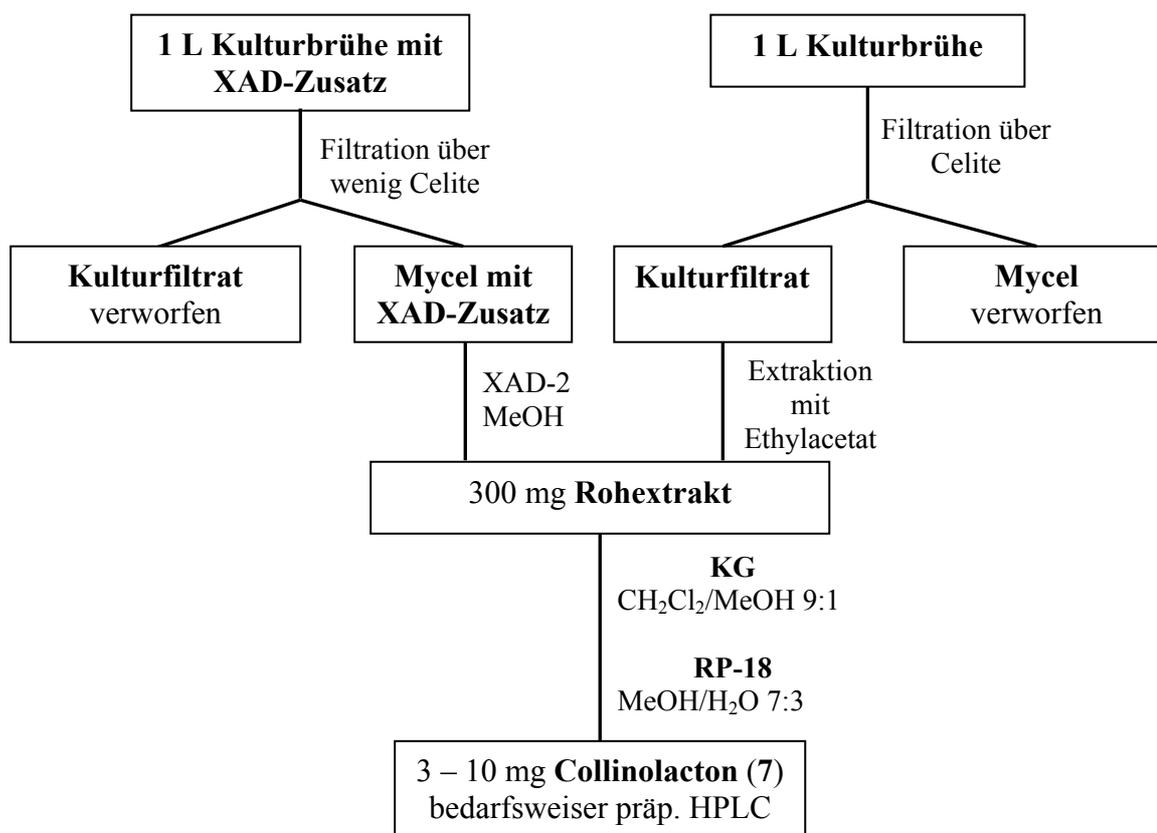
Die Aufarbeitung von Fermenter und Schüttelkultur erfolgte auf gleiche Weise. Die Kulturbrühe wurde auf pH = 5.0 eingestellt, mit Celite (1 Eßlöffel/L) versetzt und filtriert. Da sich im Mycel-Extrakt kein Collinolacton nachweisen lies, wurde das Mycel verworfen (Abbildung 105). Das Kulturfiltrat wurde mit doppelter Menge Ethylacetet extrahiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

#### 4.2. Aufarbeitung mit XAD-Zusatz

Die Aufarbeitung von Fermenter und Schüttelkultur erfolgte auf gleiche Weise. Die Kulturbrühe wurde in Kulturfiltrat und Mycel durch Filtration getrennt. Die Kulturbrühe konnte verworfen werden, da sich dort kein Collinolacton nachweisen ließ. Das mit Amberlite® XAD versetzte Mycel wurde 2 x mit 100 mL/L Aceton unter Rühren auf dem Magnetprüher eluiert. Nach Filtration wurden die vereinigten organischen Phasen am Vakuum eingengt.

#### 4.3. Isolierung des Collinolactons

Der ölige Rohextrakt wurde an Kieselgel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9:1, Schwerkraft) und RP-18 ( $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ , 7:3, Schwerkraft) chromatographiert. Aus Ansätzen (1 – 5 L) im Schüttelkolben erhielt man 5.3 mg/L Collinolacton (7) als weißes Pulver. Aus Ansätzen im 10 L Airlift-Fermenter konnten 11.4 mg/L Collinolacton (7) isoliert werden (Abbildung 105).

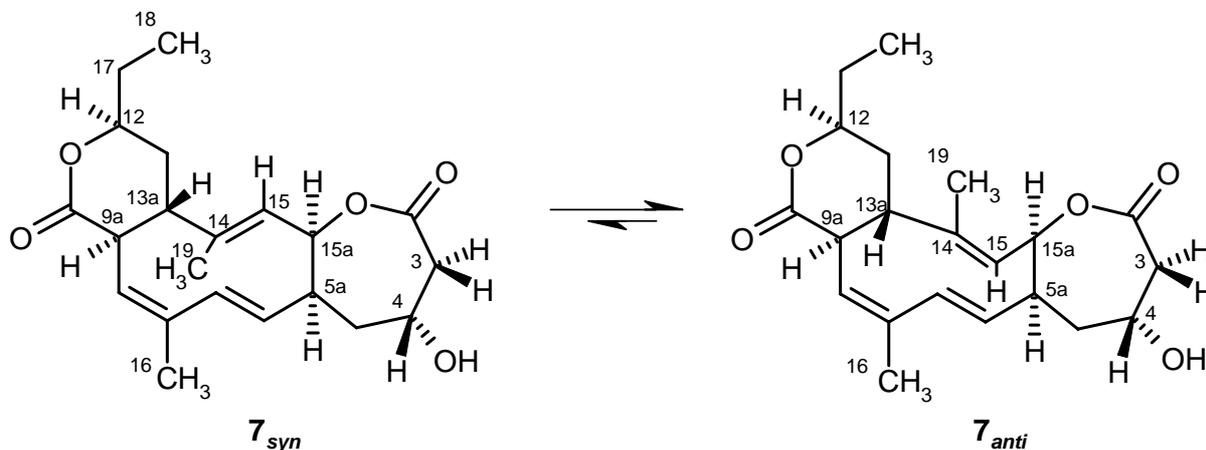


**Abbildung 105:** Flussdiagramm zur Aufarbeitung und Isolierung von Collinolacton (7).

## 5. Charakterisierung des Metaboliten

Collinolacton (7)

(6*E*,8*Z*,14*E*)12-Ethyl-4-hydroxy-8,14-dimethyl-4,5,5*a*,9*a*,12,13,13*a*,15*a*-octahydro-2*H*-pyrano-[3',4':7,8]cyclodeca[1,2-*b*]oxepine-2,10(3*H*)-dione



$C_{21}H_{28}O_5$  (360.45)

*R<sub>f</sub>*-Werte: 0.71 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1)

0.41 (MeOH/H<sub>2</sub>O 7:3)

Anfärbeverhalten: grün (Anisaldehyd)

gelb (Ehrlichs Reagenz)

ESI-MS: (positive Ionen)  $m/z$  (%) = 743.0 [2M+Na]<sup>+</sup>

ESI-MS: (negative Ionen)  $m/z$  (%) = 405.1 [M+HCO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, 764.9 [2M+HCO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>

HR-ESI-MS: berechnet  $m/z$  (%) = 361.20095 [M+H]<sup>+</sup>, 383.18290 [M+Na]<sup>+</sup>

gefunden  $m/z$  (%) = 361.20099 [M+H]<sup>+</sup>, 383.18302 [M+Na]<sup>+</sup>

IR (KBr):  $\tilde{\nu}_{max}$  = 3428, 2959, 2362, 1725, 1638, 1450, 1381, 1266, 1200, 1143, 1019 cm<sup>-1</sup>.

CD: (MeOH,  $c = 5.91 \cdot 10^{-5}$  mol/L)  $\lambda_{max}$  [ $\theta$ ] = 211 (-37214), 251 (8306) nm.

UV-VIS: (MeOH):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 240 (1350) ;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 240 (1350) ;

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 240 (1690) nm.

Drehwert :  $[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>,  $c = 5.91 \cdot 10^{-5}$  mol/L)

= -92° (MeOH,  $c = 2.5 \cdot 10^{-2}$  mol/L)

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>):** *7<sub>anti</sub>*  $\delta = 0.81$  (dd,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, 3H, 18-H<sub>3</sub>), 1.12 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>), 1.20 (m, 1H, 17-H<sub>a</sub>), 1.22 (m, 1H, 13-H<sub>a</sub>), 1.32 (d,  $J = 15$  Hz, 1H, 13-H<sub>b</sub>), 1.43 (m, 1H, 17-H<sub>b</sub>), 1.55 (m, 1H, 5-H<sub>a</sub>), 1.88 (s, 3H, 16-H<sub>3</sub>), 1.91 (dd,  $J = 4.75, 4.75$  Hz, 1H, 5-H<sub>b</sub>), 2.20 (ddd,  $J = 8.5, 8.5, 2$  Hz, 1H, 13a-H), 2.40 (dd,  $J = 4.5, 15$  Hz, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 2.65 (sept, 1H, 5a-H), 2.78 (dd,  $J = 8, 8$  Hz, 1H, 9a-H), 2.90 (dd,  $J = 10, 15$  Hz, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 3.62 (m, 1H, 4-H), 3.78 (m, 1H, 12-H), 4.80 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H, 15-H), 5.00 (dd,  $J = 16.5, 10$  Hz, 1H, 6-H), 5.30 (dd,  $J = 6, 6$  Hz, 1H, 15a-H), 5.62 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H, 7-H), 6.18 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 9-H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (150.8 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>):**  $\delta = 9.2$  (q, C-18), 12.5 (q, C-19), 19.0 (q, C-16), 28.2 (t, C-17), 32.4 (t, C-13), 34.6 (t, C-5), 40.3 (d, C-9a), 42.7 (t, C-3), 43.1 (d, C-5a), 46.3 (d, C-13a), 62.3 (d, C-4), 77.0 (d, C-12), 81.7 (d, C-15a), 124.4 (d, C-9), 126.5 (d, C-6), 133.1 (s, C-14), 134.0 (d, C-15), 135.0 (s, C-8), 139.0 (d, C-7), 170.3 (s, C-2), 172.4 (s, C-10) ppm.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):** *7<sub>anti</sub>*,  $\delta = 1.0$  (dd,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, 3H, 18-H<sub>3</sub>), 1.62 (m, 1H, 17-H<sub>a</sub>), 1.68 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>), 1.73 (m, 1H, 17-H<sub>b</sub>), 1.76 (m, 1H, 5-H<sub>a</sub>), 1.78 (m, 1H, 13-H<sub>a</sub>), 1.89 (m, 1H, 13-H<sub>b</sub>), 1.91 (s, 3H, 16-H<sub>3</sub>), 2.34 (dd,  $J = 15, 10$  Hz, 1H, 5-H<sub>b</sub>), 2.62 (ddd,  $J = 8.5, 8.5, 3$  Hz, 1H, 13a-H), 2.88 (m, 1H, 5a-H), 2.92 (dd,  $J = 15, 5$  Hz, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 3.14 (dd,  $J = 10, 15$  Hz, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 3.27 (dd,  $J = 8.5, 8.5$  Hz, 1H, 9a-H), 4.35 (m, 1H, 12-H), 4.46 (m, 1H, 4-H), 4.83 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1H, 15-H), 5.13 (dd,  $J = 16, 10$  Hz, 1H, 6-H), 5.61 (dd,  $J = 6.0, 6.0$  Hz, 1H, 15a-H), 5.74 (dd,  $J = 7.5, 2.5$  Hz, 1H, 9-H), 5.88 (d,  $J = 16.5$  Hz, H-7) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (150.8 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):**  $\delta = 9.6$  (q, C-18), 13.2 (q, C-19), 19.8 (q, C-16), 28.4 (t, C-17), 32.4 (t, C-13), 35.0 (t, C-5), 40.5 (d, C-9a), 42.7 (t, C-3), 43.0 (d, C-5a), 46.7 (d, C-13a), 62.8 (d, C-4), 78.4 (d, C-12), 82.2 (d, C-15a), 123.5 (d, C-9), 127.0 (d, C-6), 133.7 (s, C-14), 133.7 (d, C-15), 135.8 (s, C-8), 138.7 (d, C-7), 171.6 (s, C-2), 173.8 (s, C-10) ppm.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>):** *7<sub>syn</sub>*,  $\delta = 0.95$  (dd,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, 3H, 18-H<sub>3</sub>), 1.27 (m, 1H, 17-H<sub>a</sub>), 1.41 (m, 1H, 5-H<sub>a</sub>), 1.52 (m, 2H, 13-H<sub>2</sub>), 1.53 (m, 1H, 17-H<sub>b</sub>), 1.57 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>), 1.78 (m, 1H, 13a-H), 1.80 (s, 3H, 16-H<sub>3</sub>), 1.91 (m, 1H, 5-H<sub>b</sub>), 2.40 (dd,  $J = 15, 4$  Hz, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 2.47 (sept, 1H, 5a-H), 2.90 (m, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 2.91 (m, 1H, 9a-H), 3.61 (m, 1H, 4-H), 3.85 (m, 1H, 12-H), 4.50 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H, 15-H), 4.89 (dd,  $J = 16, 9.5$  Hz, 1H, 6-H), 5.10 (dd,  $J = 4.5, 4.5$  Hz, 1H, 15a-H), 5.60 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H, 7-H), 5.84 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, 9-H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (150.8 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>):**  $\delta = 9.9$  (q, C-18), 20.2 (q, C-16), 23.6 (q, C-19), 28.5 (t, C-17), 34.8 (t, C-13), 35.2 (t, C-5), 42.9 (t, C-3), 44.2 (d, C-5a), 45.1 (d, C-13a), 46.2 (d, C-9a),

62.2 (d, C-4), 77.2 (d, C-12), 79.5 (d, C-15a), 121.4 (d, C-9), 121.6 (d, C-15), 123.9 (d, C-6), 137.0 (s, C-8), 138.4 (d, C-7), 147.9 (s, C-14), 170.2 (s, C-2), 172.2 (s, C-10) ppm.

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):**  $7_{\text{syn}}$ ,  $\delta = 0.99$  (dd,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, , 3H, 18- $\text{H}_3$ ), 1.58 (s, 3H, 19- $\text{H}_3$ ), 1.62 (m, 1H, 17- $\text{H}_a$ ), 1.73 (m, 1H, 17- $\text{H}_b$ ), 1.77 (m, 1H, 5- $\text{H}_a$ ), 1.91 (s, 3H, 16- $\text{H}_3$ ), 2.04 (m, 2H, 13- $\text{H}_2$ ), 2.22 (m, 1H, 13a-H), 2.29 (dd,  $J = 15, 5$  Hz, , 1H, 3- $\text{H}_a$ ), 2.35 (dd,  $J = 15, 10$  Hz, 1H, 5- $\text{H}_b$ ), 2.76 (m, 1H, 5a-H), 3.14 (dd,  $J = 15, 10$  Hz, 1H, 3- $\text{H}_b$ ), 3.35 (dd,  $J = 12, 8.5$  Hz, 1H, 9a-H), 4.35 (m, 1H, 12-H), 4.46 (m, 1H, 4-H), 5.17 (dd,  $J = 16, 10$  Hz, 1H, 6-H), 5.26 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H, 15-H), 5.46 (dd,  $J = 5, 5$  Hz, 1H, 15a-H), 5.57 (dd,  $J = 8.5, 3$  Hz, 1H, 9-H), 5.94 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H, 7-H) ppm.

**$^{13}\text{C}$  NMR (150.8 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):**  $\delta = 9.9$  (q, C-18), 20.3 (q, C-16), 23.5 (q, C-19), 28.5 (t, C-17), 35.0 (t, C-13), 35.6 (t, C-5), 42.9 (t, C-3), 44.4 (d, C-5a), 45.3 (d, C-13a), 46.6 (d, C-9a), 62.7 (d, C-4), 78.6 (d, C-12), 80.1 (d, C-15a), 120.4 (d, C-9), 121.8 (d, C-15), 124.3 (d, C-6), 138.0 (s, C-8), 138.3 (d, C-7), 148.3 (s, C-14), 171.5 (s, C-2), 173.9 (s, C-10) ppm.

## 6. Biosyntheseuntersuchung unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre

### 6.1. Kalibrierung der HPLC

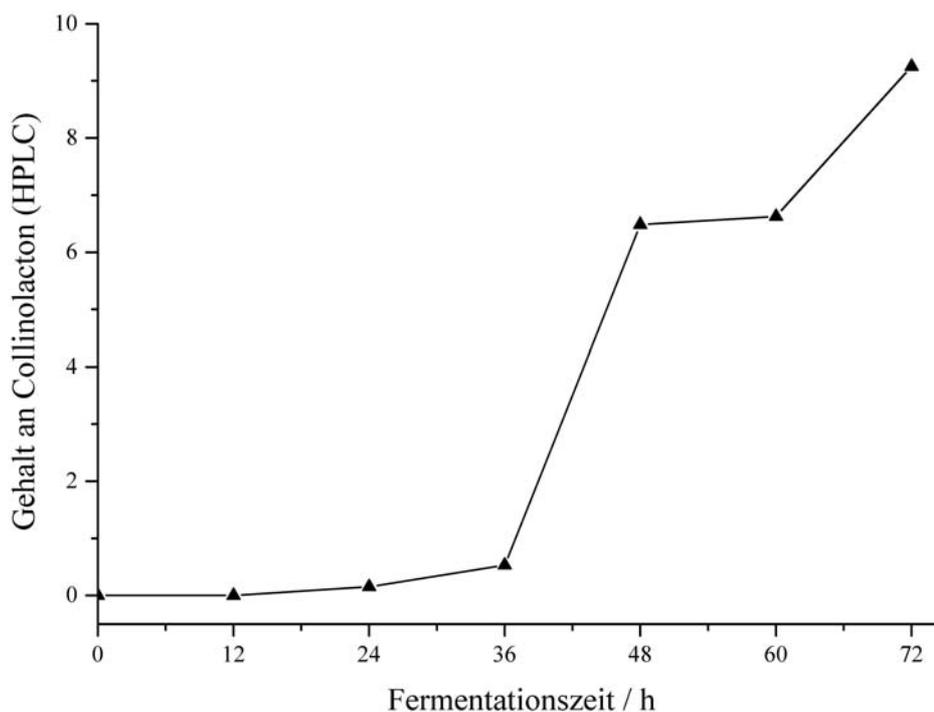
Zur Kalibrierung der HPLC (HPLC 1, Säule 1, Programm 1) wurden Lösungen von Collinolacton (7) in Methanol mit den Konzentrationen von 1.0 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL und 0.125 mg/mL hergestellt. Die Proben wurden per HPLC analysiert und so die Eichgerade ermittelt.

### 6.2. Analyse des Fermentationsverlaufs

Zur Bestimmung der zeitabhängigen Sekundärstoffproduktion von Collinolacton (7) wurde der Stamm Tü 1892 analog zur Kultivierung unter Belüftung in einem geschlossenen System inkubiert.

Ab der sechsten Fermentationsstunde wurde alle sechs Inkubationsstunden ein Kolben (100 mL) geerntet. Um das Fermentationsvolumen nicht zu verringern wurde nach der Ernte 100 mL steriles Wasser in den leeren Kolben gefüllt und weiter inkubiert. Die Proben wurden in Kulturfiltrat und Mycel getrennt. Das Kulturfiltrat wurde mit Ethylacetat (2 x 50 mL) extrahiert und die organischen Phasen im Vakuum eingeengt. Von den Rohextrakten wurde eine methanolische Lösung mit der Konzentration 3 mg/mL angefertigt, die mittels HPLC

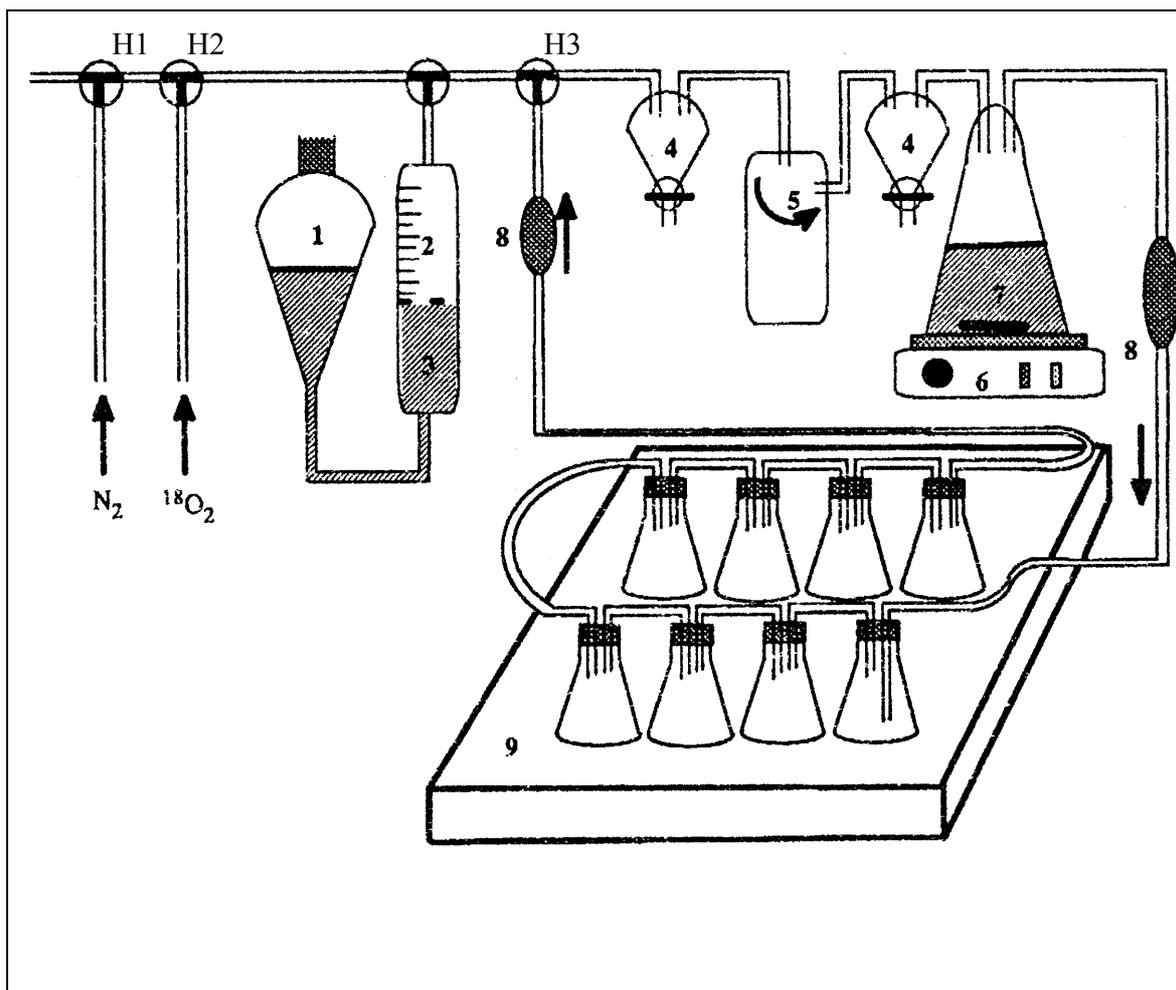
chromatographiert wurde. Mit Hilfe der Kalibrierungsgrade konnte der Produktionsverlauf des Collinolactons (7) verfolgt werden (Abbildung 106).



**Abbildung 106:** Fermentationskurve des Collinolactons (7) aus dem Stamm Tü 1892.

### 6.3. Fütterungsexperiment mit [ $^{18}\text{O}_2$ ]-Gas

Das Fütterungsexperiment wurde analog zur Kultivierung unter Sauerstoffzusatz (s. B. XI3.7) durchgeführt. Aufgrund des Fermentationsverlaufs wurden die Kolben ab der 36. Inkubationsstunde an die  $^{18}\text{O}_2$ -Anlage (Abbildung 107) angeschlossen und nach dreimaligem Spülen mit Stickstoff mit [ $^{18}\text{O}_2$ ]-Gas geflutet. Die Fermentation wurde in der 48. Inkubationsstunde abgebrochen.



**Abbildung 107:** Schematische Darstellung einer  $^{18}\text{O}_2$ -Apparatur. 1 = Ausgleichsgefäß, 2 = Gas-Vorrats-behälter, 3 =  $\text{CuSO}_4$ -Lösung, 4 = Wasserfalle, 5 = Umluftpumpe, 6 = Magnetrührer, 7 = 5 N  $\text{KOH}$ -Lösung, 8 = Sterilfilter, 9 = Schüttler.

## XII Derivatisierungen von Collinolacton

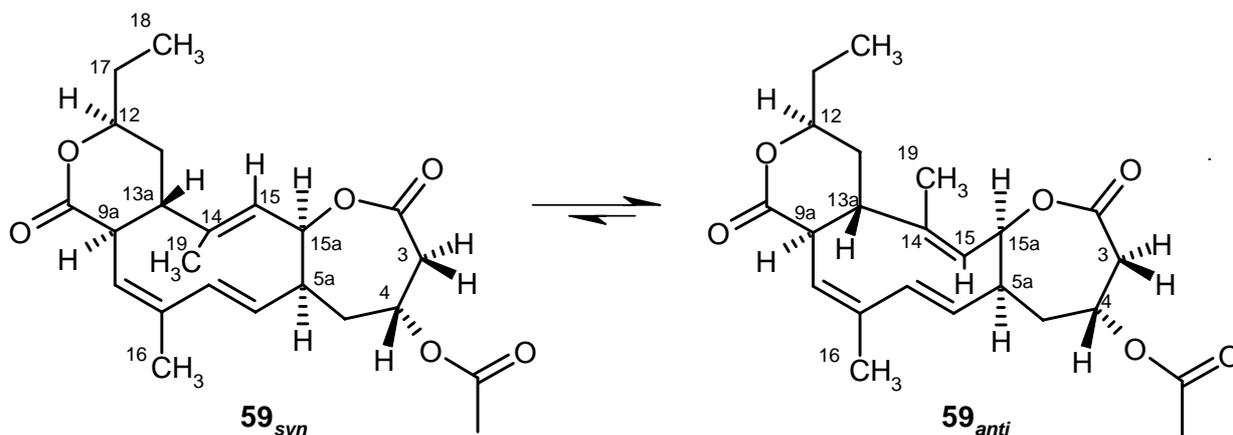
### 1. 4-*O*-Acetyllollinlacton (59)

#### 1.1. Darstellung durch Umsatz mit Acetanhydrid

Collinolacton (7) (17.3 mg, 0.048 mmol) wurde in Pyridin (1 mL) gelöst und unter Eiskühlung mit frisch destilliertem Acetanhydrid (2 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wurde 16 h bis zur quantitativen Umsetzung bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Eiswasser (5 mL) hydrolysiert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit Dichlormethan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Vakuum eingedunstet. Reste Pyridins

wurden azeotrop mit Toluol entfernt. Auftrennung des erhaltenen Rückstands an Kieselgel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9:1) lieferten 18 mg (0.044 mmol, 91%) 4-*O*-(Acetyl)collinolacton (**59**).

## 1.2. Charakterisierung des Metaboliten 4-*O*-Acetylcollinolacton (**59**)



$\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{BrO}_6$  (402.49)

***R<sub>f</sub>*-Werte:** 0.91 ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9:1)

0.31 ( $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  7:3)

**Anfärbeverhalten:** blau (Anisaldehyd)

blassgelb (Ehrlichs Reagenz)

**ESI-MS:** (positive Ionen)  $m/z$  (%) = 425.2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , 827.0  $[\text{2M}+\text{Na}]^+$

**ESI-MS:** (negative Ionen)  $m/z$  (%) = 447.1  $[\text{M}+\text{HCO}_2]^-$ , 803.1  $[\text{2M}-\text{H}]^-$

**HR-ESI-MS:** berechnet  $m/z$  (%) = 403.21152  $[\text{M}+\text{H}]^+$

gefunden  $m/z$  (%) = 403.21152  $[\text{M}+\text{H}]^+$

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}_{\text{max}}$  = 3443, 2367, 1739, 1638, 1450, 1376, 1237, 1160, 1108, 1023  $\text{cm}^{-1}$ .

**CD:** ( $\text{MeOH}$ ,  $c = 3.72 \cdot 10^{-5}$  mol/L)  $\lambda_{\text{max}}$  [ $\theta$ ] = 211 (-66712), 252 (18002) nm.

**UV-VIS:** ( $\text{MeOH}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 243 (4700) ;

( $\text{MeOH}/\text{HCl}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 239 (3230) ;

( $\text{MeOH}/\text{NaOH}$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 238 (3500) nm.

**Drehwert :**  $[\alpha]_D^{20} = 2^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 3.72 \cdot 10^{-5}$  mol/L)

= - 20° ( $\text{MeOH}$ ,  $c = 0.1$  mol/L)

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>): 59<sub>anti</sub>**,  $\delta = 0.81$  (dd,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, 3H, 18-H<sub>3</sub>), 1.12 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>), 1.27 (m, 1H, 17-H<sub>a</sub>), 1.30 (m, 1H, 13-H<sub>a</sub>), 1.40 (d,  $J = 15$  Hz, 1H, 13-H<sub>b</sub>), 1.48 (m, 1H, 17-H<sub>b</sub>), 1.54 (m, 1H, 5-H<sub>a</sub>), 1.62 (s, 3H, 2'-H<sub>3</sub>), 1.84 (s, 3H, 16-H<sub>3</sub>), 2.15 (dd,  $J = 4.75, 4.75$  Hz, 1H, 5-H<sub>b</sub>), 2.24 (ddd,  $J = 8.5, 8.5, 2$  Hz, 1H, 13a-H), 2.32 (dd,  $J = 15, 4.5$  Hz, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 2.50 (Septett, 1H, 5a-H), 2.85 (dd,  $J = 8, 8$  Hz, 1H, 9a-H), 3.19 (dd,  $J = 15, 10$  Hz, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 3.86 (m, 1H, 12-H), 4.78 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H, 15-H), 4.94 (dd,  $J = 16.5, 10$  Hz, 1H, 6-H), 4.98 (m, 1H, 4-H), 5.29 (dd,  $J = 6, 6$  Hz, 1H, 15a-H), 5.66 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H, 7-H), 6.13 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 9-H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (150.8 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>):**  $\delta = 9.6$  (q, C-18), 12.5 (q, C-19), 19.8 (q, C-16), 20.4 (q, C-2'), 28.3 (t, C-17), 32.4 (t, C-13), 31.6 (t, C-5), 40.4 (d, C-9a), 40.3 (t, C-3), 43.9 (d, C-5a), 46.2 (d, C-13a), 65.3 (d, C-4), 77.1 (d, C-12), 81.5 (d, C-15a), 124.5 (d, C-9), 125.7 (d, C-6), 133.2 (s, C-14), 133.8 (d, C-15), 135.0 (d, C-8), 139.4 (d, C-7), 168.9 (s, C-1'), 169.3 (s, C-2), 172.3 (s, C-10) ppm.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>): 59<sub>syn</sub>**,  $\delta = 0.92$  (dd,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, 3H, 18-H<sub>3</sub>), 1.28 (m, 1H, 17-H<sub>a</sub>), 1.42 (m, 1H, 5-H<sub>a</sub>), 1.49 (m, 1H, 17-H<sub>b</sub>), 1.66 (s, 3H, 2'-H<sub>3</sub>), 1.54 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>), 1.57 (m, 2H, 13-H<sub>2</sub>), 1.82 (s, 3H, 16-H<sub>3</sub>), 1.83 (m, 1H, 13a-H), 2.15 (dd,  $J = 4.75, 4.75$  Hz, 1H, 5-H<sub>b</sub>), 2.38 (m, 1H, 5a-H), 2.40 (dd,  $J = 15, 4.5$  Hz, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 2.95 (dd,  $J = 8, 8$  Hz, 1H, 9a-H), 3.18 (dd,  $J = 15, 10$  Hz, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 3.91 (m, 1H, 12-H), 4.62 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H, 15-H), 4.88 (dd,  $J = 16.5, 10$  Hz, 1H, 6-H), 4.91 (dd,  $J = 6, 6$  Hz, 1H, 15a-H), 4.98 (m, 1H, 4-H), 5.82 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H, 7-H), 5.84 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 9-H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (150.8 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>):**  $\delta = 9.9$  (q, C-18), 20.2 (q, C-16), 20.5 (q, C-2'), 23.6 (q, C-19), 28.5 (t, C-17), 32.2 (t, C-5), 34.8 (t, C-13), 40.2 (t, C-3), 44.7 (d, C-5a), 45.0 (d, C-13a), 46.3 (d, C-9a), 65.2 (d, C-4), 77.2 (d, C-12), 79.5 (d, C-15a), 121.2 (d, C-15), 121.5 (d, C-9), 123.4 (d, C-6), 137.0 (s, C-8), 138.7 (d, C-7), 148.5 (s, C-14), 169.0 (s, C-1'), 169.1 (s, C-2), 172.4 (s, C-10) ppm.

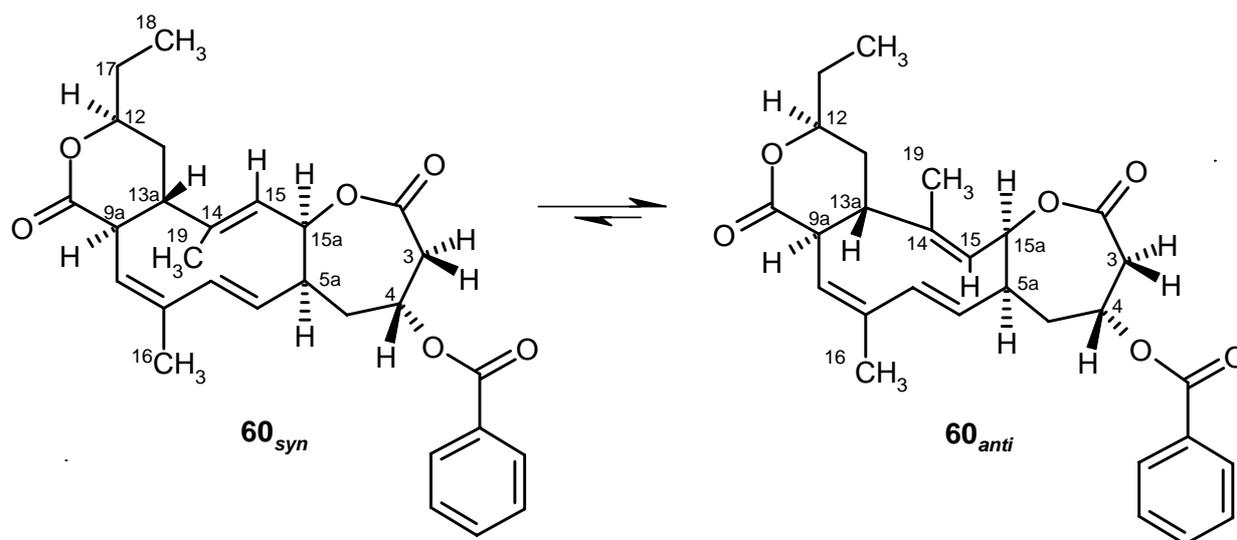
## 2. 4-O-Benzoylcollinolacton (60)

### 2.1. Darstellung durch Veresterung mit Brombenzoesäure

Eine Lösung von 12.5 mg (0.035 mmol, 1 eq.) Collinolacton (7) in 4 mL wasserfreiem Dichlormethan wurde mit 6.4 mg (0.053 mmol, 1.5 eq.) Brombenzoesäure, 10.05 mg (0.053

mmol, 1.5 eq.) *N*'-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbo-diimid-hydrochlorid (EDCI) sowie katalytischen Mengen 4-*N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) versetzt. Das Gemisch wurde 19 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei der Reaktionsumsatz durch mehrmalige, nachträgliche Gabe von zusätzlicher Brombenzoesäure sowie EDCI in Richtung des Produkts gedrängt wurde. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit Wasser sowie gesättigter Ammoniumchlorid-, Natriumhydrogencarbonat und Kochsalzlösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum eingengt. Der erhaltene Rückstand (47 mg) wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 99:1) gereinigt und lieferte 6.8 mg (0.015 mmol, 42%) 4-*O*-Benzoylcollinolacton (**60**).

## 2.2. Charakterisierung des Metaboliten 4-*O*-Benzoylcollinolacton (**60**)



**C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub>** (464.56)

**R<sub>f</sub>-Werte:** 0.92 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1)

0.12 (MeOH/ H<sub>2</sub>O 7:3)

**Anfärbeverhalten:** blau (Anisaldehyd)

blassgelb (Ehrlichs Reagenz)

**ESI-MS:** (positive Ionen) *m/z* (%) = 487.2 [M+Na]<sup>+</sup>, 519.3 [M-H+2Na]<sup>+</sup>, 951.1 [2M+Na]<sup>+</sup>.

**ESI-MS:** (negative Ionen) *m/z* (%) = 509.1 [M+HCO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>.

**HR-ESI-MS:** berechnet *m/z* (%) = 465.22717 [M+H]<sup>+</sup>, 482.25371 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

gefunden *m/z* (%) = 465.22730 [M+H]<sup>+</sup>, 482.25389 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}_{max} = 3435, 2854, 2364, 1730, 1629, 1451, 1366, 1267, 1183, 1108, 1022, 714$   $\text{cm}^{-1}$ .

**CD:** (MeOH,  $c = 3.34 \cdot 10^{-5}$  mol/L)  $\lambda_{max} [\theta] = 211$  (-200145), 248 (85161) nm.

**UV-VIS:** (MeOH):  $\lambda_{max} (\epsilon) = 229$  (14700), 248 sh (6290);

(MeOH/HCl):  $\lambda_{max} (\epsilon) = 229$  (14970), 251 sh (6290);

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{max} (\epsilon) = 222$  (14520), 250 (6290) nm.

**Drehwert :**  $[\alpha]_D^{20} = 20^\circ$  ( $\text{CHCl}_3$ ,  $c = 3.34 \cdot 10^{-5}$  mol/L)

=  $+8^\circ$  (MeOH,  $c = 5 \cdot 10^{-2}$  mol/L)

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):** **60<sub>anti</sub>**,  $\delta = 0.84$  (dd,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, 3H, 18-H<sub>3</sub>), 1.05 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>), 1.20 (m, 1H, 17-H<sub>a</sub>), 1.22 (m, 1H, 13-H<sub>a</sub>), 1.32 (d,  $J = 15$  Hz, 1H, 13-H<sub>b</sub>), 1.43 (m, 1H, 17-H<sub>b</sub>), 1.55 (m, 1H, 5-H<sub>a</sub>), 1.85 (s, 3H, 16-H<sub>3</sub>), 2.20 (ddd,  $J = 8.5, 8.5, 2$  Hz, 1H, 13a-H), 2.30 (dd,  $J = 4.75, 4.75$  Hz, 1H, 5-H<sub>b</sub>), 2.34 (dd,  $J = 15, 4.5$  Hz, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 2.52 (Septett, 1H, 5a-H), 2.75 (dd,  $J = 8, 8$  Hz, 1H, 9a-H), 3.24 (dd,  $J = 15, 10$  Hz, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 3.80 (m, 1H, 12-H), 4.78 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H, 15-H), 4.95 (dd,  $J = 16.5, 10$  Hz, 1H, 6-H), 5.18 (m, 1H, 4-H), 5.24 (dd,  $J = 6, 6$  Hz, 1H, 15a-H), 5.55 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H, 7-H), 6.14 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 9-H), 7.16 (ddd,  $J = 8.0, 7.5, 1.0$  Hz, 1H, 4'-H, 6'-H), 7.21 (ddd,  $J = 8.0, 7.5, 1.0$  Hz, 1H, 5'-H), 8.09 (dd,  $J = 8.0, 1.0$  Hz, 1H, 3'-H, 7'-H) ppm.

**$^{13}\text{C}$  NMR (150.8 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):**  $\delta = 9.6$  (q, C-18), 12.5 (q, C-19), 19.7 (q, C-16), 28.3 (t, C-17), 31.4 (t, C-5), 32.5 (t, C-13), 40.4 (d, C-9a), 40.6 (d, C-3), 44.3 (d, C-5a), 46.2 (d, C-13a), 66.1 (d, C-4), 77.0 (d, C-12), 81.4 (d, C-15a), 124.6 (d, C-9), 125.2 (d, C-6), 128.7 (d, C-4', C-6'), 129.7 (d, C-3', C-7'), 130.5 (s, C-2'), 133.1 (s, C-14), 133.4 (d, C-5'), 133.9 (d, C-15), 134.9 (s, C-8), 139.7 (d, C-7), 164.9 (s, C-1'), 169.1 (s, C-2), 172.1 (s, C-10) ppm.

**$^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):** **60<sub>sym</sub>**,  $\delta = 0.88$  (dd,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, 3H, 18-H<sub>3</sub>), 1.27 (m, 1H, 17-H<sub>a</sub>), 1.41 (m, 1H, 5-H<sub>a</sub>), 1.53 (m, 1H, 17-H<sub>b</sub>), 1.53 (m, 2H, 13-H<sub>2</sub>), 1.56 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>), 1.59 (ddd,  $J = 8.5, 8.5, 2$  Hz, 1H, 13a-H), 1.81 (s, 3H, 16-H<sub>3</sub>), 1.91 (dd,  $J = 4.75, 4.75$  Hz, 1H, 5-H<sub>b</sub>), 2.46 (dd,  $J = 15, 4.5$  Hz, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 2.50 (Septett, 1H, 5a-H), 2.84 (dd,  $J = 8, 8$  Hz, 1H, 9a-H), 3.26 (dd,  $J = 15, 10$  Hz, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 3.80 (m, 1H, 12-H), 4.67 (d,  $J = 6.5$  Hz, 1H, 15-H), 4.88 (dd,  $J = 16.5, 10$  Hz, 1H, 6-H), 5.00 (dd,  $J = 6, 6$  Hz, 1H, 15a-H), 5.18 (m, 1H, 4-H), 5.50 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H, 7-H), 5.84 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 9-H), 7.10 (ddd,  $J = 8.0, 7.5, 1.0$  Hz, 1H, 4'-H, 6'-H), 7.21 (ddd,  $J = 8.0, 7.5, 1.0$  Hz, 1H, 5'-H), 8.09 (dd,  $J = 8.0, 1.0$  Hz, 1H, 3'-H, 7'-H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (150.8 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):  $\delta = 9.8$  (q, C-18), 20.2 (q, C-16), 23.7 (q, C-19), 28.5 (t, C-17), 32.2 (t, C-5), 34.6 (t, C-13), 40.2 (t, C-3), 44.9 (d, C-5a), 45.0 (d, C-13a), 46.4 (d, C-9a), 66.1 (d, C-4), 77.2 (d, C-12), 79.5 (d, C-15a), 121.2 (d, C-9), 121.7 (d, C-15), 123.3 (d, C-6), 128.7 (d, C-4', C-6'), 129.7 (d, C-3', C-7'), 130.4 (d, C-2'), 133.4 (d, C-5'), 136.9 (s, C-8), 138.8 (d, C-7), 148.6 (s, C-14), 165.2 (s, C-1'), 168.3 (s, C-2), 172.0 (s, C-10) ppm.

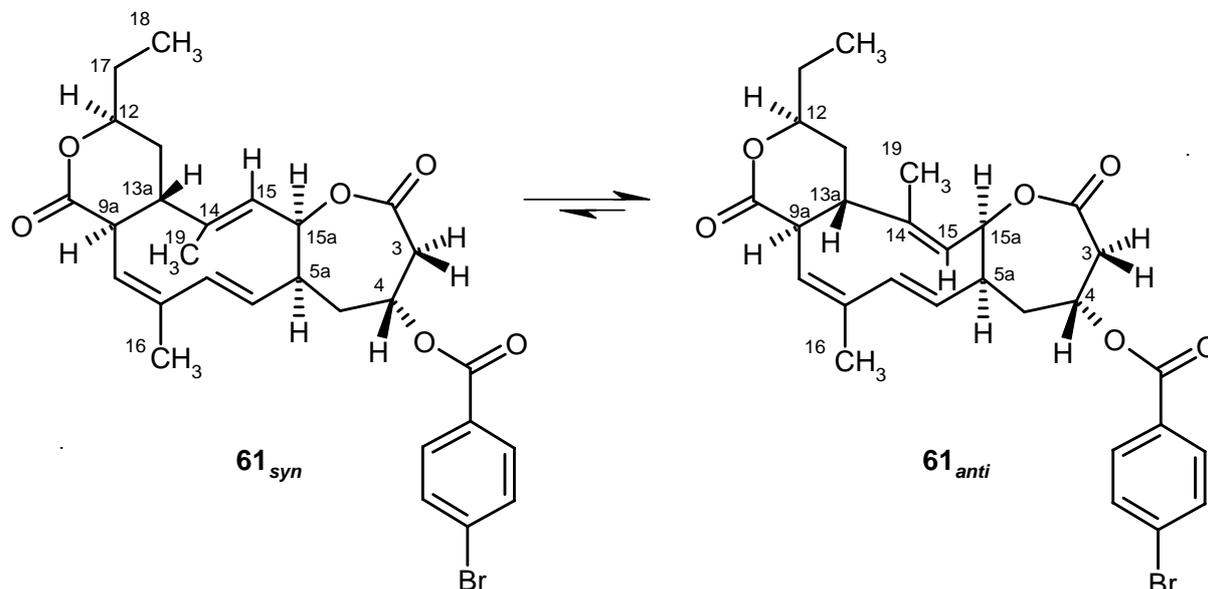
### 3. 4-*O-p*-Brombenzoylcollinolacton (61)

#### 3.1. Darstellung durch Umsatz mit *p*-Brombenzoylchlorid

8.8 mg (0.024 mmol, 1 eq.) Collinolacton (7) wurden unter Argonatmosphäre in 5 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst und mit 41.5 mg (0.20 mmol, 8.3 eq.) *p*-Brombenzoylchlorid versetzt. Zu der auf 0°C gekühlten Lösung gab man 23.4 mg (0.19 mmol, 7.8 eq.) 4-*N,N*-Dimethylaminopyridin (DMAP) und ließ auf Raumtemperatur erwärmen. Nach 24 h wurde das Reaktionsgemisch auf Eis gegossen und 30 min gerührt. Anschließend extrahierte man die wässrige Phase mit Ethylacetat (3 x 15 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden am Vakuum entfernt. Säulenchromatographische Auftrennung des erhaltenen Rückstands an Kieselgel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9:1) und Sephadex LH-20 (Eluent:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) lieferten 5.1 mg (0.009 mmol, 39%) 4-*O-p*-Brombenzoylcollinolacton (61).

#### 3.2. Darstellung durch Veresterung mit *p*-Brombenzoesäure

Eine Lösung von 51.2 mg (0.14 mmol, 1 eq.) Collinolacton (7) in 4 mL wasserfreiem Dichlormethan wurde mit 42.83 mg (0.21 mmol, 1.5 eq.) *p*-Brombenzoesäure, 40.80 mg (0.21 mmol, 1.5 eq.) *N*'-(3-Dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbo-diimid-hydrochlorid (EDCI) sowie katalytischen Mengen DMAP versetzt. Das Gemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei der Reaktionsumsatz durch mehrmalige, nachträgliche Gabe von zusätzlicher *p*-Brombenzoesäure sowie EDCI in Richtung des Produkts geleitet wurde. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit Wasser sowie gesättigter Ammoniumchlorid-, Natriumhydrogencarbonat und Kochsalzlösung extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden im Vakuum eingeeengt. Der erhaltene Rückstand (65.3 mg) wurde säulenchromatographisch an Kieselgel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9:1) gereinigt und lieferte 36.2 mg (0.067 mmol, 48%) 4-*O-p*-Brombenzoylcollinolacton (61).

3.3. Charakterisierung des Metaboliten 4-*O-p*-Brombenzoylcollinolacton (61)

$C_{28}H_{31}BrO_6$  (543.46)

***R<sub>f</sub>*-Werte:** 0.93 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1)

0.08 (MeOH/ H<sub>2</sub>O 7:3)

**Anfärbeverhalten:** graublau (Anisaldehyd)

blassgelb (Ehrlichs Reagenz)

**ESI-MS:** (positive Ionen)  $m/z$  (%) = 566.5 [M+Na]<sup>+</sup>, 1108.9 [2M+Na]<sup>+</sup>.

**ESI-MS:** (negative Ionen)  $m/z$  (%) = 586.9 [M+HCO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, 1130.8 [2M+HCO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>.

**HR-ESI-MS:** berechnet  $m/z$  (%) = 543.13768 Br<sup>79</sup>[M+H]<sup>+</sup>, 545.13563 Br<sup>81</sup>[M+H]<sup>+</sup>.

gefunden  $m/z$  (%) = 543.13761 Br<sup>79</sup>[M+H]<sup>+</sup>, 545.13563 Br<sup>81</sup>[M+H]<sup>+</sup>.

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}_{max}$  = 4329, 2868, 2363, 1722, 1638, 1589, 1443, 1392, 1276, 1178, 1107, 1009, 757 cm<sup>-1</sup>.

**CD:** (MeOH,  $c = 3.15 \cdot 10^{-5}$  mol/L)  $\lambda_{max}$  [ $\theta$ ] = 211 (-22896), 254 (14567) nm.

**UV-VIS:** (MeOH):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 244 (22860) ;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 244 (22860) ;

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 242 (21580) nm.

**Drehwert :**  $[\alpha]_D^{20} = 0^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>,  $c = 3.15 \cdot 10^{-5}$  mol/L)

= + 8° (MeOH,  $c = 5 \cdot 10^{-2}$  mol/L)

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 61<sub>anti</sub>** δ = 1.00 (dd, *J* = 7.5, 7.5 Hz, 3H, 18-H<sub>3</sub>), 1.62 (m, 1H, 17-H<sub>a</sub>), 1.68 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>), 1.73 (m, 1H, 17-H<sub>b</sub>), 1.76 (m, 1H, 5-H<sub>a</sub>), 1.80 (m, 1H, 13-H<sub>a</sub>), 1.90 (d, *J* = 15 Hz, 1H, 13-H<sub>b</sub>), 1.92 (s, 3H, 16-H<sub>3</sub>), 2.25 (dd, *J* = 15, 10 Hz, 1H, 5-H<sub>b</sub>), 2.64 (ddd, *J* = 8.5, 8.5, 3 Hz, 1H, 13a-H), 2.85 (m, 1H, 5a-H), 3.07 (dd, *J* = 16, 5 Hz, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 3.26 (dd, *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H, 9a-H), 3.45 (dd, *J* = 16, 10 Hz, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 4.34 (m, 1H, 12-H), 4.87 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, 15-H), 5.17 (dd, *J* = 16.5, 10 Hz, 1H, 6-H), 5.54 (m, 1H, 4-H), 5.64 (dd, *J* = 6, 6 Hz, 1H, 15a-H), 5.77 (d, *J* = 8 Hz, 1H, 9-H), 5.91 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, 7-H), 7.65 (d, *J* = 9 Hz, 1H, 4'-H, 6'-H), 7.92 (d, *J* = 9 Hz, 1H, 3'-H, 7'-H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (150.8 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):** δ = 9.5 (q, C-18), 13.2 (q, C-19), 19.7 (q, C-16), 28.3 (t, C-17), 31.8 (t, C-5), 32.3 (t, C-13), 40.4 (t, C-3), 40.8 (d, C-9a), 44.0 (d, C-5a), 46.5 (d, C-13a), 66.4 (d, C-4), 78.3 (d, C-12), 82.1 (d, C-15a), 123.7 (d, C-9), 125.9 (d, C-6), 129.0 (s, C-5'), 131.2 (d, C-4', C-6'), 131.4 (s, C-2'), 132.2 (d, C-3', C-7'), 133.5 (d, C-15), 133.8 (s, C-14), 135.7 (s, C-8), 139.4 (d, C-7), 165.0 (s, C-1'), 170.3 (s, C-2), 173.5 (s, C-10) ppm.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 61<sub>sym</sub>** δ = 1.00 (dd, *J* = 7.5, 7.5 Hz, 3H, 18-H<sub>3</sub>), 1.61 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>), 1.62 (m, 1H, 17-H<sub>a</sub>), 1.73 (m, 1H, 17-H<sub>b</sub>), 1.76 (m, 1H, 5-H<sub>a</sub>), 1.93 (s, 3H, 16-H<sub>3</sub>), 1.95 (m, 2H, 13-H<sub>2</sub>), 2.25 (dd, *J* = 15, 10 Hz, 1H, 5-H<sub>b</sub>), 2.25 (ddd, *J* = 8.5, 8.5, 3 Hz, 1H, 13a-H), 2.74 (Septett, 1H, 5a-H), 3.07 (dd, *J* = 16, 5 Hz, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 3.35 (dd, *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H, 9a-H), 3.45 (dd, *J* = 16, 10 Hz, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 4.44 (m, 1H, 12-H), 5.18 (dd, *J* = 16.5, 10 Hz, 1H, 6-H), 5.26 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H, 15-H), 5.47 (dd, *J* = 6, 6 Hz, 1H, 15a-H), 5.54 (m, 1H, 4-H), 5.60 (d, *J* = 8 Hz, 1H, 9-H), 5.96 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H, 7-H), 7.60 (d, *J* = 9 Hz, 1H, 4'-H, 6'-H), 7.86 (d, *J* = 9 Hz, 1H, 3'-H, 7'-H) ppm.

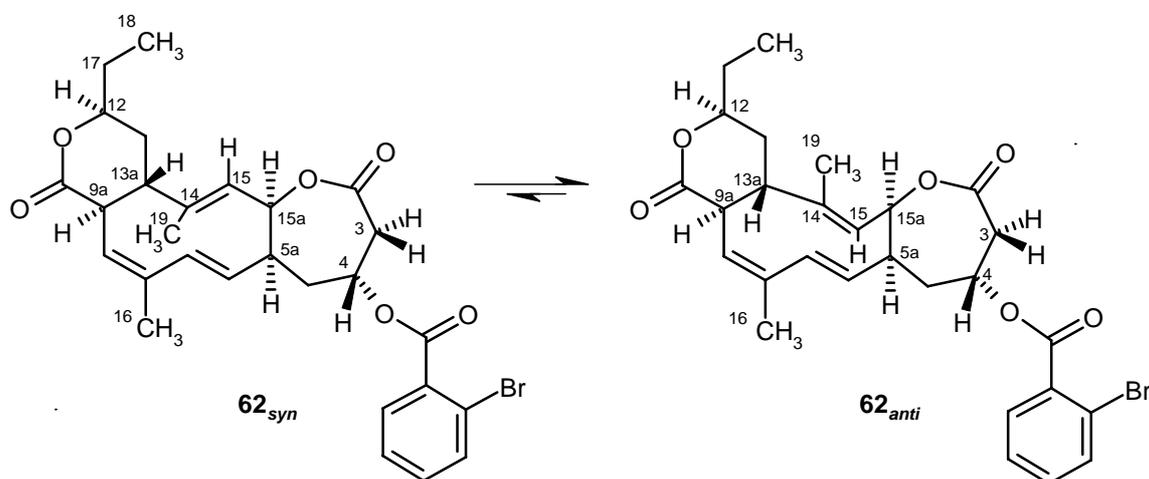
**<sup>13</sup>C NMR (150.8 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):** δ = 9.8 (q, C-18), 20.3 (q, C-16), 23.3 (q, C-19), 28.4 (t, C-17), 32.6 (t, C-5), 34.9 (t, C-13), 40.5 (t, C-3), 44.9 (d, C-5a), 45.2 (d, C-13a), 46.2 (d, C-9a), 66.3 (d, C-4), 78.4 (d, C-12), 80.1 (d, C-15a), 120.5 (d, C-9), 121.3 (d, C-15), 123.7 (d, C-6), 128.8 (s, C-5'), 131.4 (d, C-4', C-6'), 131.5 (s, C-2'), 132.5 (d, C-3', C-7'), 135.7 (s, C-8), 139.4 (d, C-7), 148.8 (s, C-14), 165.0 (s, C-1'), 170.3 (s, C-2), 173.5 (s, C-10) ppm.

## 4. 4-*O*-*o*-Brombenzoylcollinolacton (62)

### 4.1. Darstellung durch Veresterung mit *o*-Brombenzoesäure

Eine Lösung von 50.5 mg (0.14 mmol, 1 eq.) Collinolacton (7) in 4 mL wasserfreiem Dichlormethan wurde mit 42.22 mg (0.21 mmol, 1.5 eq.) *o*-Brombenzoesäure, 40.22 mg (0.21 mmol, 1.5 eq.) EDCI sowie katalytischen Mengen DMAP versetzt. Das Gemisch wurde 24 h bei Raumtemperatur in einer Argonatmosphäre gerührt, wobei der Reaktionsumsatz durch mehrmalige, nachträgliche Gabe von zusätzlicher *o*-Brombenzoesäure sowie EDCI in Richtung des Produkts gedrängt wurde. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit Wasser sowie gesättigter Ammoniumchlorid-, Natriumhydrogencarbonat und Kochsalzlösung extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über Natriumsulfat wurde diese im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Der erhaltene Rückstand (71.5 mg) wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1) getrennt. Es wurden 54.4 mg (0.10 mmol, 72%) 4-*O*-*o*-Brombenzoylcollinolacton (62) erhalten.

### 4.2. Charakterisierung des Metaboliten 4-*O*-*o*-Brombenzoylcollinolacton (62)



C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>BrO<sub>6</sub> (543.46)

**R<sub>f</sub>-Werte:** 0.93 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1)

0.09 (MeOH/ H<sub>2</sub>O 7:3)

**Anfärbeverhalten:** blau (Anisaldehyd)

blassgelb (Ehrlichs Reagenz)

**ESI-MS:** (positive Ionen) *m/z* (%) = 1108.9 [2M+Na]<sup>+</sup>.

**ESI-MS:** (negative Ionen)  $m/z$  (%) = 540.9 [M-H]<sup>-</sup>.

**HR-ESI-MS:** berechnet  $m/z$  (%) = 543.13768 Br<sup>79</sup>[M+H]<sup>+</sup>, 545.13563 Br<sup>81</sup>[M+H]<sup>+</sup>.

gefunden  $m/z$  (%) = 543.13762 Br<sup>79</sup>[M+H]<sup>+</sup>, 545.13549 Br<sup>81</sup>[M+H]<sup>+</sup>.

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}_{max}$  = 3444, 2360, 1733, 1590, 1443, 1370, 1286, 1249, 1191, 1122, 1029, 747 cm<sup>-1</sup>.

**CD:** (MeOH, c = 2.41 · 10<sup>-5</sup> mol/L)  $\lambda_{max}$  [ $\theta$ ] = 207 (-234128), 250 (82636) nm.

**UV-VIS:** (MeOH):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 237 (9540) ;

(MeOH/HCl):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 234 (10370);

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 239 (8710) nm.

**Drehwert :**  $[\alpha]_D^{20}$  = + 8° (CHCl<sub>3</sub>, c = 2.41 · 10<sup>-5</sup> mol/L).

= + 16° (MeOH, c = 5 · 10<sup>-2</sup> mol/L).

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):** **62<sub>anti</sub>**  $\delta$  = 0.99 (dd,  $J$  = 7.5, 7.5 Hz, 3H, 18-H<sub>3</sub>), 1.62 (m, 1H, 17-H<sub>a</sub>), 1.65 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>), 1.71 (m, 1H, 17-H<sub>b</sub>), 1.78 (m, 1H, 5-H<sub>a</sub>), 1.80 (m, 1H, 13-H<sub>a</sub>), 1.90 (d,  $J$  = 15 Hz, 1H, 13-H<sub>b</sub>), 1.92 (s, 3H, 16-H<sub>3</sub>), 2.23 (m, 1H, 5-H<sub>b</sub>), 2.63 (ddd,  $J$  = 8.5, 8.5, 3 Hz, 1H, 13a-H), 2.90 (Septett, 1H, 5a-H), 3.17 (dd,  $J$  = 15, 5 Hz, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 3.25 (dd,  $J$  = 8, 8 Hz, 1H, 9a-H), 3.47 (dd,  $J$  = 15, 10 Hz, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 4.33 (m, 1H, 12-H), 4.85 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 1H, 15-H), 5.16 (dd,  $J$  = 16.5, 10 Hz, 1H, 6-H), 5.58 (m, 1H, 4-H), 5.66 (dd,  $J$  = 6.0, 6.0 Hz, 1H, 15a-H), 5.75 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, 9-H), 5.88 (d,  $J$  = 16.5 Hz, 1H, 7-H), 7.42 (ddd,  $J$  = 7.5, 7.5, 3 Hz, 1H, 5'-H, 6'-H), 7.70 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, 4'-H), 7.81 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H, 7'-H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (150.8 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):**  $\delta$  = 9.6 (q, C-18), 13.3 (q, C-19), 19.8 (q, C-16), 28.3 (t, C-17), 32.0 (t, C-5), 32.4 (t, C-13), 40.2 (t, C-3), 40.4 (d, C-9a), 43.9 (d, C-5a), 46.6 (d, C-13a), 67.1 (d, C-4), 78.3 (d, C-12), 82.2 (d, C-15a), 121.4 (s, C-3'), 123.7 (d, C-9), 126.1 (d, C-6), 127.8 (d, C-7'), 131.2 (s, C-2'), 131.7 (d, C-4'), 133.3 (d, C-6'), 133.4 (d, C-5'), 133.9 (s, C-14), 134.6 (d, C-15), 135.7 (s, C-8), 139.2 (d, C-7), 165.6 (s, C-1'), 170.2 (s, C-2), 173.6 (s, C-10) ppm.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):** **62<sub>syn</sub>**  $\delta$  = 0.99 (dd,  $J$  = 7.5, 7.5 Hz, 3H, 18-H<sub>3</sub>), 1.60 (s, 3H, 19-H<sub>3</sub>), 1.62 (m, 1H, 17-H<sub>a</sub>), 1.71 (m, 1H, 17-H<sub>b</sub>), 1.79 (m, 1H, 5-H<sub>a</sub>), 1.88 (s, 3H, 16-H<sub>3</sub>), 2.04 (m, 2H, 13-H<sub>2</sub>), 2.24 (m, 1H, 5-H<sub>b</sub>), 2.24 (ddd,  $J$  = 8.5, 8.5, 3 Hz, 1H, 13a-H), 2.78 (Septett, 1H, 5a-H), 3.16 (dd,  $J$  = 15, 5 Hz, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 3.33 (dd,  $J$  = 8, 8 Hz, 1H, 9a-H), 3.46 (dd,  $J$  = 15, 10 Hz, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 4.38 (m, 1H, 12-H), 5.00 (dd,  $J$  = 6.0, 6.0 Hz, 1H, 15a-H), 5.18 (dd,  $J$  = 16.5, 10 Hz, 1H, 6-H), 5.23 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 1H, 15-H), 5.58 (m, 1H, 4-H), 5.59 (d,

$J = 8.0$  Hz, 1H, 9-H), 5.93 (d,  $J = 16.5$  Hz, 1H, 7-H), 7.36 (ddd,  $J = 7.5, 7.5, 3$  Hz, 1H, 5'-H, 6'-H), 7.66 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 4'-H), 7.76 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 7'-H) ppm.

$^{13}\text{C}$  NMR (150.8 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ ):  $\delta = 9.9$  (q, C-18), 20.3 (q, C-16), 23.2 (q, C-19), 28.5 (t, C-17), 32.5 (t, C-5), 34.9 (t, C-13), 40.4 (t, C-3), 44.9 (d, C-5a), 45.2 (d, C-13a), 46.5 (d, C-9a), 68.2 (d, C-4), 78.5 (d, C-12), 80.1 (d, C-15a), 120.5 (d, C-9), 121.3 (s, C-3'), 121.5 (d, C-15), 123.8 (d, C-6), 127.7 (d, C-7'), 131.7 (d, C-4'), 132.2 (d, C-6'), 132.7 (s, C-2'), 134.6 (d, C-5'), 137.9 (s, C-8), 138.7 (d, C-7), 148.8 (s, C-14), 167.8 (s, C-1'), 170.2 (s, C-2), 173.6 (s, C-10) ppm.

## 5. 14-Methylen-6,7-epoxy-15-hydroxycollinolacton (66)

### 5.1. Darstellung durch Oxidation mit 1 eq. *m*-Chlorperbenzoesäure

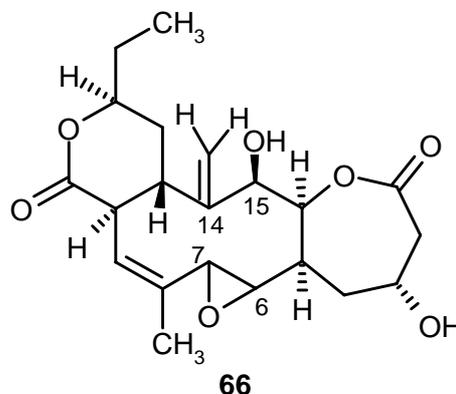
Zu einer Lösung aus 24.4 mg (0.068 mmol, 1.0 eq.) Collinolacton (7) und 1 mL wasserfreiem Dichlormethan wurde unter Rühren in einer Argonatmosphäre langsam eine Lösung aus 11.7 mg (0.068 mmol, 1.0 eq.) *m*-Chlorperbenzoesäure (*m*-CPBA) zugetropft. Die Reaktion wurde nach vier Stunden abgebrochen. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Dichlormethan verdünnt und nacheinander mit gesättigter Natriumhydrogensulfit-, sowie Natriumhydrogencarbonat und Kochsalzlösung extrahiert. Nach Trocknung der organischen Phase über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand (15 mg) wurde säulenchromatographisch an Kieselgel ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ , 9:1) gereinigt und lieferte 9.3 mg (0.02 mmol, 35%) 14-Methylen-6,7-epoxy-15-hydroxycollinolacton (66).

## 5.2. Charakterisierung des Metaboliten 14-Methylen-6,7-epoxy-15-hydroxycollinolacton (66)

$C_{21}H_{28}O_7$  (392.45)

$R_f$ -Werte: 0.3 ( $CH_2Cl_2/MeOH$  9:1)

Anfärbeverhalten: gelb (Anisaldehyd)



**ESI-MS:** (positive Ionen)  $m/z$  (%) = 775.2  $[2M+Na]^+$ , 1151.0  $[3M+Na]^+$ .

**ESI-MS:** (negative Ionen)  $m/z$  (%) = 375.2  $[M-H]^-$ , 421.2  $[M+HCO_2]^-$ , 797.0  $[2M+HCO_2]^-$ .

**HR-ESI-MS:** berechnet  $m/z$  (%) = 377.19587  $[M+H]^+$ .

gefunden  $m/z$  (%) = 377.19592  $[M+H]^+$ .

**$^1H$  NMR (600 MHz,  $CD_2Cl_2$ ):**  $\delta$  = 1.02 (dd,  $J$  = 7.5, 7.5 Hz, 3H, 18- $H_3$ ), 1.64 (m, 1H, 17- $H_a$ ), 1.67 (m, 1H, 5- $H_a$ ), 1.74 (m, 1H, 13- $H_a$ ), 1.76 (m, 1H, 17- $H_b$ ), 2.00 (s, 3H, 16- $H_3$ ), 2.15 (m, 1H, 5- $H_b$ ), 2.19 (ddd,  $J$  = 15, 3.5, 2.5 Hz, 1H, 13- $H_b$ ), 2.28 (ddd,  $J$  = 8.5, 8.5, 3 Hz, 1H, 13a-H), 2.38 (m, 1H, 5a-H), 2.39 (m, 1H, 6-H), 2.39 (m, 1H, 7-H), 2.74 (dd,  $J$  = 13, 8 Hz, 1H, 3- $H_a$ ), 2.89 (dd,  $J$  = 8, 7 Hz, 1H, 9a-H), 2.94 (dd,  $J$  = 13, 8 Hz, 1H, 3- $H_b$ ), 3.98 (dd,  $J$  = 10, 10 Hz, 1H, 15-H), 4.35 – 4.39 (m, 1H, 4-H), 4.35 – 4.39 (m, 1H, 12-H), 5.00 (m, 1H, 19- $H_a$ ), 5.11 (s, 1H, 19- $H_b$ ), 5.15 (dd,  $J$  = 8.5, 4 Hz, 1H, 15a-H), 6.22 (dd,  $J$  = 5.5, 3 Hz, 1H, 9-H) ppm.

**$^{13}C$  NMR (150.8 MHz,  $CD_2Cl_2$ ):**  $\delta$  = 9.6 (q, C-18), 21.3 (q, C-16), 28.2 (t, C-17), 32.8 (t, C-13), 34.3 (t, C-5), 41.7 (d, C-13a), 41.9 (t, C-3), 43.0 (d, C-5a), 45.3 (d, C-9a), 52.9 (d, C-6), 54.0 (d, C-7), 64.0 (d, C-4), 78.8 (d, C-12), 78.9 (d, C-15), 79.6 (d, C-15a), 105.1 (t, C-19), 127.8 (d, C-9), 138.8 (s, C-8), 153.2 (s, C-14), 171.2 (s, C-2), 173.6 (s, C-10) ppm.

## 6. 6,7;8,9;14-Trieпоxy-15-hydroxycollinolacton (67)

### Darstellung durch Oxidation mit 4 eq. *m*-Chlorperbenzoesäure

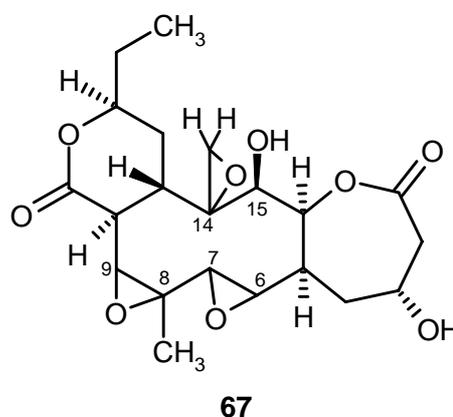
Zu einer Lösung aus 27.5 mg (0.076 mmol, 1.0 eq.) Collinolacton (7) und 1 mL wasserfreiem Dichlormethan wurde unter Rühren in einer Argonatmosphäre langsam eine Lösung aus 52.7 mg (0.305 mmol, 4.0 eq.) *m*-Chlorperbenzoesäure (*m*-CPBA) zugetropft. Die Reaktion wurde nach vier Stunden abgebrochen. Anschließend wurde die Reaktionslösung mit Dichlormethan verdünnt und mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand (22.5 mg) wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1) gereinigt und liefert 3.0 mg verunreinigtes und 0.5 mg reines 6,7;8,9;14-Trieпоxy-15-hydroxycollinolacton (67) (0.008 mmol, 11%). Auf die spektroskopische Analyse von UV und IR wurde zu gunsten der Biotests verzichtet.

### 6.1. Charakterisierung des Metaboliten 6,7;8,9;14-Trieпоxy-15-hydroxycollinolacton (67)

C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>9</sub> (424.45)

**R<sub>f</sub>-Werte:** 0.2 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1)

**Anfärbeverhalten:** gelb (Anisaldehyd)



**HR-ESI-MS:** berechnet  $m/z$  (%) = 409.18569 [M+H]<sup>+</sup>, 426.21224 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>,  
431.16764 [M+Na]<sup>+</sup>.

gefunden  $m/z$  (%) = 409.18604 [M+H]<sup>+</sup>, 426.21263 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>,  
431.17141 [M+Na]<sup>+</sup>.

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):** δ = 0.98 (dd,  $J$  = 7.5, 7.5 Hz, 3H, 18-H<sub>3</sub>), 1.45 (s, 3H, 16-H<sub>3</sub>), 1.50 (m, 1H, 13-H<sub>a</sub>), 1.58 (m, 1H, 5-H<sub>a</sub>), 1.60 (m, 1H, 17-H<sub>a</sub>), 1.66 (m, 1H, 17-H<sub>b</sub>), 1.76 (dd,  $J$  = 11.5, 11.5 Hz, 1H, 6-H), 1.80 (m, 1H, 13-H<sub>b</sub>), 2.17 (ddd,  $J$  = 8.0, 8.0, 3.0 Hz, 1H, 5-H<sub>b</sub>), 2.17 (m, 1H, 5a-H), 2.37 (m, 1H, 9a-H), 2.44 (dd,  $J$  = 10.0, 10.0 Hz, 1H, 13a-H), 2.48 (d,  $J$  =

11.5 Hz, 1H, 7-H), 2.58 (s, 1H, 19-H<sub>a</sub>), 2.64 (s, 1H, 19-H<sub>b</sub>), 2.73 (dd,  $J = 13.5, 6.5$  Hz, 1H, 3-H<sub>a</sub>), 2.99 (dd,  $J = 13.5, 9.0$  Hz, 1H, 3-H<sub>b</sub>), 3.32 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H, 9-H), 3.98 (dd,  $J = 11.5, 11.5$  Hz, 1H, 15a-H), 4.02 (m, 1H, 12-H), 4.24 (dd,  $J = 6.5, 2.5$  Hz, 1H, 15-H), 4.40 (m, 1H, 4-H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (150.8 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>):  $\delta = 9.4$  (q, C-18), 18.3 (q, C-16), 26.7 (t, C-13), 28.0 (t, C-17), 33.8 (t, C-5), 36.6 (d, C-13a), 42.0 (t, C-3), 44.1 (d, C-9a), 44.3 (d, C-5a), 44.6 (t, C-19), 50.3 (d, C-7), 54.5 (d, C-6), 58.4 (s, C-8), 60.3 (d, C-14), 61.1 (d, C-9), 63.5 (d, C-4), 77.1 (d, C-15), 77.5 (d, C-15a), 78.7 (d, C-12), 170.8 (s, C-2), 172.5 (s, C-10) ppm.

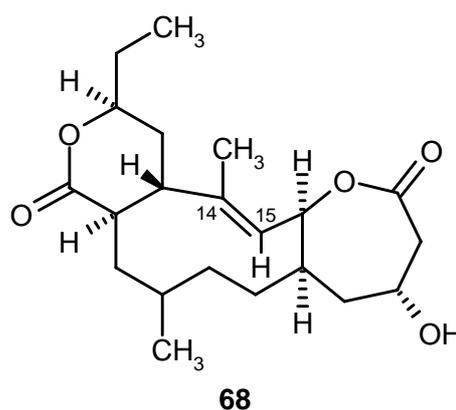
## 7. 6,7,8,9-Tetrahydrocollinolacton (68)

### 7.1. Darstellung durch katalytische Hydrierung mit Pd/C unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre

10 mg (0.028 mmol) Collinolacton (7) wurden in 0.5 mL MeOH gelöst und mit 10 mg Pd/C (10%) versetzt. Unter H<sub>2</sub>-Atmosphäre wurde 17 h bei Raumtemperatur gerührt. Als keine UV-Löschung mehr zu erkennen war, wurde über Celite filtriert, mit MeOH gewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der erhaltene Rückstand (10 mg) wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 9:1) gereinigt und lieferte 1.3 mg 6,7,8,9-Tetrahydrocollinolacton (68) (0.004 mmol, 14%).

### 7.2. Charakterisierung der Metabolite 6,7,8,9-Tetrahydrocollinolacton (68)

C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub> (366.50)



*R<sub>f</sub>*-Werte: 0.64 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 9:1)

0.01 (MeOH/H<sub>2</sub>O 7:3) Anfärbeverhalten: graublau (MOPS)

IR (KBr):  $\tilde{\nu}_{max} = 3432, 2926, 2368, 1723, 1630, 1383, 1161, 1114, 1057, 564$  cm<sup>-1</sup>.

CD: (MeOH,  $c = 4.34 \cdot 10^{-5}$  mol/L)  $\lambda_{max} [\theta] = 211$  (-1429), 222 (-4765), 249 (-272) nm.

UV-VIS: (MeOH):  $\lambda_{max} (\epsilon) = 263$  (1520), 543 (1040), 580 (990);

(MeOH/HCl):  $\lambda_{max} (\epsilon) = 536$  (20), 584 (20);

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{max}(\epsilon) = 536 (20) \text{ nm}$ .

**Drehwert** :  $[\alpha]_D^{20} = +40^\circ$  (MeOH,  $c = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$ ).

**$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):**  $\delta = 0.84$  (dd,  $J = 7.5, 7.5 \text{ Hz}$ , 3H, 18- $\text{H}_3$ ), 0.93 (s, 3H, 16- $\text{H}_3$ ), 0.97 (m, 1H, 6- $\text{H}_a$ ), 0.98 (m, 1H, 7- $\text{H}_a$ ), 1.09 (m, 1H, 7- $\text{H}_b$ ), 1.20 (m, 2H, 9- $\text{H}_2$ ), 1.25 (m, 1H, 13- $\text{H}_a$ ), 1.26 (d,  $J = 8.0 \text{ Hz}$ , 3H, 19- $\text{H}_3$ ), 1.34 (m, 1H, 17- $\text{H}_a$ ), 1.43 (m, 1H, 17- $\text{H}_b$ ), 1.44 (m, 1H, 4- $\text{H}_a$ ), 1.49 (m, 1H, 13- $\text{H}_b$ ), 1.56 (m, 1H, 5a-H), 1.61 (m, 1H, 8-H), 1.92 (m, 1H, 9a-H), 1.96 (m, 1H, 6- $\text{H}_b$ ), 2.03 (m, 1H, 13a-H), 2.07 (m, 1H, 3- $\text{H}_a$ ), 2.19 (m, 1H, 3- $\text{H}_b$ ), 2.20 (m, 1H, 4- $\text{H}_b$ ), 3.70 (m, 1H, 12-H), 3.88 (m, 1H, 4-H), 4.56 (m, 1H, 15a-H), 5.42 (d,  $J = 6.5 \text{ Hz}$ , 1H, 15-H) ppm.

**$^{13}\text{C NMR}$  (150.8 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ):**  $\delta = 9.7$  (q, C-18), 12.6 (q, C-19), 22.2 (q, C-16), 25.1 (t, C-6), 28.5 (t, C-13), 29.5 (t, C-7), 30.4 (t, C-17), 33.1 (t, C-5), 36.8 (t, C-9), 40.0 (d, C-8), 40.8 (d, C-9a), 41.8 (d, C-5a), 42.0 (t, C-3), 47.6 (d, C-13a), 67.0 (d, C-4), 70.6 (d, C-15a), 76.6 (d, C-12), 128.3 (s, C-14), 135.1 (d, C-15), 173.3 (s, C-2), 174.2 (s, C-10) ppm.

## XIII Molekularbiologische Methoden

### 1. Kartierung von Cosmiden des Stammes Gö 40/10

#### 1.1. Kultivierung der *E. coli*-Zellen (CB 2214)

81 Cosmide in *E. coli* (CB 2214) des Stammes *Streptomyces* sp. Gö 40/10 auf LB-Agar wurden uns von der Firma *Combinature* zur Verfügung gestellt. Jeder Cosmidklon wurde im Verdünnungsausstrich (Zahnstocher, steril) auf eine  $\text{LB}_{\text{apr}}$ -Agarplatte übertragen, die 12 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert wurde. Dieser Vorgang wurde so häufig wiederholt bis einzelne Kolonien zu erkennen waren. Es wurde  $\text{LB}_{\text{apr}}$ -Medium (5 mL) in ein mit einer Aluminiumkappe verschließbares Reagenzglas pipettiert. Anschließend impfte man jedes Reagenzglas mit genau einer Kolonie der  $\text{LB}_{\text{apr}}$ -Agarplatte, gepickt mittels eines Zahnstochers (steril) und am Rand des Reagenzglases abgestriffen, oder mit 20  $\mu\text{L}$  einer Glycerineinlagerung (B. XIII1.2 oder B. XIII1.3) an. 12 h wurde bei  $37^\circ\text{C}$  und 220 rpm (schräges Schüttelbrett) inkubiert.

## 1.2. Stammhaltung der *E. coli*-Zellen in 50% Glycerin

750  $\mu\text{L}$  der gut angewachsenen *E. coli* Kulturen (CB 2214) wurden in sterile Eppendorfggefäße pipettiert. 750  $\mu\text{L}$  50%iges Glycerin (steril) wurde darauf pipettiert, gut durchmischt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 1.3. Stammhaltung der *E. coli*-Zellen in 20% Glycerin

Die gut angewachsenen *E. coli*-Kulturen (CB 2214) wurden in Eppendorfggefäße (je 1500  $\mu\text{L}$ ) pipettiert, zentrifugiert (20 s, 13000 rpm) und der Überstand mit einer Vakuumpipette abgesaugt. Die Lagerung erfolgte gut durchmischt in Glycerin (20%, 1500  $\mu\text{L}$ ) bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 1.4. Isolierung von Cosmid-DNA (Mini-Präparation)

Die Cosmid-DNA-Isolierung erfolgte unter nicht vollständig sterilen Bedingungen. Es genügt Puffer, Lösungen und Arbeitsmittel zuvor zu autoklavieren.

4 mL der gut angewachsenen *E. coli*-Kulturen (CB 2214) wurden in beschriftete Falkontubes bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 7300 rpm 3 – 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Vakuumpipette abgesaugt. Das Pellet wurde in 300  $\mu\text{L}$  Puffer AL 1 resuspendiert und in ein 1500  $\mu\text{L}$  Eppendorfcap überführt. Anschließend wurde 300  $\mu\text{L}$  AL 2-Puffer hinzugefügt, der Deckel verschlossen und vorsichtig geschwenkt. Das Gemisch wurde 3 – 4 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Beim Öffnen des Deckels sollte sich anschließend ein durchsichtiger Faden bilden. Zur Proteinfällung wurde 300  $\mu\text{L}$  AL 3 hinzugefügt, vorsichtig geschwenkt und 15 min auf Eis inkubiert. Das ausgefallene Protein wurde 20 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand ohne Proteinreste wurde in ein steriles 2 mL Eppendorfcap überführt. (Eppendorfspitze am Anfang gleich bis fast auf den Boden des Caps durchführen, da an der Oberfläche Proteinreste schwimmen, die sich so am Rand der Pipettenspitze festsetzten.) Bei weiteren Problemen der Überführung des Überstandes sollte man das 2 mL Eppendorfcap erneut 5 min zentrifugieren. Proteinreste blieben jetzt am Rand hängen und man konnte den Überstand erneut ohne Probleme zum Fällern der DNA überführen. Das Eppendorfcap wurde mit gleichem Volumenanteil Isopropanol (900 – 1000  $\mu\text{L}$ ) aufgefüllt, vorsichtig geschwenkt und 30 min bei Raumtemperatur zur Fällung stehen gelassen. Anschließend wurde bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13000 rpm 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die ausgefallene DNA mit 1000  $\mu\text{L}$  70%igem Ethanol gewaschen, 10 min auf Eis inkubiert, 15 min zentrifugiert ( $4^{\circ}\text{C}$ , 13000 rpm) und der Überstand vorsichtig ab

pipettiert. Die DNA-Pellets wurden unter der Flow-Box 15 – 30 min trocknen gelassen und anschließend in 50  $\mu\text{L}$  TE-Puffer oder für die PCR in 50  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei – 20°C.

### 1.5. Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

Restriktionsverdau: Für den Restriktionsverdau wurden das benötigte Enzym *BamHI* und der Puffer kurz vor der Anwendung auf Eis aufgetaut. Man pipettierte zuerst den Puffer des Enzyms, die BSA und das ddH<sub>2</sub>O gemeinsam in ein Eppendorfcap, durchmischte gut und verteilte Puffer, BSA und ddH<sub>2</sub>O auf die Eppendorf-Gefäße des jeweiligen Ansatzes. Anschließend wurde die DNA-Lösung und zum Schluss das Enzym hinzugefügt (Tabelle 18). Der Ansatz wurde gut durchmischt und bei 37°C 60 min lang inkubiert. Die Reaktion der Enzyme wurde durch Eiskühlung gestoppt und die Ansätze bei – 20°C für eine weitere Bearbeitung gelagert.

DNA in [ $\mu\text{L}$ ]	Puffer in [ $\mu\text{L}$ ]	BSA + ddH <sub>2</sub> O in [ $\mu\text{L}$ ]	Enzym in [ $\mu\text{L}$ ]	Total in [ $\mu\text{L}$ ]
2/4	1.5	0.15 + 12.85	0.5	17/19
20	3	0.3 + 4.7	2	30

**Tabelle 18:** Volumina der Reagenzien für den Restriktionsverdau.

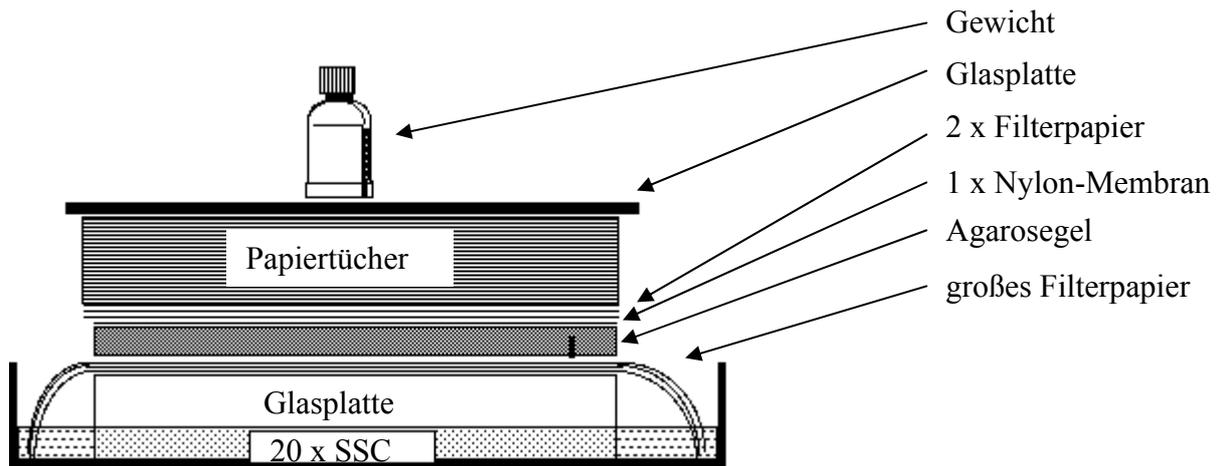
Gelelektrophorese: Für die Gelelektrophorese wurde ein Gel aus 0.8% Agarose (2.4 g) in TAE-Puffer (300 g) angefertigt. Der TAE-Puffer wurde aus einer 50fachen TAE-Stammlösung hergestellt (20 mL TAE-Stammlösung auf 1000 mL ddH<sub>2</sub>O) und die Agarose-TAE-Puffer-Mischung in der Mikrowelle (ca. 3 min, 500 W) vorsichtig bis zum Sieden erhitzt (klare Lösung). Nach dem Abkühlen (auf ca. 50°C) goss man das Gel auf eine vorbereitete Glasplatte (10 x 15 cm, 15 x 20 cm) mit einem Kamm, der so angebracht wurde, dass er einen Abstand von ungefähr 1 mm zu Glasplatte hatte. Es wurde gerade soviel Gel gegossen, dass es sich über die ganze Glasplatte bis in die Ecken ausdehnte, die Gelschicht erreichte dabei eine Dicke von ungefähr 3 – 4 mm. Man ließ auf Raumtemperatur abkühlen, entfernte vorsichtig den Kamm, so dass die Probenaschen unbeschädigt blieben und legte die Glasplatte mit dem Gel in die Elektrophoreseapparatur ein. Die Apparatur wurde mit TAE-Puffer bis zu einem Flüssigkeitsstand von ca. 2 – 3 cm über dem Gel aufgefüllt, die einzelnen DNA-Proben (DNA-Leiter: 3  $\mu\text{L}$ , DNA (unverdaut) 2  $\mu\text{L}$ , DNA (15 min anverdaut) 5  $\mu\text{L}$ , DNA (verdaut) 2  $\mu\text{L}$ ) mit dem Farbstoff Blue Orange Loading Dye (*Promega*, 2  $\mu\text{L}$ ) versetzt

und in jeweils eine Probestasche des Gels pipettiert. An die Apparatur legte man Spannung (80 V (tagsüber), 20 V (über Nacht)) mit Laufrichtung der DNA zum Pluspol an. Die Elektrophorese wurde beendet, als die Farbstofffront das obere Drittel des Gels erreicht hatte (1:20 h, 16 h). Anschließend färbte man das Gel in einem Ethidiumbromidbad (30 µL einer Ethidiumbromid stock-solution (10 mg/mL) in 300 mL TAE-Puffer (finale Konzentration 1 µg/mL)) an (10 – 15 min). Das Bandenmuster wurde im UV-Licht sichtbar gemacht und mit der Digitalkamera dokumentiert.

### **1.6. Southern Blot mit Hochsalzpuffer**

Vorbehandlung: Um die elektrophoretisch getrennte DNA dauerhaft auf einer Membran zu fixieren wurde ein Southern Blot angefertigt. Das Agarosegel wurde 10 min leicht schwenkend in 0.25 M HCl gelagert. Das Gel wurde kurz mit dest. H<sub>2</sub>O gespült, bevor es 2 x 15 min leicht schwenkend mit der Denaturierungslösung behandelt wurde. Das Gel wurde nach der 2. Behandlung mit dest. H<sub>2</sub>O gespült. Anschließend wurde das Gel 2 x 15 min in Neutrallösung gelagert und leicht schwenken gelassen. Die Neutrallösung wurde abgegossen und das Gel wurde in den Hochsalzpuffer 20 x SSC gelagert, bis der Aufbau des Blottes fertig war.

Blotaufbau und -vorgang: Blotten mit Hochsalzpuffer (SSC) ist eine der weit verbreitetsten Methoden, um DNA an eine Membran zu fixieren. Unter Ausnutzung der Kapillarkräfte wird 20 x SSC-Puffer durch das Gel und die Membran in einen Stapel von Papiertüchern gesogen. Die DNA wandert mit und bleibt auf der Membran hängen. Über einer Wanne, die mit 20 x SSC gefüllt ist, wurde eine Glasplatte gelegt, die etwa die Breite des Agarosegels hatte, legte darauf einen getränkten Filterpapierstreifen (luftblasenfrei), dessen beide Enden links und rechts in die Flüssigkeit in der Wanne hingen. Das Agarosegel wurde unbedingt luftblasenfrei auf den Filterpapierstreifen gelegt. Auf das Agarosegel folgten zwei auf die Größe zugeschnittene Filterpapiere (luftblasenfrei) und darüber eine Menge Papiertücher. Auf diesen Aufbau wurden Gewichte gesetzt. Der Wasserstand in der Wanne sollte 2 cm betragen (Abbildung 108). Wichtig war, dass der Transferpuffer nicht am Gel vorbei lief. Deswegen schnitt man die Membran und die zwei darüber liegenden Filterpapiere auf die Gelgröße zurecht und deckte den Bereich um das Gel mit Plastikfolie ab. Nach 3 – 14 h war das Blotting fertig. Die Membran wurde in Plastik- und Aluminiumfolie eingeschlagen und bei 4°C gelagert.



**Abbildung 108:** Aufbau eines Southern Blots mit Filterpapierbrücke.

## 2. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (DH10 $\alpha$ ) für die Transformation

Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurden LB-Agar-Platten mit 20  $\mu$ L einer Glycerineinlagerung von *E. coli* DH10 $\alpha$ -Zellen im Verdünnungsausstrich angeimpft und 12 h bei 37°C inkubiert. Anschließend beimpfte man 4 x 25 mL SOB-Medium (100 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikane) mit einer einzelnen Kolonie (mit sterilem Zahnstocher gepickt). Diese vier Kulturen und zwei Kulturen, als negativ Standard, wurden 12 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Je vier 1 L Erlenmeyerkolben ohne Schikane wurden mit je 500 mL SOB-Medium befüllt und eine  $\frac{3}{4}$  Stunde bei 28°C vorgewärmt. Jeder vorgewärmte Kolben wurde mit 2.5 mL der Vorkultur angeimpft. Inkubiert wurde bei 37°C und 180 rpm bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600} \sim 0.75$  (nie mehr als  $OD_{600} = 0.8$ , ca. 1:45 h). Zu jeder Zeit mussten Kulturen, Glycerinlösungen und abzentrifugierte Zellen streng bei 0°C auf Eis gekühlt werden. Sobald die Zellen die gewünschte Dichte erreicht hatten wurden die Kulturen (je 144 g Kulturbrühe pro Nelgene-Fläschchen) 10 min bei 4°C, 4400 rpm zentrifugiert, wobei keine streng sterilen Bedingungen eingehalten wurden. Der Überstand wurde verworfen und die Nelgene-Fläschchen wieder mit gekühlter Kulturbrühe aufgefüllt. Nachdem alle Zellen zentrifugiert waren, wurden sie mit gekühlter 10%iger Glycerinlösung dreimal gewaschen und bei 4°C, 4400 rpm 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 10%igem Glycerin in 4 eisgekühlte 15 mL Falkontubes überführt, kurz zentrifugiert (3 min, 7300 rpm) und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 1 mL 10%igem Glycerin pro Falkontube aufgenommen (ca. 4 mL Glycerin (10%) auf 2 L Zellkultur). Je 50  $\mu$ L Zell-Suspension wurden in vorgekühlte 500  $\mu$ L Eppendorf-

Gefäße mit vorgekühlten Eppendorfspitzen abgefüllt, in einem N<sub>2</sub>-Bad sofort schockgefroren und zügig bei – 80°C gelagert.

### 3. Transformation

50 µL der kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. In eine trockene, eisgekühlte Elektroporationsküvette pipettierte man 1 µL des Ligationsansatzes und gab die kompetenten Zellen unmittelbar vor der Transformation hinzu. Die Küvette wurde in die dafür vorgesehene Halterung eingesetzt und Spannung angelegt. Sofort nach dem elektrischen Puls gab man 1 mL LB-Medium hinzu und mischte gut durch. Der Reaktionsansatz wurde in 1500 µL Eppendorfgläser überführt und 60 min bei 37°C regeneriert. Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz auf LB<sub>apr</sub>-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden für 30 min bei Raumtemperatur unter der Flow-Box getrocknet und schließlich 12 h bei 37°C inkubiert.

Elektroporationsbedingungen:

Spannung 2.5 kV, Feldstärke: 2.5 µF, Widerstand: 200 Ω

## 4. PCR-Versuche zur Baeyer-Villiger-Monooxygenase

### 4.1. Kultivierung des Stammes Gö 40/10

Die Kultivierung des Stammes Gö 40/10 für eine Mini-Präparation der genomischen DNA wurde in 250 mL Erlenmeyerkolben, die mit einer Metallspirale versehen waren, durchgeführt. Die Kolben wurden mit 25 mL M2-Medium befüllt und autoklaviert, mit einem 1 cm<sup>2</sup> großen Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft und bei 28°C und 225 rpm 12 h inkubiert.

### 4.2. Isolierung von genomischer Streptomyces-DNA (Mini Präparation)

Zur Isolierung der genomischen DNA aus *Streptomyces* sp. (Stamm Gö 40/10) wurden 25 mL einer Übernachtskultur des Stammes in ein Falkontube überführt und 5 min bei 7300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 25 mL 10.3 %iger Saccharose-Lösung gewaschen. 50 µg/µL feuchtes Mycelium wurde in ein 1500 µL Eppendorfcap überführt. Man resuspendierte das Pellet in 500 µL Lysozym-Lösung und inkubierte etwa 45 min bei 37°C. Die Zellen lagen jetzt als Protoplasten vor, das Gemisch

wurde milchig-trüb. Nach Zugabe von 250  $\mu\text{L}$  2 %iger SDS-Lösung und intensivem Durchmischen im Vortex (1 min) wurde die Lösung klar. Es wurden 250  $\mu\text{L}$  Phenol-Chloroform-Lösung zugegeben, 30 s im Vortex gut durchmischt, 2 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und bei 13000 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand (obere Phase ohne Proteine) wurde in ein neues 1500  $\mu\text{L}$  Eppendorf-Gefäß überführt und die Proteinfällung wurde 2 – 4 mal wiederholt, bis sich keine weiße Trennfläche mehr bildete. Die gebildeten weißen Zwischenphasen (bestehend u. a. aus Proteinen) und die Chloroform-Phasen wurden verworfen. Nach Überführung des Überstands der letzten Proteinfällung in ein 2 mL Eppendorf-Gefäß wurde durch Zugabe von 0.1 Vol% (Volumenäquivalent) 3 M Natriumacetat-Lösung und 1.0 Vol% Isopropanol zum Überstand die DNA gefällt und nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur in Form einer weißen Wolke in der Lösung sichtbar (während dieser Phase nicht mit dem Vortex behandeln, da die DNA hierdurch fragmentieren würde). Man zentrifugierte 15 min bei 13000 rpm, goss den Überstand ab und resuspendierte das Pellet in 750  $\mu\text{L}$  70%igem Ethanol. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 13000 rpm, 5 min) und Trocknung unter der Flow-Box (nicht länger als 30 min) wurde die DNA in 40  $\mu\text{L}$  TE-Puffer oder für die PCR in 40  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei – 20°C gelagert.

### 4.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Experimente wurden in enger Kooperation mit dem Arbeitskreis Priv. Doz. Dr. R. Daniel und seiner Mitarbeiterin Carola Simon an der Universität Göttingen durchgeführt.

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Technik zur gezielten Amplifikation eines DNA-Fragments mittels zweier spezifischer Oligonukleotide (Primer) und einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Ein Prozess bestehend aus Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation wird 25 – 30 mal zyklisch durchlaufen. Im Standardansatz (Endvolumen 50  $\mu\text{L}$ ) wurden 0.1 – 50 ng DNA-Matrize mit jeweils 100 pg der spezifischen Primer im entsprechenden Reaktionspuffer (5  $\mu\text{L}$ ) eingesetzt, sowie MgCl<sub>2</sub> (3.5  $\mu\text{L}$ ) und H<sub>2</sub>O (38  $\mu\text{L}$ ). Ein typisches PCR-Programm ist in Tabelle 19 dargestellt.

	PCR-Schritte	Zeit in min	Temperatur in °C
1	Initiale Denaturierung	2	95
2	Denaturierung	1.5	95
3	Annealing	1.5	69
4	Elongation	1	72
15 Zyklen der Schritte 2 bis 4			
5	Denaturierung	1.5	95
6	Annealing	1.5	54
7	Elongation	1	72
13 Zyklen der Schritte 5 bis 7			
8	End-Elongation	10	72
9	Abkühlen		4

**Tabelle 19:** PCR-Programm einer Touchdown-PCR zur Amplifikation eines genomischen DNA-Fragments. In Schritt 3 wird pro Zyklus die Temperatur um 1°C abgesenkt.

Als DNA-Polymerase wurde standardmäßig eine *Taq*-DNA Polymerase (1 µL, *Fermentas*) eingesetzt. Zur Amplifikation eines genomischen DNA-Fragments aus *Streptomyces* sp. Gö 40/10 und Tü 2717 wurde eine Touchdown-PCR mit folgenden Primern (Tabelle 20) verwendet.

Primer	Sequenz (5' – 3')					
BV11f	ATG	CTC/G	GCT/C/A/G	GGT/C/A/G	GGA/G	CT
BV11r	GAA/G	GGT/C/A/G	GAT/C	TGT/C	GGT/C/A/G	GT
BV12r	GGT	GGT/C/A/G	GAT/C	TGT/C	GGT/C/A/G	GT
BV13r	GGC	GGT/C/A/G	GAT/C	TGT/C	GGT/C/A/G	GT
BV14r	GGA	GGT/C/A/G	GAT/C	TGT/C	GGT/C/A/G	GT
BV15r	GGG	GGT/C/A/G	GAT/C	TGT/C	GGT/C/A/G	GT
BVB1f	ATG	CTC/G	GCT/C	GGT/C	GAA/G	CT
BVB2r	GAA/G	GGA/G	GAT/C	TGT/C	GGA/G	GT

**Tabelle 20:** Sequenzen der Primer, die zum gewünschten DNA-Fragment führten.

#### 4.4. Isolation von DNA aus Agarosegelen

Ein Teil der elektrophoretisch aufgetrennten DNA wurde mit Ethidiumbromid angefärbt. Die gewünschte DNA Bande wurde mit einem Skalpell angezeichnet und so konnte durch Anlegen des gefärbten DNA-Stückes an das unbehandelte Agarosegel das gewünschte DNA-

---

Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe QIAquick PCR Präparationskits (*Qiagen*) nach Herstellerangaben aus der Gelmatrix eluiert werden.

#### 4.5. Klonierung, Transformation, Amplifikation

Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe des TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kits (*Invitrogen*) in einen Vektor 2.1-TOPO kloniert. Zur Klonierung wurde ein *Vaccinia* Topoisomerase I „aktivierter“ TA-Vektor verwendet. Die Topoisomerase erkennt die Schnittstelle (C/T)CCTT, schneidet die DNA und bleibt über eine 3'-Phosphotyrosyl-Bindung kovalent an Topoisomerase gebunden. Weil der TOPO-Vektor zwei benachbarte Schnittstellen enthält und so beide DNA-Enden durch Topoisomerase blockiert sind, wird eine Selbstligation verhindert. An die Primer muss keine zusätzliche Schnittstelle eingefügt werden (bluntend). Der Vektor und *E. coli* (TOP10-Zellen), als Produzentenstamm, wurden durch Hitzeschock transformiert. Das Transformationsprodukt wurde auf eine LB-Agarplatte mit Ampicillinresistenz gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch Blau-Weiß-Selektion konnten Kolonien mit Insert und ohne Insert selektiert werden. Es wurden einzelne Kolonien mit Insert und Vektor gepickt und über Nacht in flüssigem LBamp-Medium amplifiziert.

#### 4.6. Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen wurde mit Hilfe des NucleoSpin<sup>®</sup> Plasmid-Kits der Firma *Macherey-Nagel* isoliert. Es kamen die mitgelieferten Puffer und Lösungen des Herstellers zum Einsatz. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt dabei prinzipiell durch Bindung an eine Kieselgelmatrix in Spinsäulchen.

#### 4.7. Sequenzierung von DNA und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung von DNA erfolgte als externe Auftragsarbeit durch die Firma *Göttingen Genomics Laboratory* (G2L). Die erhaltenen Sequenzen konnten über eine Datenbankabfrage mit BLAST auf Ähnlichkeiten untersucht werden.<sup>[135]</sup>

## XIV Biologische Aktivität

### 1. Plattendiffusionstest

Im Plattendiffusionstest wurden als Testkeime *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mucor hiemalis*, *Candida albicans* und *Aspergillus sp.* verwendet. Die Reinsubstanzen wurden in Konzentrationen von 1 mg/mL (Lösungsmittel MeOH) gelöst. Filterplättchen (Durchmesser: 9 mm, Dicke 0.5 mm) wurden mit den Lösungen getränkt, unter sterilen Bedingungen getrocknet, auf die Testplatten gelegt und 12 h bei 37°C (Bakterien) bzw. 24°C (Pilze) inkubiert.

#### Nährmedien für Testplatten:

*B. subtilis*: Glucose 5 g/L, Na-Citrat · 2 H<sub>2</sub>O 0.5 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g/L, Agar 15 g/L.

*S. aureus*, *E. coli*: Bacto Nutrient Broth 8 g/L, NaCl 5 g/L, Agar 15 g/L.

*C. albicans*: Hefeextrakt 4 g/L, Malzextrakt 10 g/L, Glucose 4 g/L, Agar 15 g/L, pH = 5.5.

*Aspergillus sp.*: Malzextrakt 20 g/L, Glucose 10 g/L, Hefeextrakt 2 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g/L, pH = 6.5.

Zum Ansetzen der Testplatten-Medien wurde demineralisiertes Wasser verwendet. Die Glucose wurde erst nach 30 min Sterilisation hinzu gegeben.

Die Platten wurden nach 24 h ausgewertet. keine der Verbindungen **7**, **59** - **62**, **66** - **68**, **110** - **116** zeigte eine Aktivität auf die getesteten Stämme.

### 2. Cytotoxizitätsuntersuchungen

Collinolacton (**7**) und die sieben Derivate **59** – **62**, **66** – **68** wurden von Prof. Dr. W. BEIL (Medizinische Hochschule Hannover) gemäß den NCI-Richtlinien<sup>[142]</sup> gegen die Krebszelllinien HM02 (Magenadenocarcinom), HepG2 (Lebercarcinom) und MCF7 (Mammacarcinom) getestet. Die Zellen wurden in dem Nährmedium RPMI mit 10% fetalem Kälberserum auf 96-well Mikrotiterplatten kultiviert. 24 h nach Aussaat wurden die Prüfsubstanzen (Konzentration im Ansatz: 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 und 10 µg/mL) zugegeben und die Zellen für weitere 48 h kultiviert. Nach dieser Zeit wurde die Zellzahl (Proteinbestimmung mit Sulforhodamin) bestimmt. Die Substanzen wurden in MeOH gelöst. Die MeOH-Konzentration im Testansatz betrug 0.1%. Aus den Konzentrations-Wirkungskurven wurden die Werte GI<sub>50</sub> (Konzentration, die eine halbmaximale Hemmung

des Zellwachstums bewirkt) und TGI (Konzentration, die eine vollständige Hemmung des Zellwachstums bewirkt) bestimmt.

Es konnten drei Derivate **59** – **61** ermittelt werden, die cytotoxische und cytostatische Aktivitäten zeigten. In Tabelle 21 wurden die Ergebnisse zusammengefasst.

Substanz	HM02		HepG2		MCF7	
	GI <sub>50</sub>	TGI	GI <sub>50</sub>	TGI	GI <sub>50</sub>	TGI
4- <i>O</i> -Acetyllollinolacton ( <b>59</b> )	8.8	> 10	7.5	> 10	0.3	5.1
4- <i>O</i> -Benzoyllollinolacton ( <b>60</b> )	6.5	8.5	6.5	> 10	2.4	6.0
4- <i>O-p</i> -Brombenzoyllollinolacton ( <b>61</b> )	7.0	> 10	7.4	> 10	0.9	6.8

**Tabelle 21:** Ergebnisse der Cytotoxizitätstests, alle Angaben in µg/mL, GI<sub>50</sub>: Growth Inhibition 50%, TGI: Total Growth Inhibition.

### 3. Mikrotubulistabilitätsuntersuchungen

Collinolacton (**7**) und die sieben Derivate **59** – **62**, **66** – **68** wurden von Dr. F. SASSE (GBF Braunschweig) auf ihre Mikrotubuli-Modifikation untersucht. Alle acht Proben wurden auf Proliferationshemmung an L929-Mausfibroblasten untersucht. Das Read-out, ein MTT-Assay ergibt danach folgende IC<sub>50</sub>-Wert (Tabelle 22).

Substanz	IC <sub>50</sub> -Werte in µg/mL	Beobachtungen der Mikrotubuli-Modifikation
Collinolacton ( <b>7</b> )	> 40	-
4- <i>O</i> -Acetyllollinolacton ( <b>56</b> )	<b>20</b>	-
4- <i>O</i> -Benzoyllollinolacton ( <b>57</b> )	<b>0.7</b>	Vakuolisierung des ER und Mikrotubulinetzwerkes
4- <i>O-p</i> -Brombenzoyllollinolacton ( <b>58</b> )	<b>10</b>	Bildung von Halbspindeln
4- <i>O-o</i> -Brombenzoyllollinolacton ( <b>59</b> )	<b>6</b>	Mikrotubulinetz abgebaut; Halb- und Krüppelspindeln
Monoepoxycollinolacton ( <b>63</b> )	> 40	-
Triepoxycollinolacton ( <b>64</b> )	> 40	-
Tetrahydrocollinolacton ( <b>65</b> )	> 40	-

**Tabelle 22:** Ergebnisse aus dem Mikrotubulistabilitätstest. IC<sub>50</sub>: Konzentration bei der halbmaximale Hemmung erreicht wird. Aktive Substanzen (fett), ER = Endoplasmatisches Retikulum.

Die drei aktivsten Derivate **60** – **62** wurden auf ihren Wirkmechanismus hin näher untersucht. Es wurden PtK2-Beutelratten-Nierenzellen mit 20 µL/mL über Nacht inkubiert. Die

Zellkerne, das Endoplasmatische Retikulum (ER) und die Mikrotubuli wurden angefärbt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

## **XV 1-O-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnosid aus *Streptomyces* sp. Tü 3634**

### **1. Stammhaltung**

#### **1.1. Agarplatten**

Die Stammhaltung von *Streptomyces griseoviridis* Tü 3634 erfolgte auf Petrischalen mit M2<sup>+</sup>-Agar. Die mit Sporen einer gut bewachsenen Agarplatte oder mit 1/3 einer Stickstoffeinlagerung beimpften Platten wurden 5 – 7 Tage bei 28°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert. Das versporete Luftmycel weist eine zimtbraune Färbung auf.

#### **1.2. Stickstoffeinlagerung**

Bei der Konservierung über flüssigem Stickstoff wurden aus einer gut bewachsenen Agarplatte mit einem Halm aus Polypropylen Agarstückchen ausgestanzt und dieser in einem weiteren, mit einem kleinen Bleistückchen beschwerten Halm eingeschweißt. Die Halme wurden zunächst für 30 min im oberen Bereich des Kryobehälters eingefroren und anschließend über flüssigem Stickstoff gelagert. Diese Methode erlaubt eine Lagerung über mehrere Jahre.

### **2. Flüssigkultivierung**

#### **2.1. Vorkulturen und Hauptkulturen in Schüttelkolben**

Die Anzucht des Stammes *Streptomyces griseoviridis* Tü 3634 erfolgte in 1 L-Schüttelkolben mit 3 Schikanen, die je mit 100 mL Hafernährmedium beschickt, bei 28°C und 250 rpm rotierend geschüttelt wurden. Für Vorkulturen dienten Agarstückchen (1/8 Platte) einer gut versporeten Agarplatte als Animpfmaterial. Hauptkulturen in Schüttelkolben wurden mit 5 mL einer 50 – 55 h alten Vorkultur beimpft und ebenso bei 28°C und 250 rpm 72 h rotierend kultiviert.

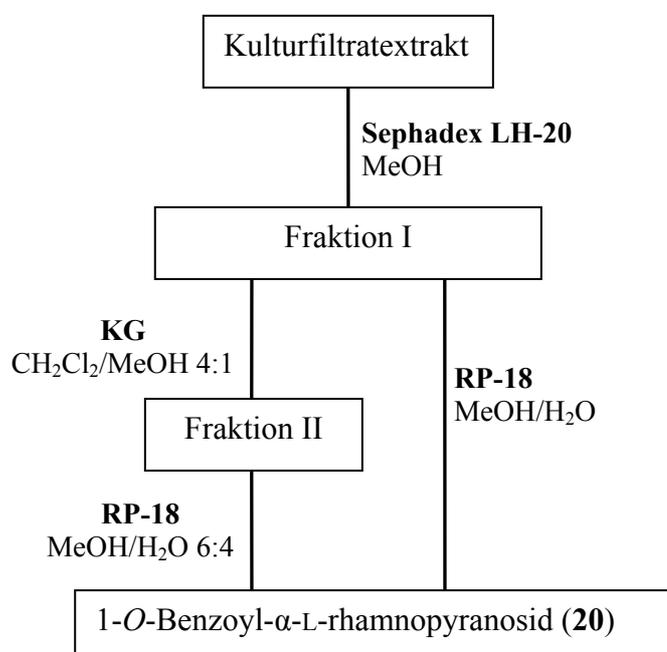
## 2.2. Fermentation im 1 L Rührblattfermenter

Die Anzucht von Tü 3634 im 1 L Biostat M-Fermenter erfolgt in 900 mL Hafernährmedium (Start-pH 6.5) bei 28°C, 700 rpm und einer Luftzufuhr von 1.6 vvm. Als Inokulum dienten 100 mL einer 50 – 55 h alten Vorkultur. Nach der 15. Inkubationsstunde wurde der pH-Wert durch automatische Steuerung mit 2 M Citronensäure bzw. 0.5 M NaOH auf  $\text{pH} = 6.0 \pm 0.7$  geregelt. Ernte der Kultur erfolgte nach 72 h.

## 2.3. Standardaufarbeitung

Die mit Celite versetzte Kulturbrühe wurde filtriert und das Mycel verworfen. Das Kulturfiltrat wurde an Amberlite XAD-16 adsorbiert, dieses mit Wasser gewaschen und mit Methanol extrahiert (Mengenverhältnisse etwa 300 mL XAD-16, 1 L Kulturfiltrat, 500 mL Wasser, 1 L Methanol). Die organische Phase wurde im Vakuum eingengt und Reste von Wasser durch Lyophilisieren entfernt.

## 2.4. Isolierung



**Abbildung 109:** Aufarbeitungsschema zur Isolierung von 1-O-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (20).

Der methanollösliche Bestandteil des Rohextrakts wurde an Sephadex (1 m, MeOH), teilweise an Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 4:1) und RP-18 (MeOH/H<sub>2</sub>O, 6:4, Mitteldruck) chromatographiert (Abbildung 109). Aus Fermentationsansätzen erhielt man 1.4 mg/L sauberes 1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**20**) als ölige Verbindung.

### 3. Versuche zur Ausbeutesteigerung

Es wurde ein Biostat M Fermenter unter Standardbedingungen (B. XV2.2) gestartet. Zum Nährmedium Hafer wurden jeweils ab der 11. Inkubationsstunde über 10 h Terephthalsäure, Isophthalsäure oder Vitamin C in einer Konzentration von ca. 1.2 g/L (Tabelle 23) kontinuierlich in die wachsende Kultur gepumpt. Zur genauen Ausbeutebestimmung wurden die Fermentationsansätze von 1 L unter Standardbedingungen (B. XV2.3 & B. XV2.4) aufgearbeitet und isoliert.

### 4. Beschreibung des Fütterungsexperiments

Das Fütterungsexperiment wurde unter Standardbedingung (B. XV3) durchgeführt, wobei man zuerst auf Verträglichkeit mit unmarkierter Verbindung testete. Zur Ausbeutesteigerung wurde Vitamin C ab der 11. Inkubationsstunde beigelegt. Zur Penetration der Zellen wurden zusätzlich 5 mL Dimethylsulfoxid (in 10 mL H<sub>2</sub>O) der Fermentationsbrühe hinzugefügt. Die Fütterung mit <sup>13</sup>C-markiertem Vorläufer wurde in der 12. Inkubationsstunde gestartet und wurde über 9 h kontinuierlich zugepumpt.

gefütterte Substanz	gefütterte Menge	Ausbeute an Rhamnosid 20
Terephthalsäure	1.24 g	nicht detektierbar
Isophthalsäure	1.24 g	2.4 mg
Vitamin C	1.29 g	2.2 mg
Vitamin C + Shikimat	1.29 g + 150 mg	nicht detektierbar
Vitamin C + DMSO + [1,7- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]Shikimat	1.29 g + 5 mL + 150 mg	3.0 mg

**Tabelle 23:** Zusammenfassung der Fütterungsexperimente an Tü 3634.

## 5. Charakterisierung des Metaboliten

1-*O*-Benzoyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (**20**)

C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub> (268.27)

*R<sub>f</sub>*-Werte: 0.58 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 8:2)

0.68 (BuOH/HOAc/H<sub>2</sub>O 4:1:5)

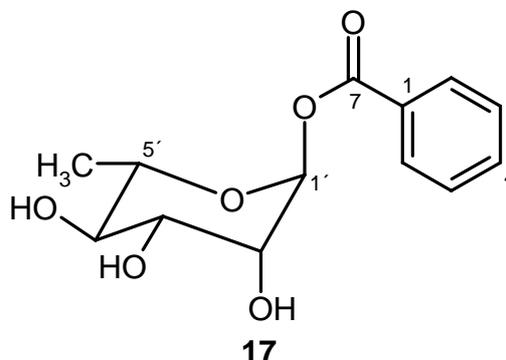
Anfärbeverhalten: gelb (Anisaldehyd)

DCI-MS: *m/z* (%) = 303 (100) [M+NH<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 286 (33) [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 224 (10) [M-CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 241 (12), 181 (30) [C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.

IR (KBr):  $\tilde{\nu}_{max}$  = 3384, 2979, 2916, 1726, 1601, 1451, 1320, 1271 cm<sup>-1</sup>.

UV-VIS: (MeOH)  $\lambda_{max}$  (lg  $\epsilon$ ) = 230 nm (4.11), 274 (2.98).

Drehwert:  $[\alpha]_{20}^D$  = - 52° (c = 0.35, Methanol).



<sup>1</sup>H-NMR: (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 1.28 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, 6'-H<sub>3</sub>), 3.50 (dd, *J* = 9.5, 9.5 Hz, 1H, 4'-H), 3.76 (dq, *J* = 6.3, 9.5 Hz, 1H, 5'-H), 3.83 (dd, *J* = 9.5, 3.5 Hz, 1H, 3'-H), 3.97 (dd, *J* = 3.5, 1.9 Hz, 1H, 2'-H), 6.18 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, 1'-H), 7.50 (dd, *J* = 7.5, 7.5, 2H, 3-H, 5-H), 7.64 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, 4-H), 8.03 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 2H, 2-H, 6-H) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR: (125.7 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 18.1 (q, C-6'), 71.2 (d, C-2'), 72.3 (d, C-3'), 72.6 (d, C-5'), 73.5 (d, C-4'), 95.9 (d, C-1'), 129.8 (d, C-3, C-5), 130.5 (s, C-1), 130.7 (d, C-2, C-6), 134.8 (d, C-4), 166.0 (s, C-7) ppm.

---

## XVI Sekundärmetabolite aus extremophilen Mikroorganismen

### 1. Stammhaltung und Langzeitkonservierung

Die aus Firma *Brain AG* erhaltenen extremophilen Mikroorganismen wurden auf vier verschiedenen Medien (M1, M2/M2<sup>+</sup>, STA und GYM), mit Sporen einer gut bewachsenen Agarplatte bzw. einer Abimpfung aus der Stickstoff-Einlagerung, ausgestrichen und bei 37°C 7 d inkubiert. Das Medium, auf dem das beste Wachstum zu beobachten war, verwendete man zur Stammhaltung. Die Agarplatten wurden bei 4°C gelagert, die Langzeithaltung der Stämme erfolgte in flüssigem Stickstoff (analog zu B XI1.2).

### 2. Durchführung des chemisch biologischen Screenings

Die Kultivierung der zu untersuchenden Stämme erfolgte in vier verschiedenen Medien (Hafer, M2, SM und SGG) in 300 mL Erlenmeyerkolben (drei Schikanen, Schaumstoffkappe), die jeweils mit 100 mL Medium befüllt waren. Die Vorkulturen wurden mit einem 1 cm<sup>2</sup> großem Stück einer gut bewachsenen Agarplatte beimpft und bei 50°C und 180 rpm für 48 h rotierend geschüttelt wurden. Die Hauptkultur wurde mit 5 mL einer 48 h alten Vorkultur angeimpft, bei 50°C und 180 rpm inkubiert. Die Ernte erfolgte nach drei oder vier Inkubationstagen je nach pH-Verlauf der Kultur. War der pH-Wert nach drei Tagen schon bei  $\geq 7.0$  wurde die Fermentation abgebrochen, ansonsten wurden die Kulturen weiter inkubiert. Es wurden je Nährmedium zwei Kolben angesetzt, die bei gleichem Aussehen und pH-Wert zusammen aufgearbeitet wurden.

Mycel und Kulturfiltrat der vereinigten Kulturbrühen (200 mL), die auf pH 5.0 eingestellt wurde, wurden über Celite von einander getrennt. Das Mycel wurde mit 100 mL Aceton versetzt, 15 min im Ultraschallbad aufgeschlossen, der Acetonextrakt von festen Bestandteilen durch Filtration abgetrennt und das Lösungsmittel des Extraktes im Vakuum entfernt. Das Kulturfiltrat wurde an Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 (50 mL) adsorbiert, dieses mit 100 mL Wasser gewaschen und mit 200 mL Methanol extrahiert. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Vakuum entfernt. Die so erhaltenen Extrakte wurden je in 1 mL eines Methanol-Wasser-Gemisches (9:1) aufgenommen, 10  $\mu$ L dieser Lösung auf eine HPTLC-Kieselgelplatte aufgetragen und dünnschichtchromatographisch untersucht. Als

Standardlaufmittel fanden Chloroform/Methanol (9:1) bzw. n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) Verwendung. Für die Entwicklung der Dünnschichtchromatogramme wurden die Sprühreagenzien Anisaldehyd/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Orcin und Ehrlich benutzt. Die Analyse des Metabolitenmusters erfolgte durch UV-Löschung und mit Hilfe von Sprühreagenzien.

### **3. Aufarbeitung von Fermentationsansätzen**

#### **3.1. Kultivierung im Fermenter**

Interessante Screening-Ansätze wurden im Biostat E Fermenter im 10 L-Maßstab reproduziert. Der Biostat E Fermenter wurde mit 9 L des jeweiligen Produktionsmediums bestückt und autoklaviert. Als Inokulum diente 1 L einer 48 Stunden alten Vorkultur, der analog zu (B 2) angezogen wurde. Die Fermentation wurde bei einer Rührergeschwindigkeit von 200 rpm, einer Temperatur von 50°C und einer Luftzufuhr von 1.0 vvm durchgeführt. Es wurde eine pH-Sperre von  $\text{pH} = 6.5 \pm 1.5$  festgelegt. Die Ernte erfolgt nach 96 Inkubationsstunden. Die Aufarbeitung eines großen Fermentationsansatzes erfolgte analog zu B 2.

### **4. *Streptomyces termonitrificans* Stamm 3-008**

#### **4.1. Kultivierung und Aufarbeitung**

Der Stamm 3-008 wurde wie unter B 3.1 beschrieben in einem Biostat E Fermenter im 10 L Maßstab mit SM als Nährmedium kultiviert und aufgearbeitet. Aus dem Kulturfiltrat dieses Fermentationsansatzes konnte 1-Methyl-iso-inosin (**105**) und Indol-3-Milchsäure (**106**) in Ausbeuten von 0.2 mg bzw. 1.1 mg/L isoliert werden.

#### **4.2. Isolierung und Charakterisierung der Metabolite**

##### **1-Methyl-iso-inosin (**110**)**

**110** konnte in einer Ausbeute von 0.2 mg/L aus dem Kulturfiltrat einer Fermentation in einem Biostat E Fermenter (Medium SM) erhalten werden. Die Aufreinigung erfolgte durch Chromatographie an Sephadex LH-20 (1 m, MeOH) und Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 4:1 → 1:1).

$C_{11}H_{14}N_4O_5$  (282.26)

**$R_f$ -Werte:** 0.25 ( $CH_2Cl_2/MeOH$  8:2)

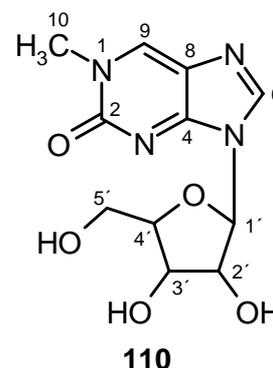
**Anfärbeverhalten:** gelb (Anisaldehyd)

**EI-MS:**  $m/z$  (%) = 282.2 (10)  $[M]^+$ , 150.1 (100), 136.0 (95), 107.1 (55).

**ESI-MS:** (positive Ionen)  $m/z$  (%) = 305.2  $[M+Na]^+$ , 587.0  $[2M+Na]^+$ .

**HR-ESI-MS:** berechnet  $m/z$  (%) = 283.1038050  $[M+H]^+$ , 305.0857590  $[M+Na]^+$ .

gefunden  $m/z$  (%) = 283.10380  $[M+H]^+$ , 305.08576  $[M+Na]^+$ .



**$^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ ):**  $\delta$  = 3.61 (s, 3H, 10- $H_3$ ), 3.74 (dd,  $J$  = 12, 3.5 Hz, 1H, 5'- $H_a$ ), 3.85 (dd,  $J$  = 12, 3.5 Hz, 1H, 5'- $H_b$ ), 4.13 (dd, 6.5, 3.5 Hz, 1H, 4'-H), 4.32 (dd,  $J$  = 5.5, 3.5 Hz, 1H, 3'-H), 4.62 (dd,  $J$  = 5.5, 5.5 Hz, 1H, 2'-H), 5.99 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 1H, 1'-H), 8.29 (s, 1H, 9-H), 8.32 (s, 1H, 6-H) ppm.

**$^{13}C$  NMR (125.7 MHz,  $CD_3OD$ ):**  $\delta$  = 34.3 (q, C-10), 63.0 (t, C-5'), 72.1 (d, C-3'), 76.1 (d, C-2'), 87.5 (d, C-4'), 90.5 (d, C-1'), 125.2 (s, C-8), 141.3 (d, C-5), 148.9 (s, C-4), 149.9 (d, C-9), 158.8 (s, C-2) ppm.

Indol-3-Milchsäure (**111**)

**106** konnte in einer Ausbeute von 1.1 mg/L aus dem Kulturfiltrat einer Fermentation in einem Biostat E Fermenter (Medium SM) erhalten werden. Die Aufreinigung erfolgte durch Chromatographie an Sephadex LH-20 (1 m, MeOH) und Kieselgel ( $CH_2Cl_2/MeOH$  2:1  $\rightarrow$  1:1).

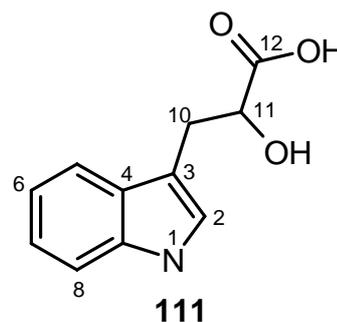
$C_{11}H_{11}NO_3$  (205.22)

**$R_f$ -Werte:** 0.06 ( $CH_2Cl_2/MeOH$  8:2)

0.74 (MeOH/ $H_2O$  6:4)

**Anfärbeverhalten:** rosa (Anisaldehyd)

dunkellila (Ehrlichs Reagenz)



**ESI-MS:** (negativ Ionen)  $m/z$  (%) = 204 [M-H]<sup>-</sup>, 186.2 [M+H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, 158.2 [M-COOH]<sup>-</sup>.

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}_{\max}$  = 3399, 3055, 2923, 1595, 1420, 1350, 1234, 1089, 1016, 743 cm<sup>-1</sup>.

**UV-VIS:** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  ( $\epsilon$ ) = 223 (73820), 281 (12570), 290 (10470);

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\max}$  ( $\epsilon$ ) = 222 (70680), 281 (12570), 289 (11000);

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\max}$  ( $\epsilon$ ) = 222 (72780), 281 (11520), 290 (9950) nm.

**Drehwert :**  $[\alpha]_D^{20} = +36^\circ$  (MeOH,  $c = 5 \cdot 10^{-2}$  mol/L).

**<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 2.97 (dd,  $J = 14, 8.5$  Hz, 1H, 10-H<sub>a</sub>), 3.28 (d,  $J = 3$  Hz, 1H, 10-H<sub>b</sub>), 4.25 (dd, 8.5, 3 Hz, 1H, 11-H), 6.96 (t,  $J = 8, 8$  Hz, 1H, 7-H), 7.04 (t,  $J = 8, 8$  Hz, 1H, 6-H), 7.11 (s, 1H, 2-H), 7.29 (d,  $J = 8$  Hz, 1H, 5-H), 7.66 (d,  $J = 8$  Hz, 1H, 8-H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD):**  $\delta$  = 32.2 (t, C-10), 74.3 (d, C-11), 112.0 (s, C-3), 112.6 (d, C-8), 119.4 (d, C-5), 119.8 (d, C-6), 122.0 (d, C-7), 124.4 (d, C-2), 129.2 (s, C-4), 138.0 (s, C-9), 181.3 (s, C-12) ppm.

## 5. *Saccharomonospora* sp. Stamm 3-009

### 5.1. Kultivierung und Aufarbeitung

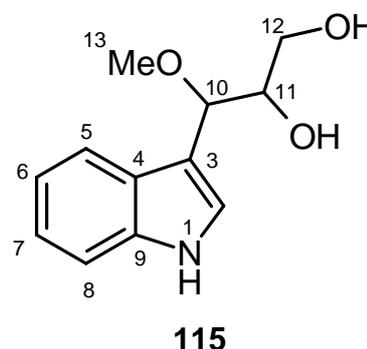
Der Stamm 3-009 wurde bei der Firma *Brain AG* wie folgt kultiviert. Die Anzucht der Agarplatten wurde auf M2-Platten begonnen, die aus einer Stickstoffeinlagerung angeimpfte Platte wurde 72 h bei 50°C inkubiert. Sporen von dieser Platte wurde auf eine Hafer-Platte überimpft und weitere 96 h bei 50°C inkubiert. Für die Vorkultur wurden vier 2 L-Schikanekolben mit 250 mL Hafer-Nährmedium befüllt und mit ½ Haferplatte angeimpft. Die Vorkulturen wurden drei Tage bei 180 rpm und 50°C inkubiert. Die Hauptkultur wurde mit einem Liter der Vorkultur angeimpft in einem 10 L Fermenter, der mit 9 L Hafer-Medium beschickt war. Die Inkubation wurde bei einer Rührergeschwindigkeit von 200 rpm, einer Luftzufuhr von 6 L/min, einer Temperatur von 50°C und einer pH-Sperre von  $\text{pH} = 7.0 \pm 1.0$  durchgeführt. Die Luftzufuhr musste in der 7. Inkubationsstunde auf 4 L/min, in der 46. Stunde auf 3 L/min und schließlich in der 54. Stunde auf 2 L/min wegen sehr starker Schaumbildung herunter geregelt werden. Aus dem Kulturfiltrat dieses Fermentationsansatzes konnte das 3-(2,3-Dihydroxy-1-methoxypropyl)-indol (**115**) und die *p*-Hydroxyphenylelessigsäure (**116**) in Ausbeuten von 1.0 mg bzw. 0.4 mg/L isoliert werden. Zusätzlich konnte noch eine extrem cytotoxische Fraktion verifiziert werden, deren cytotoxische Substanz aber bislang nicht identifiziert wurde.

## 5.2. Isolierung und Charakterisierung der Metabolite

### 3-(2,3-Dihydroxy-1-methoxypropyl)-indol (**115**)

**115** konnte in einer Ausbeute von 1.0 mg/L aus dem Kulturfiltrat einer Fermentation im 10 L Maßstab (Hafer-Medium) erhalten werden. Die Aufreinigung erfolgte durch Chromatographie an Sephadex LH-20 (1 m, MeOH) und Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 4:1 → 2:1).

C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub> (221.26)



*R<sub>f</sub>*-Werte: 0.15 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8:2)

0.78 (MeOH/H<sub>2</sub>O 6:4)

**Anfärbeverhalten:** braun (Anisaldehyd)

**EI-MS:**  $m/z$  (%) = 221.2 (15) [M]<sup>+</sup>, 160.1 (100) [M-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 130.1 (75) [M-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>.

**ESI-MS:** (positiv Ionen)  $m/z$  (%) = 244 [M+Na]<sup>+</sup>, 465 [2M+Na]<sup>+</sup>.

**HR-ESI-MS:** berechnet  $m/z$  (%) = 244.09441 [M+Na]<sup>+</sup>.

gefunden  $m/z$  (%) = 244.09459 [M+Na]<sup>+</sup>.

**IR (KBr):**  $\tilde{\nu}_{\max}$  = 3426, 2936, 1636, 1567, 1384, 1102, 1043, 747 cm<sup>-1</sup>.

**UV-VIS:** (MeOH):  $\lambda_{\max}$  (ε) = 216 (62030), 279(13290), 290 (11390);

(MeOH/HCl):  $\lambda_{\max}$  (ε) = 218 (63290), 280 (13920), 288 (12030);

(MeOH/NaOH):  $\lambda_{\max}$  (ε) = 217 (69620), 280 (12660), 289 (12660) nm.

**Drehwert :**  $[\alpha]_D^{20}$  = - 12° (MeOH, c = 2.5 · 10<sup>-2</sup>mol/L).

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ = 3.22 (s, 3H, 13-H<sub>3</sub>), 3.62 (dd, *J* = 11.5, 6.5 Hz, 1H, 12-H<sub>a</sub>), 3.74 (dd, *J* = 11.5, 4.0 Hz, 1H, 12-H<sub>b</sub>), 4.03 (m, 1H, 11-H), 4.51 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, 10-H), 6.99 (dt, *J* = 7.0, 1.0 Hz, 1H, 6-H), 7.09 (m, 1H, 7-H), 7.23 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, 2-H), 7.35 (dd, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H, 8-H), 7.66 (dt, *J* = 7.0, 1.0 Hz, 1H, 5-H), 10.1 (d<sub>br</sub>, 1H, 1-H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (150.8 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ = 56.7 (q, C-13), 64.7 (t, C-12), 75.5 (d, C-11), 80.6 (d, C-10), 112.4 (d, C-8), 113.1 (s, C-3), 120.0 (d, C-6), 120.7 (d, C-5), 122.5 (d, C-7), 125.8 (d, C-2), 127.6 (s, C-4), 138.4 (s, C-9) ppm.

*p*-Hydroxyphenyllessigsäure (**116**)

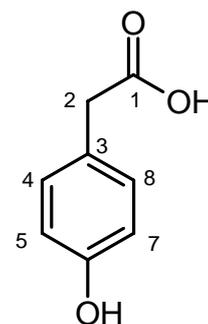
**116** konnte in einer Ausbeute von 0.2 mg/L aus dem Kulturfiltrat einer Fermentation im 10 L Maßstab (Hafer-Medium) erhalten werden. Die Aufreinigung erfolgte durch Chromatographie an Sephadex LH-20 (1 m, MeOH) und Kieselgel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 4:1 → 2:1).

C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> (152.12)

**R<sub>F</sub>-Werte:** 0.45 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 8:2)

**Anfärbeverhalten:** gelb (Anisaldehyd)

**EI-MS:** *m/z* (%) = 152.2 (35) [M]<sup>+</sup>, 107.1 (100) [M-COOH]<sup>+</sup>, 77.1 (20) [C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>]<sup>+</sup>.



**116**

**<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ = 3.22 (s, 2H, 2-H<sub>2</sub>), 6.70 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 4-H, 8-H), 7.06 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, 5-H, 7-H) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR (150.8 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ = 42.7 (t, C-2), 116.1 (d, C-4, C-8), 128.1 (s, C-3), 131.3 (d, C-5, C-7), 157.1 (s, C-6), 180.5 (s, C-1).

## 6. Biologische Aktivität

Die Testung der biologischen Aktivität von Extrakten, Fraktionen und Reinsubstanzen wurde von der Firma *Brain AG* durchgeführt. Dazu wurden der Firma jeweils 5% des zu untersuchenden Gemisches/Reinsubstanz zugesand. Die Indikatororganismen waren Hefen: *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida glabrata* oder *Sporobolomyces johnsonii*; Bakterien: *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium smegmatis* oder ein *Halobacterium* sp. Zu diesem Zweck wurden die Indikatororganismen in ausreichender Zelldichte auf die für sie jeweils spezifischen Wachstumsmedien gleichmäßig ausplattiert. Sodann wurden die Rohextrakte, Fraktionen und Reinsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen auf Filterplättchen aufgetropft, auf die angeimpften Platten gegeben wurden und diese anschließend bei den jeweils

organismenspezifischen Temperaturen bis zum Auftreten eines dichten Zellrasens inkubiert. Die Hemmhöfe wurden gemäß ihres Durchmessers bewertet.

Zusätzlich wurden Kultur- und Zellextrakte hergestellt und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Nachfolgend wurden diese ‚upside down‘ auf mit Indikatororganismen angeimpfte Platten gelegt und diese wie oben inkubiert und ausgewertet. Alternativ besprüht man die DC-Platten direkt mit einer Suspension aus Medium und Indikatororganismus. Die Aussagekraft dieser Assays ist insofern größer, als ein Hemmhof jetzt direkt einem ‚spot‘ auf dem DC und damit einer bestimmten Fraktion des Extrakts, manchmal sogar einer bestimmten Substanz, zugeordnet werden konnte, was die spätere chemische Analyse erleichterte.

---

## C. LITERATURVERZEICHNIS

- <sup>1</sup> D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022 – 1037.
- <sup>2</sup> M. S. Butler, *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 162 – 195.
- <sup>3</sup> R. Breinbauer, M. Manger, M. Scheck, H. Waldmann, *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 2129 – 2145.
- <sup>4</sup> T. Henkel, R. M. Brunne, H. Müller, F. Reichel, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 688 – 691.
- <sup>5</sup> Y.-Z. Shu, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1053 – 1071.
- <sup>6</sup> J. Mann, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 417 – 430.
- <sup>7</sup> S. Sakunda, S. Tanaka, K. Mizuno, O. Sukcharoen, T. Nihira, A. Yamada, *J. Chem. Soc. Perkin Transaction I* **1993**, 2309 – 2315.
- <sup>8</sup> A. Fleming, *Brit. J. Pat.* **1929**, *10*, 226 – 236.
- <sup>9</sup> S. A. Waksman, H. A. Lechevalier, *Science* **1949**, *109*, 305 – 307..
- <sup>10</sup> A. Adremont, D. Corpet, P. Courvalin, *Spektrum der Wissenschaft* **1997**, *7*, 50 – 57.
- <sup>11</sup> V. Bartsch, *Das Taxol-Buch*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2000**.
- <sup>12</sup> R. Schulze, G. Meurer, *BIOspektrum* **2005**, *8*, 489 – 501.
- <sup>13</sup> P. Proksch, R. A. Edrada, R. Ebel, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *59*, 125 – 134.
- <sup>14</sup> K. Rinehart, T. G. Holt, N. L. Fregeau, J. G. Stroh, P. A. Kiefer, F. Sun, L. H. Li, D. G. Martin, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4512 – 4515.
- <sup>15</sup> J. Kortmansky, G. K. Schwartz, *Cancer Investigation* **2003**, *21*, 924 – 936.
- <sup>16</sup> R. Mutter, M. Willis, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *41*, 1007 – 1011.
- <sup>17</sup> J. Kortmansky, G. K. Schwartz, *Cancer Investigations* **2003**, *21*, 924 – 936.
- <sup>18</sup> P. A. Wender, B. Lipka, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1007 – 1011.
- <sup>19</sup> J. Gomes, W. Steiner, *Food Technol. Biotechnol.* **2004**, *42*, 223 – 235.
- <sup>20</sup> S. Fujiwara, *J. Bioscience and Bioengineering* **2002**, *94*, 518 – 525.
- <sup>21</sup> M. Rossi, M. Ciaramella, R. Cannio, F. M. Pisani, M. Moracci, S. Bartolucci, *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 3683 – 3689.
- <sup>22</sup> F. Nienhaus, C. Bertoldo, M. Kähler, G. Antranikian, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *51*, 711 – 729.
- <sup>23</sup> J. Meinwald, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4903 – 4909.
- <sup>24</sup> A. L. Demain, *Nature Biotechnology* **2002**, *20*, 331.
- <sup>25</sup> A. Baeyer, V. Villiger, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1899**, *32*, 3625.

- 
- <sup>26</sup> R. Crigee, *Liebigs Ann. Chem.* **1948**, 560, 127.
- <sup>27</sup> M. Renz, B. Meunier, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 737 – 750.
- <sup>28</sup> J. H. Dawson, M. Sono, *Chem. Rev.* **1987**, 87, 1255 – 1278.
- <sup>29</sup> B. A. Palfey, D. P. Ballou, V. Massey, *Oxygen Activation by Flavins and Pterins*, in: *Active Oxygen in Biochemistry Volume 3*, edited by J. S. Valentine, C. S. Foote, A. Greenberg, J. F. Liebman, Blackie Academic & Professional, London, Glasgow, Weinheim **1995**, 37 – 83.
- <sup>30</sup> G. E. Turfitt, *Biochemical Journal* **1948**, 42, 376.
- <sup>31</sup> N. M. Kamerbeek, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 2107 – 2116.
- <sup>32</sup> A. Willetts, *Trens Biotechnol.* **1997**, 15, 55 – 62.
- <sup>33</sup> U. Rix, C. Fischer, L. L. Remsing, J. Rohr, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 542 – 580.
- <sup>34</sup> U. Rix, C. Wang, Y. Chen, F. M. Lipata, L. L. Remsing Rix, L. M. Greenwell, L. C. Vining, K. Yang, J. Rohr, *ChemBioChem* **2005**, 6, 838 – 845.
- <sup>35</sup> M. Gibson, M. Nur-e-alam, F. Lipata, M. A. Oliveira, R. Rohr, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17594 – 17595.
- <sup>36</sup> N. A. Donoghue, D. B. Norris, P. W. Trudgill, *Eur. J. Biochem.* **1987**, 63, 175 – 192.
- <sup>37</sup> C. C. Ryerson, D. P. Ballou, C. Walsh, *Biochemistry* **1982**, 21, 2644 – 2655.
- <sup>38</sup> D. W. Shen, D. P. Ballou, V. Massey, *Biochemistry* **2001**, 40, 11156 – 11167.
- <sup>39</sup> S. Chandrasekhar, C. D. Roy, *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 6371 – 6372.
- <sup>40</sup> J. M. Schwab, W. B. Li, L. P. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 4800 – 4808.
- <sup>41</sup> M. F. Dutton, *Microbiol. Rev.* **1988**, 52, 274 – 295.
- <sup>42</sup> W. B. Turner, D. C. Aldridge, *Fungal Metabolites II*, Academic Press, London, New York **1983**.
- <sup>43</sup> J. Rohr, R. Thiericke, A. Zeeck, *Nat. Prod. Rep.* **1992**, 9, 103 – 137.
- <sup>44</sup> H.-J. Schiewe, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1997**.
- <sup>45</sup> S. Grond, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1997**.
- <sup>46</sup> R. Kind, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1991**.
- <sup>47</sup> G. Bach, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1995**.
- <sup>48</sup> E. Jurkiewicz, P. Panse, K. D. Jentsch, H. Hartmann, G. Hunsmann, *AIDS* **1989**, 3, 423.
- <sup>49</sup> S. Harada, Y. Kuyanagi, N. Yamamoto, *Science* **1985**, 229, 563.
- <sup>50</sup> B. Bethe, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1994**.
- <sup>51</sup> V. Prelog, W. Oppolzer, *Helv. Chim. Acta* **1973**, 56, 239 – 240.
- <sup>52</sup> S. J. Admiraal, C. Koshla, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2002**, 41, 5313 – 5324.

- <sup>53</sup> M. Ishibashi, M. Takahashi, J. Kobayashi, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 7827 – 7832.
- <sup>54</sup> R. B. Woodward, *Angew. Chem.* **1957**, *69*, 50 – 58.
- <sup>55</sup> H. Aschenbach, A. Mühlenfeld, U. Fauth, H. Zähler, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *50*, 6167 – 6170.
- <sup>56</sup> H. Aschenbach, A. Mühlenfeld, U. Fauth, H. Zähler, *J. Antibiot.* **1986**, *34*, 1760 – 1764.
- <sup>57</sup> J. P. Vigneron, R. Méric, M. Larchevêque, A. Debal, J. Y. Lallemand, G. Kunesch, P. Zagatti, M. Gallois, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 3521 – 3529.
- <sup>58</sup> E. Piers, *Can. J. Chem.* **1994**, *72*, 146.
- <sup>59</sup> M. S. Buchanan, T. Hashimoto, S. Takaoka, Y. Asakawa, *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1251 – 1257.
- <sup>60</sup> U. Gräfe, *Biochemie der Antibiotika*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York **1992**.
- <sup>61</sup> O. Hara, T. Beppu, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 349-358.
- <sup>62</sup> T. Nihira, Y. Shimizu, H. S. Kim, Y. Yamada, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 1828-1837.
- <sup>63</sup> U. Gräfe, W. Schade, I. Eritt, W. F. Fleck, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1722-1723.
- <sup>64</sup> S. Swift, M. K. Winson, P. F. Chan, N. J. Bainton, M. Birdsall, P. J. Reeves, C. E. D. Rees, S. R. Chabra, P. J. Hill, J. P. Throup, B. W. Bycroft, G. P. C. Salmond, P. Williams, G. S. A. B. Stewart, *Mol. Microbiol.* **1993**, *10*, 511 – 520.
- <sup>65</sup> G. P. C. Salmond, B. W. Bycroft, G. S. A. B. Stewart, P. Williams, *Mol. Microbiol.* **1995**, *16*, 615 – 624.
- <sup>66</sup> G. G. Yarbrough, D. P. Taylor, R. T. Rowland, M. S. Crawford, L. L. Lasur, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 535 – 544.
- <sup>67</sup> F. G. Bader, *The Bacteria Band 9*, edited by S. W. Queener, L. E. Day, Academic Press, London **1986**, 281 – 321.
- <sup>68</sup> K. Ueda, Y. Tomaru, K. Endoh, T. Beppu, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 693 – 695.
- <sup>69</sup> Y. Iwai, S. Omura, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 123 – 141.
- <sup>70</sup> W. Crueger, A. Crueger, *Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie*, Oldenbourg Verlag, München **1984**.
- <sup>71</sup> C. Abell, *Enzymology and Molecular Biology of the Shikimat Pathway*, in: *Comprehensive Natural Product Chemistry Volume 1*, edited by D. Barton, K. Nakanishi, Elsevier, Amsterdam **1999**, 573 – 607.
- <sup>72</sup> Produktinformation MONSANTO, <http://www.roundupultra.de>

- 
- <sup>73</sup> H. A. Powell, N. W. Kerby, P. Powell, *New. Phytol.* **1991**, *119*, 421 – 426.
- <sup>74</sup> C. Boddin, *Dissertation*, Universität Göttingen **1995**.
- <sup>75</sup> C. Volkmann, *Dissertation*, Universität Göttingen **1993**.
- <sup>76</sup> O. Potterat, H. Zähler, C. Volkmann, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 346 – 349.
- <sup>77</sup> C. M. Williams, L. N. Mander, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 425 – 447.
- <sup>78</sup> H. Takemura, H. Kariyazono, N. Kon, T. Shinmyozu, T. Inazu, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9077 – 9079.
- <sup>79</sup> H. Meier, *Angew. Chem.* **1992**, *104*, 1425 – 1446.
- <sup>80</sup> Q. W. Shi, F. Sauriol, Y. Park, V. H. Smith Jr., G. Lord, L. O. Zamir, *Magn. Reson. Chem.* **2005**, *43*, 798 – 804.
- <sup>81</sup> J. N. Collie, *Proc. Chem. Soc.* **1907**, *23*, 230 – 231.
- <sup>82</sup> R. Robinson, *J. Roy. Soc. Arts* **1948**, *96*, 795.
- <sup>83</sup> A. J. Birch, F. W. Donovan, *Aust. J. Chem.* **1953**, *6*, 360 – 368.
- <sup>84</sup> L. Katz, S. Donadio, *Annu. Rev. Microbiol.* **1993**, *47*, 875 – 912.
- <sup>85</sup> D. A. Hopwood, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2465 – 2498.
- <sup>86</sup> C. W. Carreras, R. Pieper, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5158 – 5159.
- <sup>87</sup> H. B. Bode, R. Müller, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 6988 – 7007.
- <sup>88</sup> J. Staunton, K. J. Weissmann, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380 – 460.
- <sup>89</sup> M. B. Austin, J. P. Noel, *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 79 – 100.
- <sup>90</sup> R. McDaniel, D. A. Hopwood, S. Ebert-Khosla, C. Khosla, *Science* **1993**, *262*, 1546 – 1550.
- <sup>91</sup> Die Fütterungsexperimente mit <sup>13</sup>C-markierten Verbindungen, wurden von H.-J. SCHIEWE im Anschluss an seine Dissertation durchgeführt und sind bislang nicht veröffentlicht.
- <sup>92</sup> H. B. Bode, A. Zeeck, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, *16*, 2665 – 2670.
- <sup>93</sup> R. M. Risley, R. L. van Etten, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 252 – 253.
- <sup>94</sup> J. C. Vederas, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 374 – 376.
- <sup>95</sup> R. M. Risley, R. L. van Etten, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 4609 – 4614.
- <sup>96</sup> R. M. Risley, R. L. van Etten, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6699 – 6702.
- <sup>97</sup> R. M. Risley, R. L. van Etten, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4389 – 4392.
- <sup>98</sup> W. Eisenreich, B. Menhard, M. S. Lee, M. H. Zenk, A. Bacher, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9694 – 9695.
- <sup>99</sup> H. Oikawa, S. Ohashi, A. Ichihara, S. Sakamura, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 7541 – 7554.

- <sup>100</sup> H. Oikawa, Y. Murakami, A. Ichihara, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4533 – 4536.
- <sup>101</sup> C. J. Pearce, R. R. West, G. T. Carter, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1809 – 1812.
- <sup>102</sup> C. Kitao, H. Tanaka, S. Minami, S. Omura, *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 711 – 716.
- <sup>103</sup> S. Omura, H. Ikeda, H. Matsubara, N. Sadakane, *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 1570 – 1572.
- <sup>104</sup> R. Höfs, M. Walker, A. Zeeck, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3400 – 3403.
- <sup>105</sup> B. Bister, D. Bischoff, M. Ströbele, J. Riedlinger, A. Reicke, F. Wolter, A. T. Bull, H. Zähner, H.-P. Fiedler, R. D. Süssmuth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2574 – 2576.
- <sup>106</sup> C. W. Carreras, R. Pieper, C. Khosla, *Top. Curr. Chem.* **1997**, *188*, 85 – 126.
- <sup>107</sup> R. Hoffmann, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 2046 – 2048.
- <sup>108</sup> K. N. Houk, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 4143 – 4145.
- <sup>109</sup> K. N. Houk, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 4145 – 4147.
- <sup>110</sup> N. S. Bhacca, L. J. Luskus, K. N. Houk, *Chem. Commun.* **1971**, 109 – 111.
- <sup>111</sup> J. H. Rigby, K. R. Fales, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5717 – 5720.
- <sup>112</sup> H. Bockholt, G. Udvarnoki, J. Rohr, U. Mocek, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2064 – 2069.
- <sup>113</sup> H. Kachi, H. Hattori, T. J. Sassa, *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 164 – 166.
- <sup>114</sup> Persönliche Mitteilung von H.-J. Schiewe.
- <sup>115</sup> K. Schröder, A. Zeeck, *Tetrahedron Lett.* **1973**, *14*, 4995 – 4998.
- <sup>116</sup> E. J. Corey, L. O. Weigel, A. R. Chamberlin, H. Cho, D. H. Hua, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6613 – 6615.
- <sup>117</sup> J. L. G. Ruano, C. Fajardo, A. Fraile, M. R. Martín, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4300 – 4306.
- <sup>118</sup> W. H. Rastetter, T. J. Richard, M. D. Lewis, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3163 – 3166.
- <sup>119</sup> E. J. Corey, B. B. Snider, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 2549 – 2550.
- <sup>120</sup> A. G. Meyer, S. J. Danishefsky, *Classics in Total Synthesis II – More Targets, Strategies, Methods*, edited by K. C. Nicolaou, S. A. Snyder, Wiley-VCH, Weinheim **2003**, 75 – 108.
- <sup>121</sup> S. Danishefski, P. J. Schuda, T. Kitaharund, S. J. Etheredge, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6066 – 6075.
- <sup>122</sup> E. E. van Tamelen, J. P. Demers, E. G. Taylor, K. Koller, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5424 – 5425.
- <sup>123</sup> M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart, New York **2002**, 201.

- <sup>124</sup> J. Halász, B. Podányi, L. Vasvári-Debreczy, A. Szabó, F. Hajdú, Z. Böcxkei, J. Hegedüs-Vajda, A. Gyórbíró, I. Hermeicz, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 10081 – 10085.
- <sup>125</sup> H. Kuboki, T. Tsuchida, K. Wakazono, K. Isshiki, H. Kumagai, T. Yoshioka, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 590 – 593.
- <sup>126</sup> S. Siegel, G. V. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 6082 – 6087.
- <sup>127</sup> S. Mitsui, Y. Senda, H. Saito, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1966**, *39*, 694.
- <sup>128</sup> J. A. Osborn, F. H. Jardine, J. F. Young, G. Wilkinson, *J. Chem. Soc.* **1966**, *A*, 1711.
- <sup>129</sup> E. M. Stocking, R. M. Williams, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3078 – 3115.
- <sup>130</sup> H. Oikawa, T. Tokiwano, *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 321 – 352.
- <sup>131</sup> G. Pohnert, *ChemBioChem.* **2001**, *2*, 873 – 875.
- <sup>132</sup> U. Rix, L.L. Remsing, D. Hofmeister, A. Bechthold, J. Rohr, *ChemBioChem* **2003**, *1*, 109 – 111.
- <sup>133</sup> L. Zhu, B. Ostash, U. Rix, M. Nur-e-Alam, A. Mayers, A. Luzhetskyy, C. Mendez, J. A. Salas, A. Bechthold, V. Fedorenko and J. Rohr, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 631 – 638.
- <sup>134</sup> L. Prado, E. Fernández, U. Weißbach, G. Blanco, L. M. Quirós, A. F. Brana, C. Méndez, J. Rohr, J. Salas, *Chemistry & Biology* **1999**, *6*, 19-30.
- <sup>135</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <sup>136</sup> C. Puder, S. Loya, A. Hinzi, A. Zeeck, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 729 – 735.
- <sup>137</sup> M. Metsä-Ketelä, K. Ylihonko, P. Mäntsälä, *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 502 – 510.
- <sup>138</sup> <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
- <sup>139</sup> A. Trefzer, S. Pelzer, J. Schimana, S. Stockert, C. Bihlmaier, H.-P. Fiedler, K. Welzel, A. Vente, A. Bechthold, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 1174 – 1182.
- <sup>140</sup> M. Holzenkämpfer, *Dissertation*, Universität Göttingen, **2002**.
- <sup>141</sup> M. Holzenkämpfer, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 341 – 341.
- <sup>142</sup> M. R. Grever, S. A. Schepartz, B. A. Chabner, *Semin. Oncol.* **1992**, *19*, 622 – 638.
- <sup>143</sup> T. U. Mayer, T. M. Kapoor, S. J. Haggarty, R. W. King, S. L. Schreiber, T. J. Mitchinson, *Science* **1999**, *286*, 971 – 974.
- <sup>144</sup> Z. Maliga, T. M. Kapoor, T. J. Mitchison, *Chemistry & Biology* **2002**, *9*, 989 – 996.
- <sup>145</sup> S. Hotha, J. C. Yarrow, F. G. Yang, S. Garrett, K. V. Renduchintala, T. U. Mayer, T. M. Kapoor, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2481 – 2484.
- <sup>146</sup> C. Méndez, J. A. Salas, *Trends in Biotechnology* **2001**, *19*, 449 – 456.
- <sup>147</sup> Y. Nishikawa, K. Yoshimoto, M. Ohkawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 878 – 883.

- <sup>148</sup> T. Fujita, M. Nakayama, *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1545 – 1548.
- <sup>149</sup> H. Pfander, F. Wittwer, *Helv. Chim. Acta.* **1975**, *58*, 2233 – 2236.
- <sup>150</sup> S. Klick, K. Hermann, *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2177 – 2180.
- <sup>151</sup> N. Ngounou, A. Rahman, M. I. Choudhary, S. Malik, S. Zareen, R. Ali, D. Lontsi, B. L. Sondengam, *Phytochemistry* **1999**, *52*, 917 – 921.
- <sup>152</sup> H. Ito, *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1148 – 1151.
- <sup>153</sup> N. Ohshima, H. Nishitani, S. Nishikawa, K. Okumura, H. Taguchi, *Phytochemistry* **1997**, *44*, 1483 – 1484.
- <sup>154</sup> D. Soderlund, C. W. Hessney, M. Jiang, *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 100 – 105.
- <sup>155</sup> S. Kato, K. Shindo, Y. Yamagishi, M. Matsuoka, H. Kawai, J. Mochizuki, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1485 – 1493.
- <sup>156</sup> K. Shin-Ya, S. Shimizu, T. Kunigami, K. Furihata, Y. Hayakawa, H. Seto, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1378 – 1381.
- <sup>157</sup> T. Kunigami, K. Shin-Ya, K. Furihata, Y. Hayakawa, *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 880 – 882.
- <sup>158</sup> L. Hoffmann, S. Grond, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4771 – 4777.
- <sup>159</sup> S. Grond, H.-J. Langer, P. Henne, I. Sattler, R. Thiericke, S. Grabley, H. Zähner, A. Zeeck, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 929 – 937.
- <sup>160</sup> I. Papastravrou, *Dissertation*, Universität Göttingen, **2000**.
- <sup>161</sup> E. Haslam, *Shikimic Acid – Metabolism and Metabolites*, John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore **1993**.
- <sup>162</sup> H. G. Floss, *Nat. Prod. Rep.* **1997**, 433 – 452.
- <sup>163</sup> C. Hertweck, B. S. Moore, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9115 – 9120.
- <sup>164</sup> C.-Z. Wang, U. H. Maier, W. Eisenreich, P. Adam, I. Obersteiner, M. Keil, A. Bacher, M. H. Zenk, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1459 – 1465.
- <sup>165</sup> C. Hertweck, B. S. Moor, *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 9115 - 9120
- <sup>166</sup> A. M. Hill, B. L. Thompson, *Chem. Commun.* **2003**, 1358 – 1359.
- <sup>167</sup> A. M. Hill, B. L. Thompson, J. P. Harris, R. Segret, *Chem. Commun.* **2003**, 1360 – 1361.
- <sup>168</sup> S. A. Waksman, H. A. Lechevalier, *Science* **1949**, *109*, 305.
- <sup>169</sup> J. R. McCormick, P. A. Miller, J. A. Gorwick, N. O. Sjolander, A. P. Doerschuk, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 5572 – 5573.
- <sup>170</sup> S. Omura, *Gene* **1992**, *115*, 141 – 149.
- <sup>171</sup> F. M. Huber, R. H. Balltz, P. G. Caltrider, *Appl. Microbiol.* **1968**, *16*, 1011 – 1014.

- <sup>172</sup> S. Breiding-Mack, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 953 – 966.
- <sup>173</sup> S. Umezawa, T. Tsuchiqa, K. Tatsuna, Y. Horiyuchi, T. Usi, H. Umezawa, M. Hamada, A. Yagi, *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 20 – 27.
- <sup>174</sup> S. Grabley, J. Wink, A. Zeeck „Auffinden und Isolieren mikrobieller Sekundärstoffe am Beispiel des chemischen Screenings“ in *Jahrbuch der Biotechnologie*, Bd. 3, Carl Hanser Verlag, München **1990**, 379 – 390.
- <sup>175</sup> H. P. Fiedler, *Nat. Prod. Lett.* **1993**, *2*, 119 – 128.
- <sup>176</sup> W. Ihn, S. Heinze, U. Gräfe, *Biospektrum* **1997**, *3*, 39 – 42.
- <sup>177</sup> G. Bringmann, K. Messer, M. Wohlfarth, J. Kraus, K. Dumbuya, M. Rückert, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2678 – 2686.
- <sup>178</sup> Autorenkollektiv, *Chapman & Hall/CRC Dictionary of Natural Products on CD-ROM*, Version 9:1, Chapman&Hall, CRC, **2000**.
- <sup>179</sup> H. Laatsch, *Natrustoffdatenbank AntiBase*, Chemical Concepts, Weinheim **2000**.
- <sup>180</sup> J. M. Gulland, E. R. Holiday, *J. Chem. Soc. (Resumed)* **1936**, 765 – 769.
- <sup>181</sup> P. Kumaradhas, K. A. Nirmala, *Acta Cryst. C* **1995**, *51*, 1932 – 1934.
- <sup>182</sup> V. A. Marinos, M. E. Tate, P. J. Williams, *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2755 – 2759.
- <sup>183</sup> F. Ehrlich, K. A. Jacobsen, *Ber. Chem. Ges.* **1911**, *44*, 888.
- <sup>184</sup> L. C. Bauguess, C. P. Berg, *J. Biol. Chem.* **1934**, *104*, 675 – 689.
- <sup>185</sup> R. A. Dixon, D. Ferreira, *Phytochemistry* **2002**, *60*, 205 – 211.
- <sup>186</sup> P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman, *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Goerg Thieme Verlag Stuttgart, New York **1994**, 105 – 114.
- <sup>187</sup> <http://ug-subcd-nmcl.cd.sub.uni-goettingen.de/NetManBin/nmwebclt.dll?CONFIGID=SCIFINDER&DT=2&LANGUAGE=German>
- <sup>188</sup> B. L. Shapiro, *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1977**, *6*, 919 – 991.
- <sup>189</sup> Merck, *Anfärbereagenzien für die Dünnschicht- und Papier-Chromatographie*, Darmstadt, **1980**.
- <sup>190</sup> H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1992**.



Mit der Zusammenschrift der Dissertation geht nun endgültig die Studienzeit zu Ende. So möchte ich an dieser Stelle den phantastischen Menschen danken, die es mir ermöglichten bis hierher zu kommen.

Allen voran möchte ich meiner Mentorin Steff danken, ohne deine Begeisterungsfähigkeit und Engagement wäre ich gar nicht in die Familie der Naturstoffler aufgenommen worden. Vielen Dank Herrn Zeeck, dass Sie es mir ermöglichten unter besten Bedingungen zu forschen.

Ohne die analytischen Abteilungen des Institutes wäre ein Forschen gar nicht möglich. Daher möchte ich der NMR-Abteilung unter der Leitung von Herrn Machinek und den Mitarbeitern Carola, Martin und Christiane für die Aufnahme von NMR-Spektren danken. Ein ganz besonderer Dank gilt dir Carola, dein offenes Ohr für meine Probleme und den Fortgang der Arbeit mit dem Problemkind Collinolacton waren mir eine große Hilfe. Es ist erstaunlich, wie man aus 0.5 mg Substanz so wunderschöne 2 D NOESY-Spektren zaubern kann. Den fleißigen NMR-Messenden aus unserer Abteilung danke ich, dass sie so manches Wochenende in der Uni verbrachten, um Spektren zu messen. Namentlich sind das Steff, Sven, Diana, Jens, Olli, Tim, Frank, Inken und Sandra.

Den Mitarbeitern der Masseabteilung danke ich für die Aufnahme von Spektren. Herrn Frauendorf möchte ich danken, dass er mich in die Messmethoden der ESI- und der HPLC-MS einführte und mir freien Zugang zu der Apparatur ermöglichte. Vielen Dank Györgyi, dass du mir geduldig durch deinen Schlüssel und mit dem Wissen des Passwortes Zugang zum Auswerterechner der Masseabteilung ermöglichtest.

Ein ganz dickes Dankeschön an die TAs der Abteilung: an Micha und Hans-Jörg für die Aufnahme der spektrometrischen Daten meiner Substanzen, an sie genauso wie an Hans-Peter und Jutta für die Hilfe bei den Fermentationen im großen Maßstab. Damit sind sie am Gelingen dieser Arbeit zu einem großen Maß beteiligt.

Das Labor Z 2 mit seinem DJ Olli, dem immer destillierfreudigen quietschbunten Vogel, alias Kerstin, und Bayer Tim ermöglichte mir eine inspirierende Arbeitsatmosphäre und zeigte mir, dass Frauen doch mehr Blut sehen können als Männer.

Was wäre moderne Forschung ohne Computer oder Daten, an die man nicht herankommt? Deshalb möchte ich den Computeradministratoren der Abteilung Meike, Philipp, Gerald, Jens und Marko danken, dass sie schon manch tot oder im Nirwana geglaubte Datei wieder belebten.

Genauso möchte ich meinen Schreibraum Kolleginnen Diana und Sandra für so manch lustige Stunde hinter der Bibliothek danken. Besonders Sandra, die mir in der Schreibphase den Computer bereitwillig überließ und sich täglich über einen kaputten Monitor ärgern musste, DANKE.

Frau Gastrock und Marianne, danke ich, dass sie den Überblick über die Mediziner nie verloren haben und für ein Schwätzchen immer offen waren.

Gerade die letzten Monate meiner experimentellen Arbeit waren eine Bereicherung, denn ich durfte von Carola im Bereich der Molekularbiologie viel lernen, vielen Dank.

Für ein fleißiges, kritisches und konstruktives Korrekturlesen des Manuskriptes bedanke ich mich bei Thorsten, Inken, Sandra, Marko, Adriana, Nadine und Carola.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung sei gedankt für die gute Zusammenarbeit, eine freundschaftliche Atmosphäre und die vielen netten Stunden bei Kuchen, Feierabendbierchen oder anderen Anlässen.

Zum Glück gibt es auch ein Leben neben der Chemie. Zu aller erst muss ich meiner wunderbaren WG danken, die meine Hochs und Tiefs im Studium hautnah miterlebten. Den Nonnies sei gedankt: Suse, Sabine, Olli, Christiane, Lars, Sylvia, Pitt, Niko, Nicki, Olli Krebs, Denise, Benji, Andy, Flo, Katharina, Stephan, Kirsi, Olli Mai, Annika, Yahya und Inken, um nur einige zu nennen.

Zu den ehemaligen Göttingern zähle ich zu denen ich eine tiefe Freundschaft aufgebaut habe, die bis heute über weite Kilometer reicht. Toll dass ich euch kennen lernen durfte und wir

Für manch abendliches DoKo-Vergnügen danke ich Christiane, Heike und Thorsten, dass sie mich auch manchmal gewinnen ließen. Genauso möchte ich Sabine, Olli, Christiane und Jörg danken, dass sie ebenfalls im Besitz eines Gutscheinheftes sind und bei einem kühlen Bier und hitzigen Diskussionen in einschlägigen Etablissements der Stadt die Arbeit vergessen ließen.

Schnappi, Nubbsi, Franka und Ulli, genauso wie Jasmin, Florian, Judith, Armin, Asgeir und Nico danke, dass ihr genauso begeistert seit von Wein, Spiel, gutem Essen, Kino, Kneipen oder Konzerten. Ich hoffe wir verbringen noch viele heitere Stunden, wo auch immer – Hopp Schwiz. Ein Dank an die Käsefondue-essenden-Comedy-Company-Truppe (Sandra, Olli, Inken, Hans-Peter) für die humorvollen Stunden.

Für die körperliche Ertüchtigung beim Badminton danke ich euch Denise, Nubbsi, Olli, Sabine, Julia und Daniel, und genauso Dorthe, die so einige Kilometer bei einem Walki-Talki abriss und eine Gilmore-Girls-Hysterie im Nonnenstieg ausgelöste.

Was wäre ein Dezember ohne Geographenwandern und Mutter Jütte. Da man unvorbereitet niemals auf eine Exkursion geht, wusste ich als einzige Nicht-Geographin auch immer den Weg. Schön und kalt war es mit euch Suse, Philipp, Alex, Micha und Ewa.

Ich kann dem Lumiere meine Bewunderung aussprechen, das es in all den Jahren meinem Anspruch an guten Filme genüge getan hat. Salvatore, deine Pizza Parma Rucicola ist spitze. Ich kann euch nur sagen im Esprit gibt es den köstlichsten Kaffee und im Alibaba den besten Chai von Göttingen, da kann man das Leben in vollen Zügen genießen. Bevor ich dem T-Keller für das schlecht gezapfteste Bier danke, und Udo strafe, dass er den KAZ-Keller zugemacht hat und somit mich meines Wohnzimmers beraubte, gehe ich über zu der Zeit vor der Chemie, die mich sehr geprägt hat.

Ich denke gern an die Zeit in Israel zurück. Tova, hoffentlich habe ich mir ein Stück von deiner Großherzigkeit abschneiden können. Allen Ex-Volontären danke ich für unvergessene Stunden sowohl in Israel als auch in Deutschland auf den diversen Treffen. Dem größten Chaot, aber ein Mann von dem ich viel lernen durfte gebührt mein Dank. Vielen Dank für die schöne Zeit in Göttingen, Meikel. Esther wir brauchen wieder einen Trip quer durch Deutschland, um wieder auf den neusten Stand zu kommen.

Meinen Freundinnen aus alten Zeiten: Rahel, Kristine, Juliane, Lilja und Dorthe super dass es euch gibt und ihr immer wieder an meinem Leben teilhabt.

Mein ganz besonderer Dank, gilt meiner Familie: meinen Eltern, meinen Geschwistern Susi, Karoline und Goetz, meinen Angeschwägerten Stefan, Horst und Luise, allen Nichten und Neffen Laura, Jaira, Jonathan, Amelie, Jakob, Greta, Clemens, Finn und Joel gut dass ihr so gar nichts von Chemie versteht, ich bei euch immer willkommen bin und so am besten den Stress vergessen konnte.

Mein größter Dank gilt Thorsten, der mich sturköpfigen Menschen so angenommen hat wie ich bin und mein Leben jeden Tag von neuem bereichert mit seinem ganz besonderen Wesen.

Knutsch



## LEBENS LAUF

Am 7. Mai 1977 wurde ich als viertes Kind von Barbara Hoffmann, geborene Raab, und Gerhard Hoffmann in Berlin-Wilmersdorf geboren.

Von August 1983 bis Juni 1987 besuchte ich die Cäcilien-Grundschule in Berlin-Wilmersdorf und wechselte im August 1987 auf das Evangelische Gymnasium „Zum Grauen Kloster“ in Berlin-Grunewald, das ich im Juni 1996 mit der Allgemeinen Hochschulreife verließ. Von September 1996 bis September 1997 arbeitete ich als Volontärin während eines Freiwilligen Sozialen Jahres in Hadera (Israel) bei Akim-Hadera zur Betreuung geistig und körperlich behinderter Menschen.

Zum Sommersemester 1998 nahm ich das Studium der Chemie an der Georg-August-Universität Göttingen auf und legte im April 2000 die Diplom-Vorprüfung ab. In der Zeit von Dezember 2001 bis September 2002 fertigte im Arbeitskreis Prof. Dr. A. Zeeck/Dr. S. Grond meine Diplomarbeit mit dem Titel „*Isolierung und Biosynthese eines Furanylramnosids und eines  $\gamma$ -Butyrolactons aus Streptomyces sp. sowie Chemisches Screening an ausgewählten Stämmen*“ an und bestand im November 2002 die Diplom-Chemiker-Hauptprüfung.

Seit März 2003 arbeite ich unter Anleitung von Dr. S. Grond und Prof. Dr. A. Zeeck an der vorliegenden Dissertation.





