

**Untersuchung von Schlüsselenzymen der Ambruticin-Biosynthese und deren
Nutzbarkeit für die chemoenzymatische Synthese**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Gesche Berkhan, M. Sc.

geboren am 30.12.1988 in Neustadt a. Rbge

2016

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Mai 2013 bis Juli 2016 unter der Anleitung von Prof. Dr. Frank Hahn am Institut für Organische Chemie und am Biomolekularen Wirkstoffzentrum der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover angefertigt.

Referent: Prof. Dr. Frank Hahn

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Kirschning

Tag der Promotion: 21.10.2016

Zusammenfassung

M. Sc. Gesche Berkhan

Untersuchung von Schlüsselenzymen der Ambruticin-Biosynthese und deren Nutzbarkeit für die chemoenzymatische Synthese

Schlagwörter: Ambruticin, Biosynthese, Dehydratasen, Pyransynthesen, Enoylisomerasen

Ambruticine sind polyketidische Naturstoffe die vom Myxobakterium *Sorangium cellulosum* (So ce10) produziert werden. Sie weisen für Polyketide vom Typ I ungewöhnliche Struktur motive auf, wie beispielsweise einen Tetrahydropyranring (THP) im Ambruticin-Ostfragment, welcher mit einer 1,4-Dienyl-Seitenkette verknüpft ist. Strukturell sind sie eng verwandt mit den Jerangoliden und beide Naturstoffe sind aufgrund ihrer hohen antifungalen Aktivität potentiell interessant für die Entwicklung neuer Leitstrukturen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Aufklärung der biosynthetischen Bildung des Ambruticin-Ostfragments. Für die *in vitro* Charakterisierung der beteiligten Dehydratase-Domänen AmbDH3 und AmbDH4 und der C-Methyltransferase AmbM wurden diese heterolog in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und mit synthetisch hergestellten Substraten umgesetzt. Durch massenspektrometrische und NMR-spektroskopische Analyse konnte gezeigt werden, dass AmbDH3 ein bifunktionales Enzym ist und neben der α,β -Dehydratisierung auch die nachfolgende stereoselektive THP-Bildung katalysiert. Die anschließende Verschiebung der Doppelbindung erfolgt unabhängig von der THP-Ringbildung katalysiert durch das Zusammenspiel von AmbDH4 und AmbM. AmbDH4 ist ebenfalls ein multifunktionales Enzym und katalysiert zusätzlich zur α,β -Dehydratisierung eine Epimerisierung und die Doppelbindungsverschiebung von der thermodynamisch günstigen α,β - in die thermodynamisch weniger begünstigte β,γ -Position. AmbM katalysiert ausschließlich die α -Methylierung des β,γ -ungesättigten Intermediates und führt zur Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten des α -verzweigten β,γ -ungesättigten Produkts. Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Etablierung von AmbDH3 als chemoenzymatisches Werkzeug für die Synthese von Naturstofffragmenten. Die enzymatisch katalysierte Reaktion konnte erfolgreich im präparativen Maßstab (250 mg) durchgeführt werden und die Untersuchung des Substratspektrums mit nicht-natürlichen Vorläufern zeigte eine vielversprechende Substrattoleranz. So kann beispielsweise die Domäne auch zur Bildung von Tetrahydrofuranringen verwendet werden.

Abstract

M. Sc. Gesche Berkhan

Studies of key enzymes of the Ambruticin biosynthesis and their applicability for chemoenzymatic synthesis

Key words: ambruticin, biosynthesis, dehydratase, pyran synthase, enoyl-isomerase

Ambruticins are polyketide type I natural products produced by the myxobacterium *Sorangium cellulosum* (So ce10). They have unusual structural motifs such as the tetrahydropyran (THP) ring which is connected to an 1,4-dienyl side chain in the eastern part. The ambruticins are structurally related to the jerangolids and both show high antifungal activity. Therefore they are interesting for the development of new lead structures.

This work focuses on the elucidation of the biosynthetic formation of the ambruticin eastern fragment. For *in vitro* studies the involved dehydratase domains AmbDH3 and AmbDH4 and the C-methyltransferase AmbM were heterologously expressed in *E. coli* BL21(DE3) and investigated with synthetically derived substrate surrogates. Analysis by HPLC-MS and NMR spectroscopy showed that AmbDH3 is a dual catalytic enzyme effecting first a α,β -dehydration followed by a stereoselective THP formation. The following isomerization of the double bond occurs independent from the THP formation and is catalyzed by the interaction of AmbDH4 and AmbM. AmbDH4 is a multicatalytic enzyme catalyzing not only the α,β -dehydration, but also an epimerization and the double bond isomerization from the thermodynamic favored α,β - towards the less favored β,γ -position. Finally AmbM catalyzes exclusively the α -methylation of the β,γ -unsaturated intermediate and shifts the equilibrium towards the α -branched β,γ -unsaturated product.

The second part of this work is directed towards the establishment of AmbDH3 as a chemoenzymatic tool for the synthesis of natural product fragments. The upscaling of the enzymatic reaction on a preparative scale (250 mg) was successfully achieved and investigation of the substrate scope of AmbDH3 showed a promising broad substrate tolerance. For instance AmbDH3 catalyzes the stereoselective tetrahydrofuran ring formation.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Polyketidsynthasen.....	2
1.2 Ambruticine	5
1.3 Dehydratasen.....	8
1.4 Pyransynthasen	12
1.5 Enoylisomerasen.....	16
1.6 Epimerasen	20
1.7 SAM-abhängige Methyltransferasen.....	23
1.8 Biokatalyse.....	24
2 Zielsetzung.....	29
3 Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse	31
3.1 Studien zur biosynthetischen Rolle der Dehydratase-Domäne AmbDH3	31
3.1.1 Synthetische Arbeit.....	32
3.1.2 Molekularbiologische und enzymologische Arbeiten zur Darstellung der Punktmutante AmbDH3_H51A.....	44
3.1.3 Enzymaktivitätstests	46
3.2 Studien zur biosynthetischen Rolle der Dehydratase-Domäne AmbDH4 und der C- Methyltransferase AmbM	58
3.2.1 Synthetische Arbeiten.....	60
3.2.2 Molekularbiologische und enzymologische Arbeiten.....	72
3.2.3 Enzymaktivitätstests	79
3.3 Etablierung der Dehydratase-Domäne AmbDH3 als chemoenzymatisches Werkzeug .	94
3.3.1 Untersuchung des Substratspektrums von AmbDH3 – Synthetische Arbeiten	94
3.3.2 Untersuchung des Substratspektrums von AmbDH3 – Enzymaktivitätstests	99
3.3.3 Optimierung der AmbDH3-Reaktionsbedingungen für Umsetzungen im präparativen Maßstab	109
4 Zusammenfassung und Ausblick	115
4.1 Aufklärung der biosynthetischen Bildung des Ambruticin-Ostfragments	115
4.1.1 Studien zur biosynthetischen Rolle der Dehydratase-Domäne AmbDH3	115
4.1.2 Studien zur biosynthetischen Rolle der multifunktionalen Dehydratase-Domäne AmbDH4 und zur C-Methyltransferase AmbM.....	117
4.2 Etablierung der Dehydratase-Domäne AmbDH3 als chemoenzymatisches Werkzeug	119

5 Experimenteller Teil	121
5.1 Biologische Arbeiten - Material	121
5.1.1 Organismen	121
5.1.2 Desoxyribonukleinsäuren	121
5.1.3 Medien, Nährböden, Puffer und Lösungen	122
5.1.4 Geräte	125
5.2 Biologische Methoden	127
5.2.1 Kultivierungsmethoden	127
5.2.2 Molekularbiologische Methoden	127
5.2.3 Proteingewinnung	133
5.2.4 Enzymaktivitätstest	135
5.3 Chemische Arbeiten	138
5.3.1 Auxiliare, Hilfsreagenzien und allgemeine Synthesvorschriften	140
5.3.2 Verbindungen für die <i>in vitro</i> Untersuchung von AmbDH3	151
5.3.3 Verbindungen für die <i>in vitro</i> Untersuchung von AmbDH4	178
5.3.4 Verbindungen zur Untersuchung der Substrattoleranz von AmbDH3	193
6 Literaturverzeichnis	220
7 Anhang	226
7.1 Spektrenanhang	226
7.2 Studien zur biosynthetischen Rolle der Dehydratase-Domäne AmbDH3	318
7.3 Studien zur biosynthetischen Rolle der multifunktionalen Dehydratase-Domäne AmbDH4 und der C-Methyltransferase AmbM	330
7.4 Etablierung der Dehydratase-Domäne AmbDH3 als chemoenzymatisches Werkzeug	341
7.5 Synthetische Gene	348

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
A	<i>Absorbance</i> (Extinktion)
ACP	<i>Acyl carrier protein</i>
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Äq.	Äquivalente
AT	Acytransferase
ATP	Adenosintriphosphat
Au	<i>Arbitrary unit</i> (willkürliche Einheit)
bp	<i>Base pair</i> (Basenpaare)
BSA	Bovine serum albumin
Bu	Butyl
°C	Grad Celsius
Carb	Carbenicillin
CD	Circulardichroismus
CoA	Coenzym A
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
d	Tag(e)
Da	Dalton
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DH	Dehydratase
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMP	DESS-MARTIN-Periodinan
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dr	<i>diastereomeric ratio</i> (Diastereomerenverhältnis)
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EI	Enoylisomerase
EIX	<i>Equilibrium ion exchange</i>
ER	Enoylreduktase
ESI	<i>Electrospray ionisation</i> (Elektrospray-Ionisation)
Et	Ethyl
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EtOAc	Essigsäureethylester

FA	Fettsäurebiosynthese
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
GDH	Glukosedehydrogenase
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HSNAC	<i>N</i> -Acetylcysteamin
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarotspektroskopie
<i>J</i>	Kopplungskonstante
Kan	Kanamycin
KHMDS	Kaliumhexamethyldisilazid
KR	Ketoreduktase
KS	Ketosynthese
LC	<i>Liquid chromatography</i> (Flüssigkeitschromatographie)
m	Masse
mM	millimolar
M	molare Masse oder Marker
Me	Methyl
MS	Massenspektrometrie
MT	Methyltransferase
MUFA	<i>Monounsaturated fatty acid</i> (einfach ungesättigte Fettsäure)
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMO	<i>N</i> -Methylmorpholin- <i>N</i> -oxid
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i> (Kernspinresonanzspektroskopie)
NOE	<i>Nuclear overhauser effect</i> (Kern-Overhauser-Effekt)
NRP	Nicht-ribosomales Peptid
NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthase
NTA	<i>Nitriloacetic acid</i> (Nitrilotriessigsäure)
Nu	Nukleophil
OD	Optische Dichte
<i>p</i>	para
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Petrolether

Ph	Phenyl
PK	Polyketid
PKS	Polyketidsynthase
ppm	<i>parts per million</i>
PP _i	Pyrophosphat
PPTS	Pyridinium- <i>para</i> -toluolsulfonat
PS	Pyransynthase
Pr	Propyl
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acid</i> (mehrfach ungesättigte Fettsäure)
R _f	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SAH	S-Adenosyl-L-homocystein
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
T	Temperatur
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TE	Thioesterasedomäne
TEA	Triethylamin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylen-diamin
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
TMS	Trimethylsilyl
TOF	<i>Time of flight</i> (Flugzeit)
TPAP	Tetrapropylammoniumperruthenat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Ts	Tosylat
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i> (Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
ÜZ	Übergangszustand
VCD	<i>Vibrational circular dichroism</i>

Vorbemerkung

In Anlehnung an die Arbeiten von KITSCHKE und KALESSE¹ wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit für die Benennung der absoluten Konfiguration von Stereozentren in linearen Polyketidsynthese-Intermediaten einer der FISCHER-Nomenklatur analoge Kategorisierung nach D und L angewandt. Da diese sich an der räumlichen Stellung der Substituenten bezüglich des Polyketidrückgrats orientiert, ist sie, anders als die (R)-/(S)-Nomenklatur nach CAHN-INGOLD-PRELOG-Konvention, sehr gut geeignet um die Kategorisierung der prozessierenden Polyketidsynthese-Domänen nach mechanistischen Gesichtspunkten abzubilden.

1 Einleitung

Polyketide sind Sekundärmetabolite von hoher Komplexität und großer struktureller Vielfalt. Bedingt durch die große Diversität sind heutzutage zahlreiche Polyketide mit pharmakologischer Bedeutung bekannt. Sie finden beispielsweise als Antibiotika, Antimykotika, Zytostatika oder Immunsuppressiva Anwendung.²

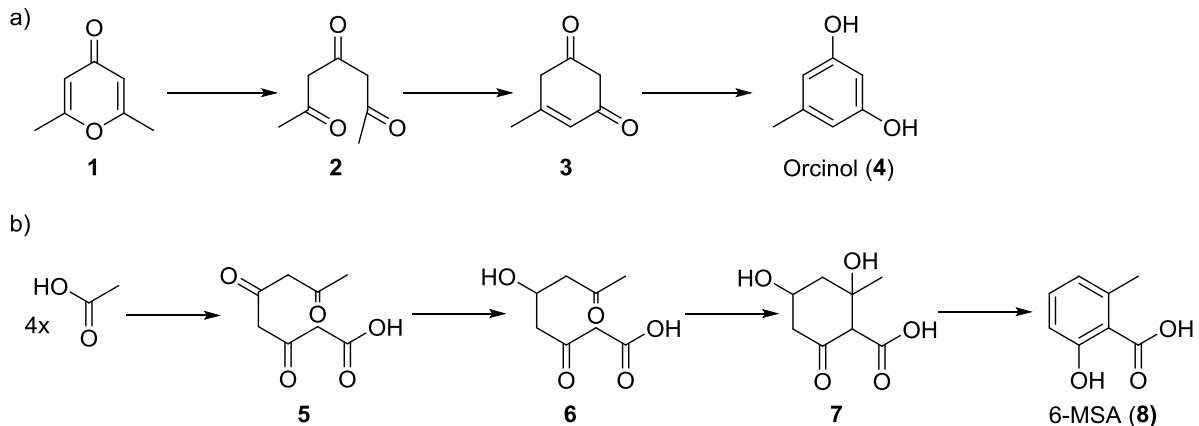


Abbildung 1: a) Von COLLIE postulierte Biosynthese von Orcinol (**4**).³ b) Von BIRCH postulierte Biosynthese von 6-Methylsalicylsäure (6-MSA, **8**). Bei 6-MSA handelt es sich um eine Vorstufe des Toxins Patulin.^{2,4}

Die Polyketidforschung geht zurück bis in das späte 19. Jahrhundert. Durch Degradationsexperimente von 2,6-Dimethyl- γ -pyron in kochendem Bariumhydroxid konnte JAMES COLLIE 1893 erstmals Orcinol (**4**) nachweisen.⁵ 1907 veröffentlichte COLLIE das erste Postulat des Orcinol-Biosynthesewegs. Dieses basiert auf der Theorie, dass die Biosynthese von Orcinol (**4**) in lebenden Organismen ausgehend von 2,6-Dimethyl- γ -pyron (**1**) über ein Triketon-Intermediat (**2**) verläuft (Abbildung 1a).³ Den Pionierarbeiten von COLLIE folgten weitere Biosynthesepostulate Anfang des 20. Jahrhunderts. ARTHUR BIRCH konnte 1950 durch Fütterungsexperimente mit isotonenmarkierten ¹⁴C-Acetat-Einheiten in Kombination mit Degradationsexperimenten am Beispiel der 6-Methylsalicylsäure-Biosynthese nachweisen, dass Polyketone durch sich wiederholende Kondensationsreaktionen ausgehend von Acetatbausteinen aufgebaut werden (Abbildung 1b). Dieses Prinzip wurde als COLLIE-BIRCH-Hypothese bekannt.⁴

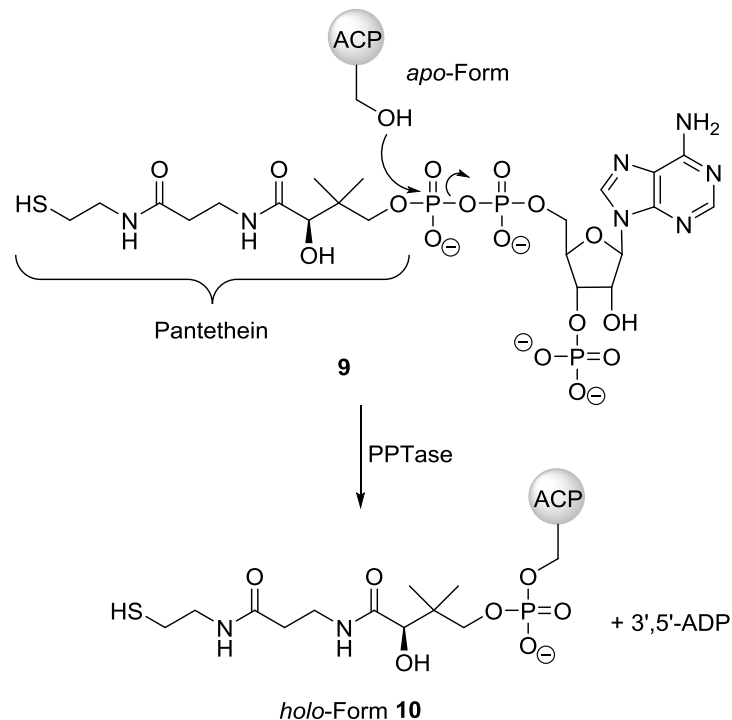
In den letzten Jahrzehnten lag der Fokus der Polyketidforschung im Besonderen auf dem detaillierten Verständnis der ablaufenden Prozesse in Biosynthesewegen sowie deren Manipulation. Durch die Entwicklung von molekularbiologischen Methoden, beispielsweise der kombinatorischen Biosynthese, kann heutzutage gezielt in die Biosynthese eingegriffen werden, wodurch verschiedene Derivate des ursprünglichen Sekundärmetabolits zugänglich sind.^{6,7} Eine weitere Strategie zur Gewinnung von Naturstoffderivaten bietet die

Mutasynthese. Hierzu werden Blockmutanten eines Naturstoffproduzenten verwendet, in dem die Startbausteinsynthese ausgeschaltet wurde. Werden zu diesen synthetisch gewonnene Startbausteine, sogenannte Mutasyntone, supplementiert, sind verschiedene Naturstoffderivate zugänglich und es können funktionelle Gruppen für nachfolgende synthetische Modifikationen eingeführt werden. In der Chemoenzymatik werden heterolog produzierte Enzyme als hochstereoselektive Katalysatoren im synthetischen Kontext eingesetzt. Deren Anwendung ist besonders attraktiv in späten Schritten von Synthesewegen.⁸

Einen alternativen Ansatz zur Gewinnung neuer Polyketid- und Peptidnaturstoffe bieten metagenomische Ansätze. Durch die Sequenzierung mikrobieller Genome konnten viele „kryptische“ oder „stille“ Gencluster identifiziert werden, die ein hohes Potential für die Produktion neuer, strukturell komplexer Naturstoffe aufweisen.⁹

1.1 Polyketidsynthesen

Bei Polyketidsynthesen handelt es sich um eine große Familie von multifunktionalen Enzymen, die die Bildung von diversen, pharmakologisch interessanten Naturstoffen katalysieren.¹⁰ Einfache organische Vorläufer, wie z. B. Malonsäurehalbthioester, können von Polyketidsynthesen zu einem linearen, funktionalisierten Oligomer verknüpft und bei Bedarf nachträglich modifiziert werden. Dadurch resultiert eine Vielzahl an komplexen Polyketiden.¹¹ Polyketidsynthesen sind evolutionär und biosynthetisch eng verwandt mit Fettsäurensynthesen (FAS).¹⁰ Bakterielle Polyketidsynthesen lassen sich in drei Klassen (Typ I, II und III) unterteilen. Typ I Polyketidsynthesen sind multimodulare Megasyntasen, in denen sowohl die Acyl-Trägerproteine (ACP, engl. *Acyl carrier protein*) als auch die katalytisch aktiven Proteine einmalig agieren. Bei Typ II Polyketidsynthesen zur Bildung von überwiegend aromatischen Polyketiden handelt es sich ebenfalls um ACP-beihaltende, monomodulare Synthesen, deren Domänen iterativ arbeiten. Typ III Polyketidsynthesen bilden ebenfalls aromatische Polyketide, sind allerdings ACP-frei und verwenden stattdessen Coenzym A (CoA) als Trägermolekül für Malonatbausteine.¹¹ Die Ambruticine gehören zur Klasse der Typ I-PKS-Produkte, weshalb im Rahmen dieser Arbeit nur diese genauer betrachtet wird.



Schema 1: Posttranslationale Modifikation der ACP von der inaktiven *apo*- in die aktive *holo*-Form (10).¹²

Die klassischen Typ I Polyketidsynthasen sind in einzelne Module aufgeteilt, wobei jedes Modul wiederum in unterschiedlichen Domänen organisiert ist. Sie folgen für gewöhnlich der Kolinearitätsregel (auch als *Celmer's rule* bekannt), bei der aufgrund der genetischen Information direkt auf die Konnektivität, den Funktionalisierungsgrad sowie die Stereochemie des Naturstoffes geschlossen werden kann.^{13,14}

In jedem Modul ist ein *Acyl-Carrier-Protein* (ACP), eine Ketosynthase (KS)- und Acyltransferase (AT)-Domäne vorhanden. *Carrier*-Proteine, wie die ACP-Domäne, finden sich in der FAS, PKS und Nicht-ribosomalen Peptidsynthase (NRPS) und müssen immer zunächst durch eine *post*-translationale Modifikation in die aktive Form überführt werden. Die Überführung der inaktiven *apo*-Form in die aktive *holo*-Form erfolgt durch einen nukleophilen Angriff der Serin-Seitenkette des ACP am Coenzym A (9) (Phosphopantethein-Donor, Schema 1), katalysiert durch eine Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase) wie beispielsweise dem Sfp-Enzym aus *Bacillus subtilis* mit breitem Anwendungsspektrum.^{11,12}

Das freie Thiol der prosthetischen Phosphopantetheingruppe der aktiven *holo*-Form der ACP kann nukleophil Substrate angreifen und durch die dabei gebildete Thioesterbindung kovalent Substrate binden.¹⁵

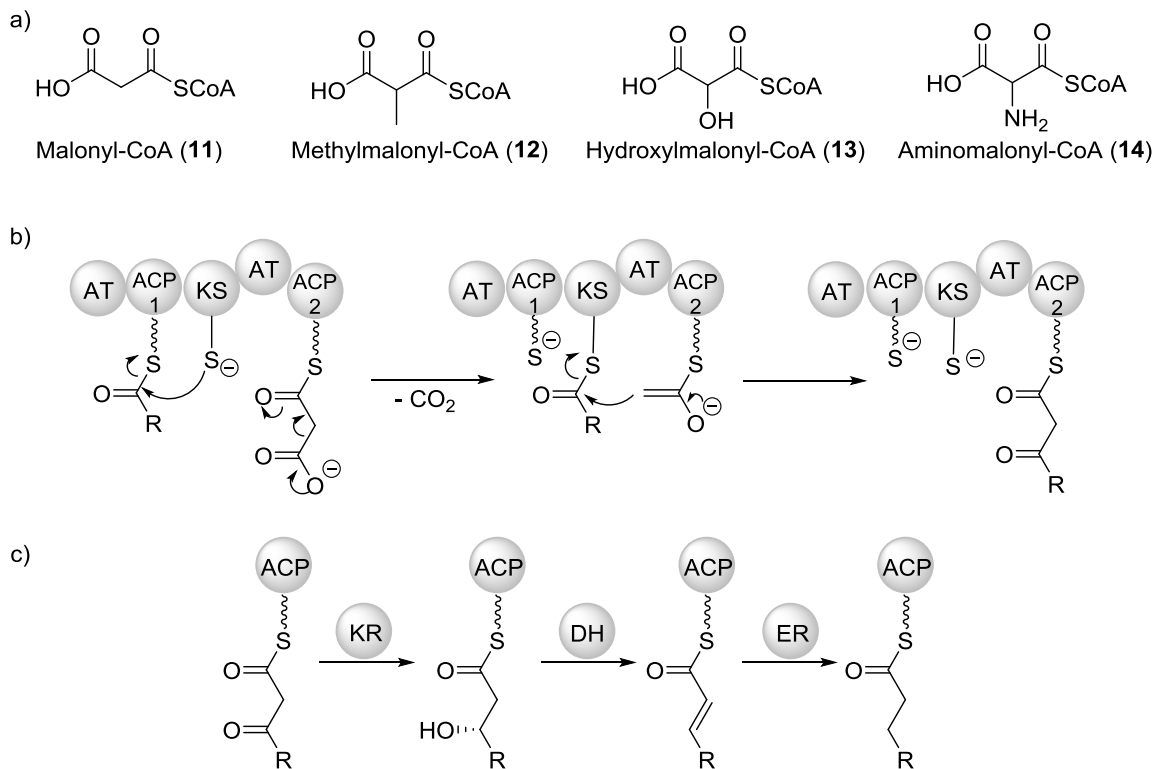


Abbildung 2: a) Auswahl an Elongationsbausteinen. b) Ablauf der Elongation des Polyketidrückgrats. Die neue C-C-Bindung wird durch eine Thio-CLAISEN-Kondensation geknüpft. c) Reduktive Schleife. Durch das Zusammenspiel der KR-, DH- und ER-Domäne wird die β -Ketoverbindung vollständig reduziert.¹⁶

Die APC-Domäne des Vorläufermoduls (ACP-1) trägt die zuvor gebildete Polyketidkette. Diese wird durch Autoacylierung auf die KS-Domäne übertragen, welche für die Ausbildung neuer C-C-Bindungen verantwortlich ist. Durch die nachfolgende spezifische AT-Domäne wird ein Verlängerungsbaustein ausgesucht. Nach Übertragung des Verlängerungsbausteins auf die ACP-2 initiiert die KS-Domäne durch eine Decarboxylierung die Thio-CLAISEN-Kondensation, wodurch es zur Verlängerung des Polyketidrückgrats kommt. Die erhaltene verlängerte Polyketidkette ist kovalent an das ACP-2 gebunden (Abbildung 2b). Als Verlängerungseinheiten können Primärmetabolite wie Malonyl-CoA (**11**) oder Sekundärmetabolite wie beispielsweise Methylmalonyl- (**12**), Hydroxymalonyl- (**13**) oder Aminomalonyl-CoA (**14**) verwendet werden (Abbildung 2a). Das wachsende Polyketidrückgrat kann durch die sogenannte reduktive Schleife, optional bestehend aus der Ketoreduktase (KR)-, Dehydratase (DH)- und Enoylreduktase (ER)-Domäne, funktionalisiert werden. Die KR-Domäne reduziert stereoselektiv β -Ketothioester zu β -Hydroxythioestern, welche anschließend von der DH-Domäne durch eine formale *syn*-Eliminierung von Wasser zu den α,β -ungesättigten Thioestern umgesetzt werden können. Die Reduktion zum an der α - und β -Position vollständig gesättigten Thioester erfolgt durch die ER-Domäne (Abbildung

2c). Nach abgeschlossener Verlängerung wird die Polyketidkette durch eine Thioesterase (TE)-Domäne mittels Hydrolyse oder Makrozyklisierung von dem ACP abgespalten. Dabei kommt es zur Bildung von freien Säuren oder Makrozyklen. Weitere Modifizierungen des Polyketidgrundgerüsts wie Acylierung, Halogenierung und Glykosylierung können nachfolgend durch sogenannte *Tailoring*-Enzyme erfolgen.¹⁷

Neben der klassischen modularen Typ I-Polyketidsynthase (z. B. Desoxyerythronolid B (DEBS)-Synthase) sind auch iterativ arbeitende Enzyme, wie z. B. die fungale Polyketidsynthase oder die humane Fettsäurebiosynthase, bekannt.^{18,19}

Weiterhin wird zwischen *cis*- und *trans*-AT-PKS unterschieden. Die *trans*-AT-PKS beinhaltet diskrete, iterativ arbeitende AT-Domänen, die in der Regel jedes PKS-Modul mit der gleichen Verlängerungseinheit beladen, wie beispielsweise in der Bacillaen-, der Rhizoxin-, der Corallopyronin A – oder der Pederin-Biosynthese.^{10,20,21,22,23,24}

Bei der NRPS handelt es sich ebenfalls um multimodulare Enzymkomplexe in denen die einzelnen Module in unterschiedliche Domänen organisiert sind. Die Adenylierungs (A)-, die Thiolierungs (T)- und die Kondensations (C)-Domäne bilden zusammen das minimale Elongationsmodul. Zusätzliche optionale Modifikationen können beispielsweise durch Epimerase (E)- oder Methyltransferase (MT)-Domänen erfolgen, wobei letztere in die A-Domäne integriert sein können. In der NRPS werden als Verlängerungsbausteine proteinogene und nicht-proteinogene Aminosäuren verwendet, welche entweder direkt aus dem Primärmetabolismus stammen oder durch Modifikation ersterer erhalten werden. Die entsprechenden modifizierenden Enzyme sind meist im Gencluster der jeweiligen Verbindung codiert.^{16,25}

1.2 Ambruticine

Die Ambruticine gehören zur Klasse der reduzierten Polyketid-Naturstoffe und tragen mehrere ungewöhnliche Struktur motive, die nicht durch die Standarddomänen von PKS gebildet werden. Sie unterscheiden sich durch das Substitutionsmuster an C-5 und C-1 (Abbildung 3a).

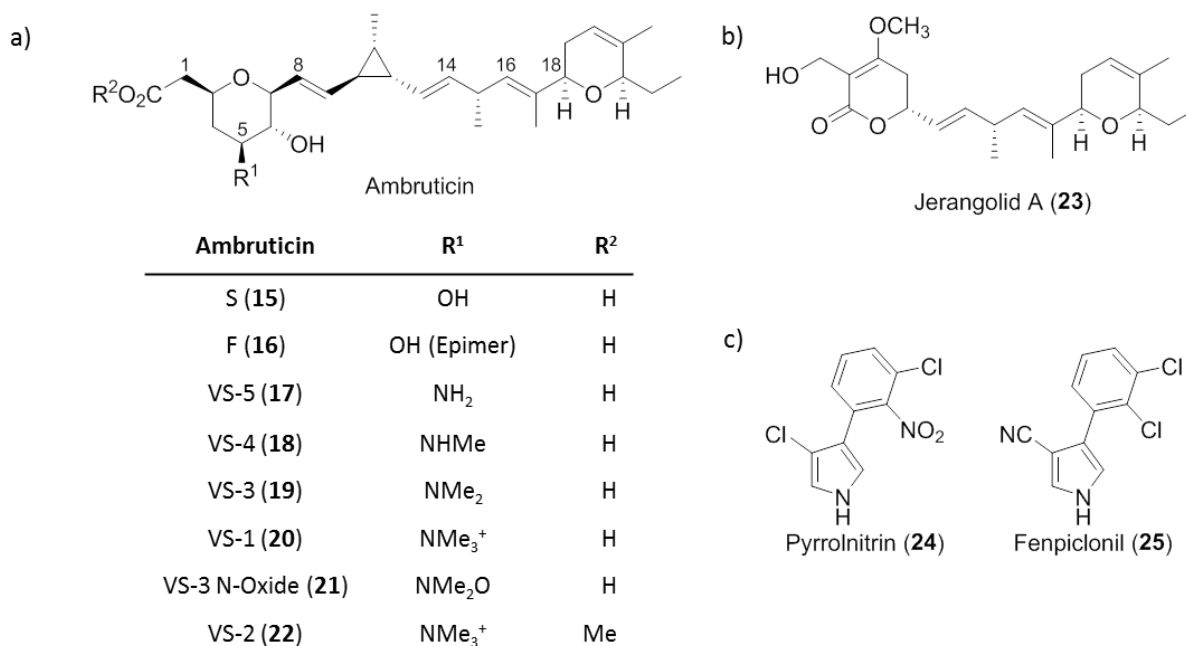


Abbildung 3: a) Allgemeine Struktur der Ambruticine, welche sich durch den Substituenten an C-5 und C-1 unterscheiden. Die Ambruticine können als freie Säure oder als Methylester vorliegen. b) Struktur von Jerangolid A (**23**). c) Struktur der antifungalen Phenylpyrrole Pyrrolnitrin (**24**) und Fenpiclonil (**25**).

Die Isolierung der ersten Ambruticine (S und F) aus dem Myxobakterium *Polyangium cellulorum* var. *fulvum* (heutige Bezeichnung: *Sorangium cellulorum* So ce10) in Kombination mit der Strukturaufklärung anhand von Einkristall-Röntgenstrukturanalyse und chemischer Derivatisierung erfolgte in den Laboren von WARNER-LAMBERT/PARKE-DAVIS.^{26,27} Durch Degradationsexperimente und partielle Synthese konnte einige Jahre später die absolute Stereochemie von Ambruticin S (**15**) aufgeklärt werden.^{28,29} HÖFLE *et al.* gelang 1991 die Isolierung und Strukturaufklärung der Ambruticin VS-Serie (**17-22**), bestehend aus sechs Derivaten, die ebenfalls aus dem genannten Myxobakterium stammen.³⁰ Die Ambruticine sind strukturell eng verwandt mit den Jerangoliden (Abbildung 3b), welche aus dem myxobakteriellen Stamm *Sorangium cellulorum* So ce307 isoliert wurden.³¹ Beide Naturstoffe weisen eine hohe Aktivität gegen ein breites Spektrum von pathogenen Pilzen auf und stellen somit eine interessante Leitstruktur zur Entwicklung neuer Antimykotika dar.²⁶ Es wird angenommen, dass die Ambruticine mit dem HOG (engl. *high osmolarity glycerol*) Signalweg interferieren, ähnlich wie die Vertreter der Phenylpyrrol-Klasse (z. B. Pyrrolnitrin (**24**) oder Fenpiclonil (**25**)) (Abbildung 3c), und zur Anreicherung von Glycerol und freien Fettsäuren in der Zelle führen. Bei geringer externer Osmolarität verursacht die Akkumulation eine erhöhte Membranpermeabilität, wodurch das Zellvolumen sinkt und der Zelltod resultiert.³²

REEVES *et al.* veröffentlichten 2006 basierend auf Genclusteranalysen, Gendeletions- und Fütterungsexperimenten mit ^{13}C -Acetat- und Propionateinheiten, einen hypothetischen Ambruticin-Biosyntheseweg.^{31,33}

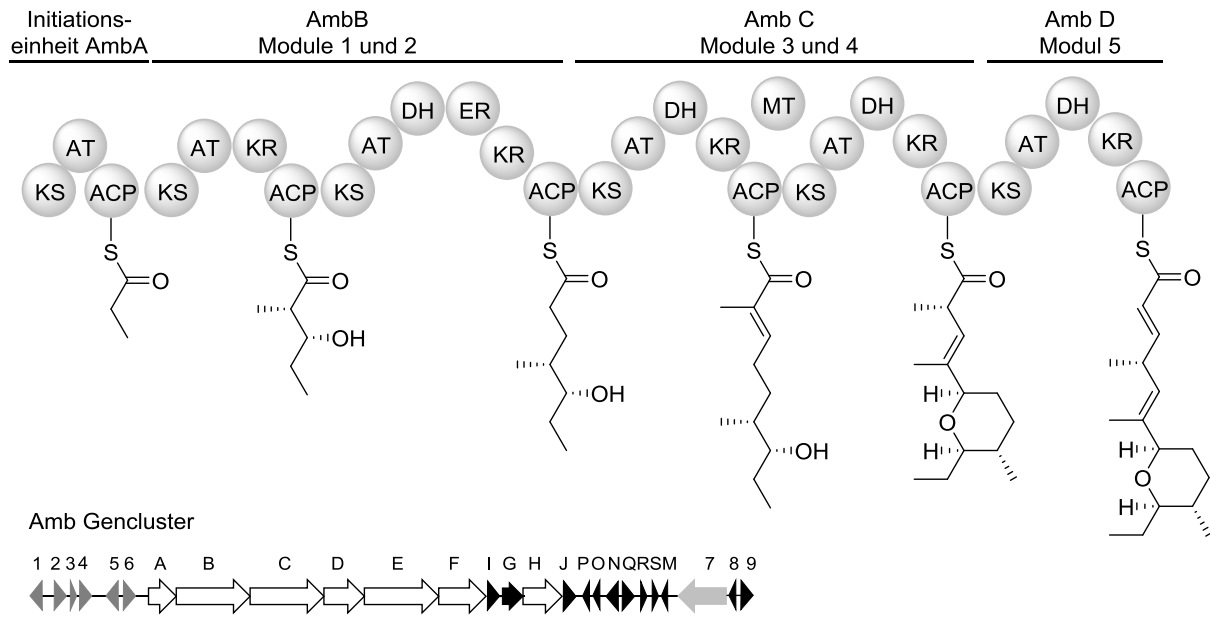
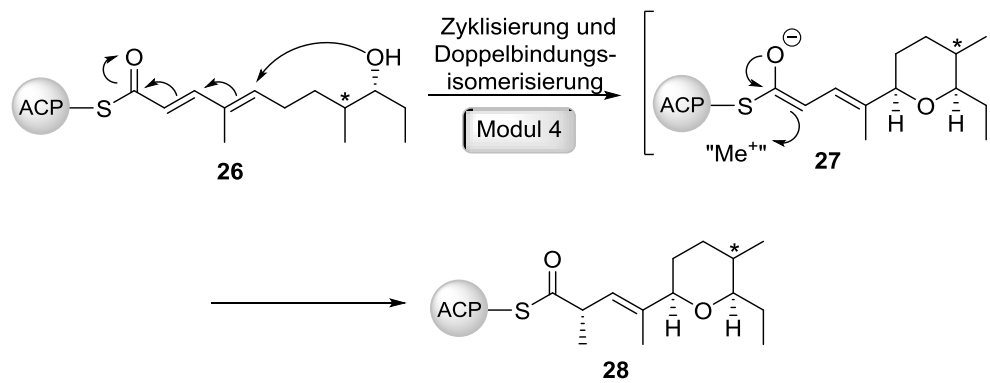


Abbildung 4: Ausschnitt aus dem von REEVES *et al.* postulierten Ambruticin-Biosyntheseweg zur Bildung des Ambruticin-Ostfragments und Organisation des Ambruticin-Genclusters.³¹

In Abbildung 4 ist ein Ausschnitt aus dem postulierten Biosyntheseweg dargestellt. Als Startbaustein für die Typ I Polyketid-Biosynthese wird Propionyl-CoA verwendet. Die Elongation des Polyketidrückgrats erfolgt bis zum Modul 5 mit drei Malonyl- (Modul 2, 4 und 5) und zwei Methylmalonyl-CoA-Einheiten (Modul 1 und 3). Im hypothetischen Biosyntheseweg folgen die Module 1 bis 4 den klassischen Polyketidbiosyntheseregeln.

Die AT4-Domäne zeigt charakteristische Sequenzmotive für die Elongation mit Malonyl-CoA. Daraus resultiert, dass die Methylgruppe in Modul 4 durch eine zusätzliche Methyltransferase eingeführt werden muss. Durch Gendeletionsexperimente der Methyltransferase (MT) AmbM konnte gezeigt werden, dass diese für die Methylierung der α -Position in Modul 4 verantwortlich ist.



Schema 2: Postulierter Mechanismus der konzertierten THP-Bildung und Doppelbindungsverschiebung nach REEVES *et al.* basierend auf Genclusteranalysen.³¹ Bei den mit Sternen markierten Positionen handelt es sich um Zentren unbekannter Konfiguration.

Für die Bildung des Tetrahydropyranrings (THP) und die Verschiebung der Doppelbindung zum Aufbau des 1,4-Diens im Ostfragment postulierten REEVES *et al.* einen konzertierten Mechanismus beginnend mit einer vinylogenen Oxa-MICHAEL-Addition. Als Zwischenstufe der Zyklisierung und Doppelbindungsisomerisierung kommt es zur Bildung des vinylogenen Enolats **27**, welches entweder durch eine Methylgruppe oder zunächst intermediär ein Proton abgefangen werden könnte (Schema 2). Die postketidische Modifizierung durch die *Tailoring*-Enzyme AmbP und AmbO führt zur Bildung des Dihydropyranrings der sich in der finalen Ambruticin-Struktur findet.³¹

1.3 Dehydratasen

Eine Großzahl an nicht aromatischen Polyketiden weisen mehrfach substituierte (*E*)- oder (*Z*)-konfigurierte Doppelbindungen auf. Zumindest von (*E*)-konfigurierten Doppelbindungen ist bekannt, dass sie durch DH-Domänen, ausgehend von den korrespondierenden β -Hydroxyverbindungen, durch Dehydratisierungsreaktionen während der PKS-Prozessierung etabliert werden. In den letzten Jahren wurden vermehrt *in vitro* Untersuchungen zu einzelnen DH-Domänen unternommen, um ein besseres Verständnis über die Substratspezifität und Stereoselektivität der von diesen katalysierten Dehydratisierungen zu erlangen.

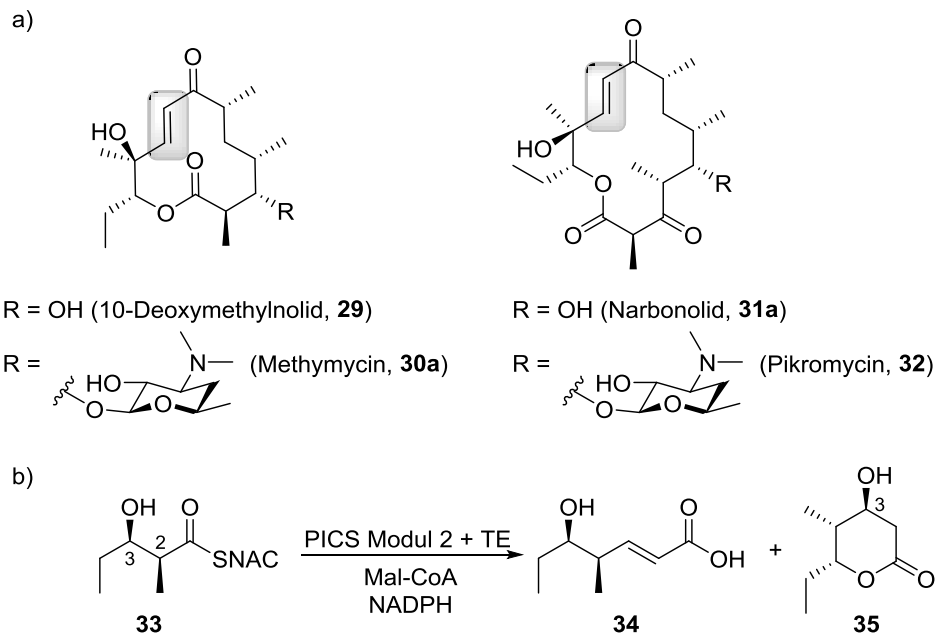


Abbildung 5: a) Strukturen der Makrolidantibiotika Methymycin (**30**) und Pikromycin (**32**). Durch die Pikromycin/Methymycin-Biosynthese werden zunächst die Aglycone 10-Deoxymethynolid (**29**) (Vorläufer von Methymycin) und Narbonolid (**31**) (Vorläufer von Pikromycin) erhalten. Diese werden anschließend durch *Tailoring*-Enzyme weiter prozessiert. Die in den *in vitro* Studien von CANE *et al.* betrachteten (*E*)-konfigurierten Doppelbindungen sind in grau hervorgehoben. b) Modelreaktion für die *in vitro* Untersuchung von Modul 2 Pikromycin/Methymycin-PKS.^{34,35}

Bei der Pikromycin/Methymycin-Synthase (PICS) handelt es sich um eine modulare Polyketidsynthase mit einer substrattoleranten TE-Domäne, die die Abspaltung sowohl zum 12-gliedrigen 10-Deoxymethynolid (**29**) als auch zum 14-gliedrigen Narbonolid (**31**) katalysiert. Die beiden Aglykonverbindungen werden durch *post*-PKS-Modifizierungen in die Makrolidantibiotika Methymycin (**30**) und Pikromycin (**32**) überführt (Abbildung 5a). CANE *et al.* führten bereits 2005 die ersten *in vitro* Studien mit dem heterolog produzierten Hybridfusionsprotein Modul2+TE und synthetisch gewonnenen Substraten zur Untersuchung der Stereoselektivität und Substratspezifität der DH-Domäne aus dem Modul 2 der PICS durch. Die fusionierte TE-Domäne ermöglicht eine direkte Abspaltung des erhaltenen Produkts von der PKS. Jedoch führte diese auch zu einer kinetischen Konkurrenzreaktion zwischen der DH- und TE-Domäne, wodurch nicht nur das zu erwartende α,β -ungesättigte Produkt **34** erhalten wurde, sondern auch das Lacton **35** (Abbildung 5b). Bei Inkubation der durch Punktmutation (H3611F) deaktivierten DH-Domäne konnte nur die stereoselektive Bildung des 3D-konfigurierten Lactons **35** beobachtet werden. Daraus resultiert zum einen, dass die KR-Domäne eine stereoselektive Reduktion der β -Ketoverbindung katalysiert und zum anderen, dass die DH-Domäne für die Etablierung der (*E*)-konfigurierten Doppelbindung verantwortlich ist. Die Struktur und die Stereochemie der erhaltenen Produkte konnte NMR

spektroskopisch aufgeklärt werden.³⁵ Anhand der durchgeführten *in vitro* Studien ist keine Aussage über eine bevorzugt katalysierte *syn*- oder *anti*-Eliminierung von Wasser möglich. Die Substratspezifität von PICS DH2 wurde in diesen Studien nicht untersucht.

Die PICS ist eng verwandt mit der 6-Deoxyerythronolid B Synthase (DEBS), die für die Synthese des Aglykonvorläufers (6-Deoxyerythronolid B) von Erythromycin A (**36**) verantwortlich ist (Abbildung 6a).^{36,37}

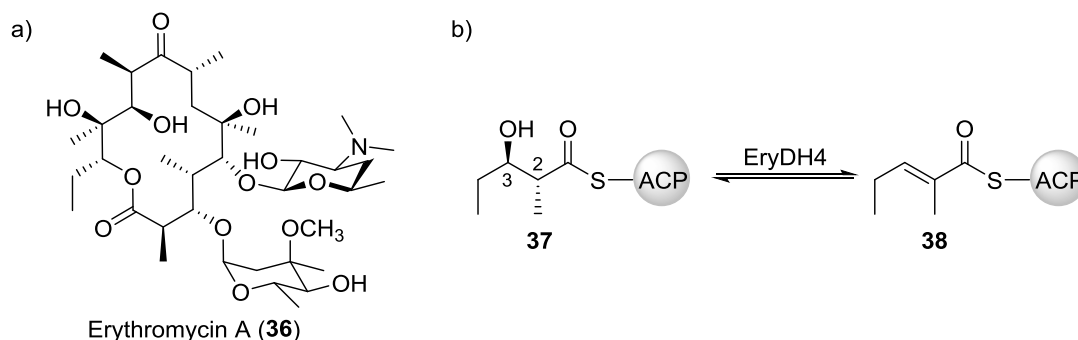


Abbildung 6: Struktur des Makrolidantibiotikums Erythromycin A (**36**). Über eine modulare PKS wird der Aglykonvorläufer 6-Deoxyerythronolid B gewonnen. Dieser wird durch *post*-PKS-Modifizierungen in **36** überführt. b) *In vitro* studierte Reaktion zur Untersuchung der Substratspezifität und Stereoselektivität von DEBS DH4.³⁸

In vitro Studien mit der heterolog produzierten DH-Domäne aus Modul 4 der DEBS (EryDH4) in Kombination mit chemoenzymatisch generierten ACP-gebundenen Substraten zeigten, dass EryDH4 eine hohe Substratspezifität aufweist. Durch die Kombination der KS-, AT- und ACP-Domäne aus Modul 6 der DEBS mit verschiedenen KR-Domänen aus dem Tylacton-, Rifamycin- und Erythromycin-Biosyntheseweg konnten, ausgehend von Propionyl-SNAC, die vier Diastereomere von **37** gewonnen werden.^{38,39,40,41} Die Verbindungen mit 2D,3L-, 2L,3D- und 2L,3L-Konfiguration wurden nicht von EryDH4 umgesetzt. Ausschließlich die 2D,3D-konfigurierte Verbindung **37** wurde von EryDH4 akzeptiert und eine formale *syn*-Eliminierung von Wasser katalysiert. Die Dehydratisierung steht im Gleichgewicht mit der, ebenfalls DH-katalysierten, stereoselektiven Addition von Wasser an die Doppelbindung (Abbildung 6b). In Modul 4 der DEBS agiert nach erfolgter Dehydratisierung durch EryDH4 die Enylreduktase (EryER4), so dass an der α - und β -Position eine vollständig reduzierte Verbindung vorliegt.³⁸

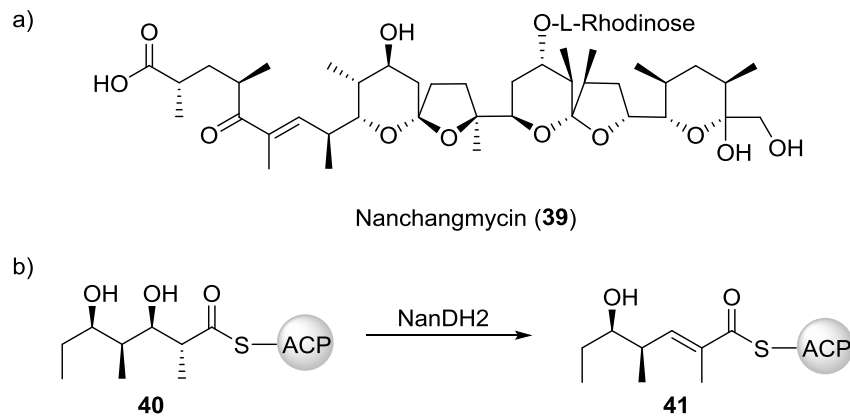
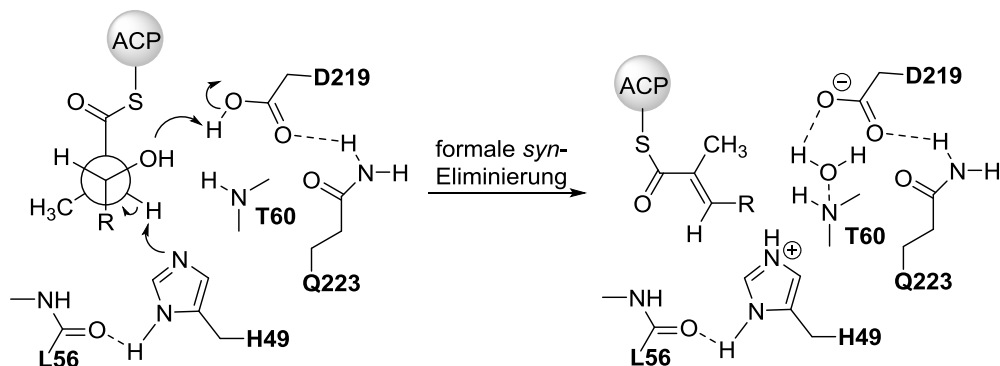


Abbildung 7: a) Struktur des antikoagidischen Polyethers Nanchangmycin (**39**). b) *In vitro* studierte Reaktion zur Untersuchung der Substratspezifität und Stereoselektivität von NanDH2.⁴²

In der Nanchangmycin-Biosynthese katalysiert die DH-Domäne aus Modul 2 (NanDH2) ebenfalls selektiv die formale *syn*-Eliminierung von Wasser. In einem analogen Ansatz zu den Studien zu EryDH4 konnte für NanDH2 durch *in vitro* Studien mit *in situ* erzeugten Substraten nachgewiesen werden, dass NanDH2, genauso wie EryDH4, eine hohe Substratspezifität besitzt und selektiv die Bildung von (*E*)-konfigurierten Doppelbindungen katalysiert (Abbildung 7b).⁴²



Schema 3: Postulierter Mechanismus der durch NanDH2 katalysierten formalen *syn*-Dehydratisierung im Nanchangmycin-Biosyntheseweg. Das katalytisch aktive Histidin (H49) fungiert im dargestellten Mechanismus als Protonenakzeptor und Asparaginsäure (D219) als Protonendonator. Der genau zeitliche Ablauf der vermutlich schrittweise ablaufenden Reaktionen ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt.⁴²

Die hier vorgestellten DH-Domänen aus den unterschiedlichen Typ I-PKS-Biosynthesewegen weisen untereinander sehr hohe Sequenzhomologien auf: Sie besitzen ein katalytisch aktives Histidin (H) konserviert in einem HX3DX4P-Motiv und eine katalytisch aktive Asparaginsäure (D) in einem konservierten DX3Q-Motiv. Histidin und Asparaginsäure stellen zusammen die katalytische Diade dar, wobei Histidin als Protonenakzeptor und Asparaginsäure als Protonendonator fungiert. Durch Mutation des katalytisch aktiven Histidins kommt es zur Ausschaltung der Dehydratase-Aktivität. Die hohe Sequenzhomologie der DH-Domänen

untereinander und die identische katalytische Diade lassen vermuten, dass allen katalysierten formalen *syn*-Eliminierungen von Wasser der gleiche Mechanismus zu Grunde liegt (Schema 3).^{35,38,42}

1.4 Pyransynthesen

Sauerstoff enthaltende Heterozyklen sind ein wichtiges Strukturelement in diversen Naturstoffen, besonders in Sekundärmetaboliten wie Kohlenhydraten, Polyketiden, Peptiden und Terpenoiden mit großer pharmakologischer Bedeutung. Aufgrund der großen Biodiversität sind verschiedenste enzymatische Prozesse an der Etablierung von Sauerstoff enthaltenden Heterozyklen beteiligt.⁴³

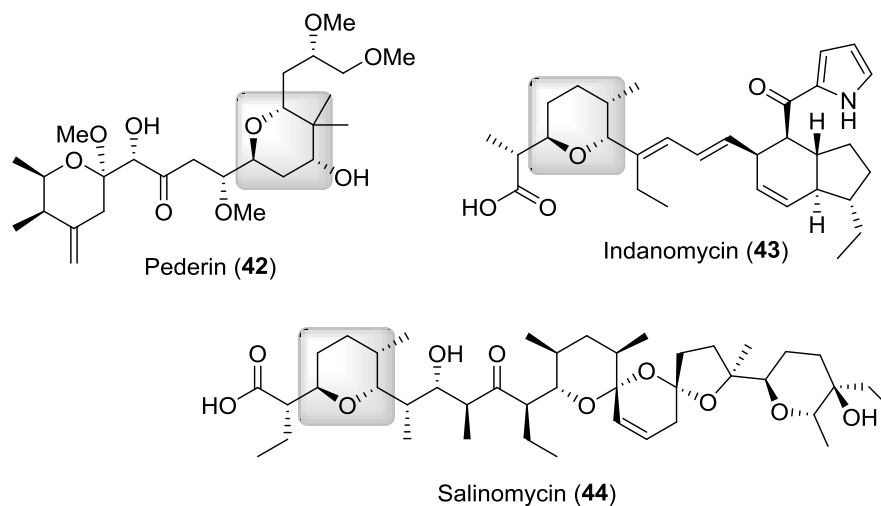
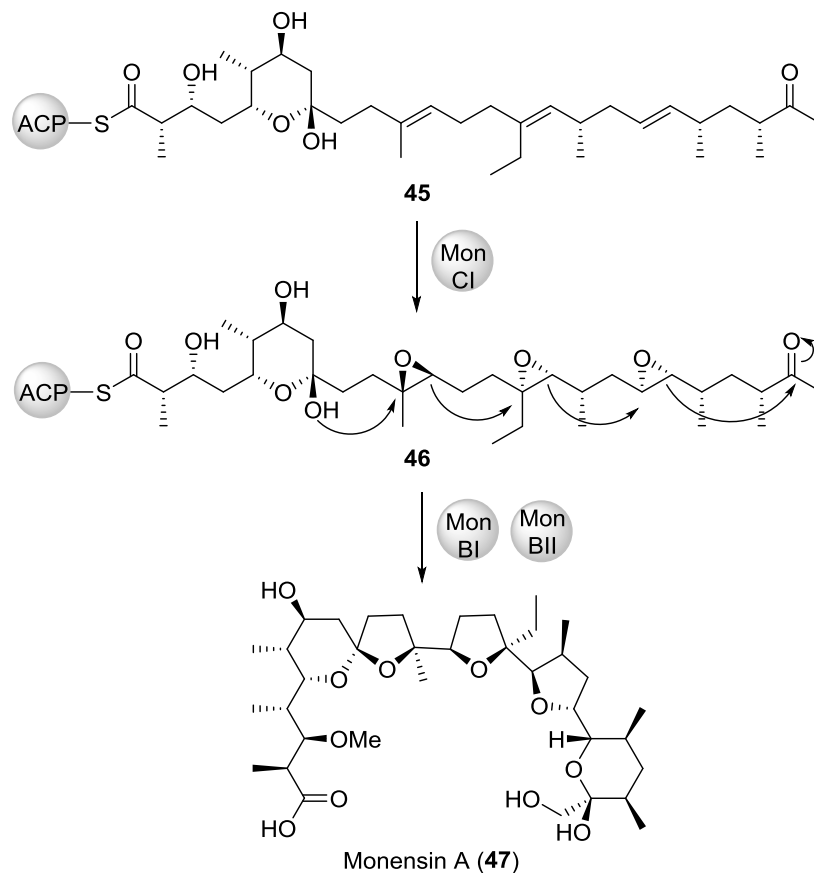


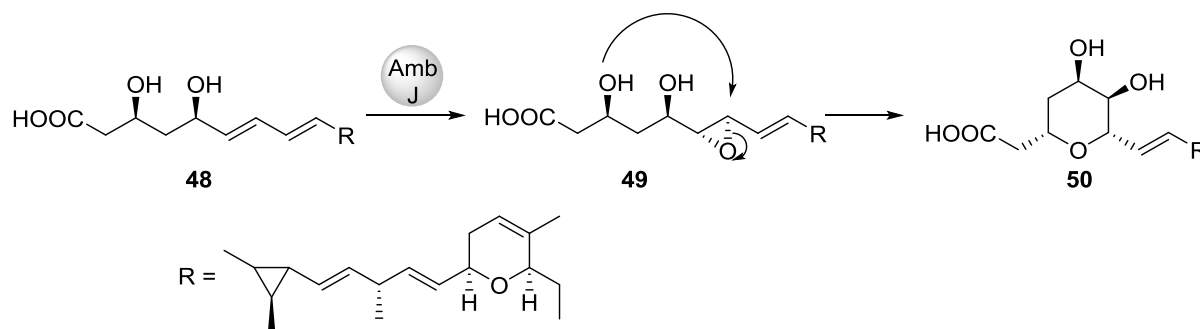
Abbildung 8: Strukturen von ausgewählten Polyketiden mit THP-Ringen. Die durch DH- oder PS-Domänen aufgebauten THP-Ringe sind in grau hervorgehoben.

Bei Tetrahydropyran- (THP) und Tetrahydrofuranringen (THF) handelt es sich um häufig anzutreffende Struktur motive in komplexen polyketidischen Naturstoffen wie beispielsweise in Pederin (42), Indanomycin (43), Salinomycin (44) (Abbildung 8) oder Monensin A (47) (Schema 4). Bedingt durch den starken Einfluss sowohl von THP- als auch von THF-Ringen auf die biologischen und pharmakologischen Eigenschaften der Naturstoffe, wurde in den letzten Jahren ein Augenmerk auf die Untersuchung der biosynthetischen Mechanismen und die stereoselektive Synthese gelegt.^{43,44,45} Der Aufbau von Sauerstoff enthaltenden Heterozyklen kann beispielweise durch eine nukleophile Substitution einer Hydroxyfunktion an ein Epoxid, eine Carbonyl-Gruppe oder einen MICHAEL-Akzeptor erfolgen.



Schema 4: Ausschnitt aus der postulierten Monensin A-Biosynthese.⁴⁶

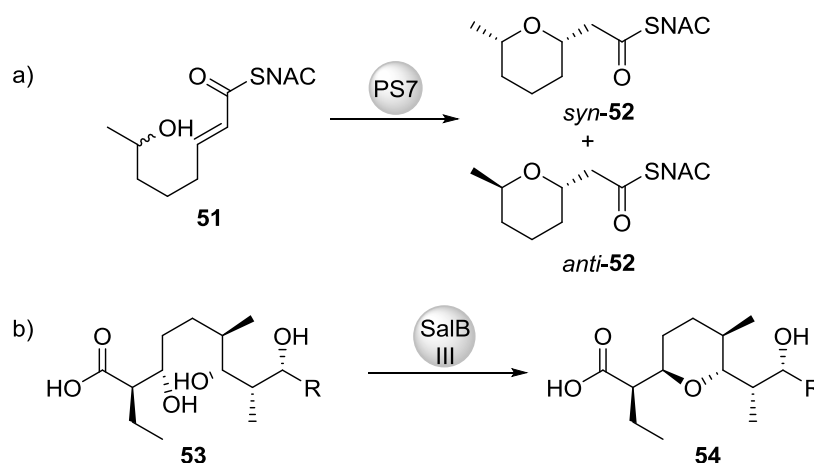
Der am häufigsten anzutreffende Reaktionstyp zur Bildung von Pyranen und Furanen ist die nukleophile Epoxidöffnung, wie im Monensin A-Biosyntheseweg. Monensin A (**47**) ist eines der wichtigsten und am besten charakterisierten ionophoren Polyether mit interessanten pharmakologischen Eigenschaften. Durch Fütterungsexperimente mit ^{13}C -markierten Acetateinheiten konnte gezeigt werden, dass Monensin A über eine Typ I Polyketidsynthese aufgebaut wird. Die Herkunft von 9 der 11 Sauerstoffatome konnten von HASLER *et al.* durch NMR-Studien und Fütterungsexperimente eindeutig zugeordnet werden. Die Sauerstoffatome im Trien-Intermediat **45** resultieren alle durch die Elongation mit der entsprechenden Acetat- oder Propionateinheiten. Für die Epoxidsynthese wird molekularer Sauerstoff verwendet als Quelle verwendet.^{47,48} Gendelektionen der vermeintlich verantwortlichen Enzymen MonCl, MonBI und MonBII zeigten, dass die drei THF-Ringe und der THP-Ring im östlichen Teil des Moleküls durch eine Kaskaden-Reaktion gebildet werden. Hierbei kommt es zunächst durch die Flavin-abhängige Epoxidase MonCl ausgehend vom (*E,E,E*)-konfigurierten Triensystem (**45**) zur stereospezifischen Bildung des Triepoxids (**46**). Im Anschluss erfolgt durch das Zusammenspiel von MonBI und MonBII eine Reaktionskaskade von stereoselektiven S_N2 -Epoxidöffnungen (Schema 4).^{46,49}



Schema 5: Ausschnitt aus dem Ambruticin-Biosyntheseweg. AmbJ katalysiert postketidisch die stereoselektive Synthese des Epoxids. Es ist nicht bekannt, ob die nachfolgende Epoxidöffnung ebenfalls durch AmbJ katalysiert wird oder durch eine spontane Reaktion erfolgt.³¹

Ein ähnlicher Mechanismus in dem eine stereoselektive Epoxidöffnung zur Etablierung des THP-Rings führt ist in der Biosynthese von Ambruticin zu finden. Das *Tailoring*-Enzym AmbJ weist eine hohe Sequenzhomologie zu bekannten Epoxidasen aus Polyethergenclustern auf und ist vermutlich für die stereoselektive Epoxidbildung verantwortlich. Die nachfolgende Epoxidöffnung kann entweder durch eine spontane oder von AmbJ katalysierte nukleophile Substitution erfolgen (Schema 5).³¹

Eine Klasse von enzymatischen Domänen zur Pyranbildung stellen die Pyransynthasen (PS) dar. PS-Domänen sind ausschließlich in *trans*-AT-PKS-Genclustern von wichtigen Naturstoffen wie beispielsweise Sorangicin und Bryostatine zu finden. DH- und PS-Domänen weisen untereinander eine hohe Sequenzhomologie auf, fallen aber in unterschiedliche phylogenetische Kläden.^{50,51}



Schema 6: a) Die monofunktionale PS-Domäne (PS7) aus dem Pederin-Biosyntheseweg katalysiert stereoselektiv die Zyklisierung zu *syn*-52 oder *anti*-52.⁵² b) SalB III aus dem Salinomycin-Biosyntheseweg katalysiert zunächst eine α,β -Dehydratisierung und anschließend eine Oxa-MICHAEL-Addition.⁵³

PIEL *et al.* konnten im Pederin-Biosyntheseweg durch *in vitro* Studien eine monofunktionale PS-Domäne (PedPS7) identifizieren, die ausgehend von der α,β -ungesättigten Verbindung **51**

stereoselektiv eine Oxa-MICHAEL-Addition zur Pyranbildung katalysiert. Beide Enantiomere des vereinfachten Vorläufers **51** wurden stereoselektiv zu *syn*-**52** oder *anti*-**52** umgesetzt (Schema 6a).⁵²

Beim ionophoren Polyether Salinomycin handelt es sich um ein *cis*-AT-PKS-Produkt.⁵⁴ LEADLAY *et al.* konnten im Salinomycin-Biosyntheseweg ein Enzym (SalBIII) identifizieren, welches sowohl eine Dehydratase- als auch eine Zyklase-Aktivität aufweist. Durch *in vitro* Studien mit dem heterolog produzierten SalBIII-Enzym und dem durch Gendeletionen erhaltenden Vorläufer konnte gezeigt werden, dass das *Tailoring*-Enzym SalBIII als Pyran-bildende Zyklase fungiert. Im postulierten Mechanismus erfolgt zunächst die α,β -Dehydratisierung, gefolgt von der 1,4-Oxa-MICHAEL-Addition (Schema 6b). Anhand der Kristallstruktur von SalBIII konnte die katalytische Diade bestehend aus zwei Asparaginsäuren (D38 und D104) identifiziert werden.⁵³

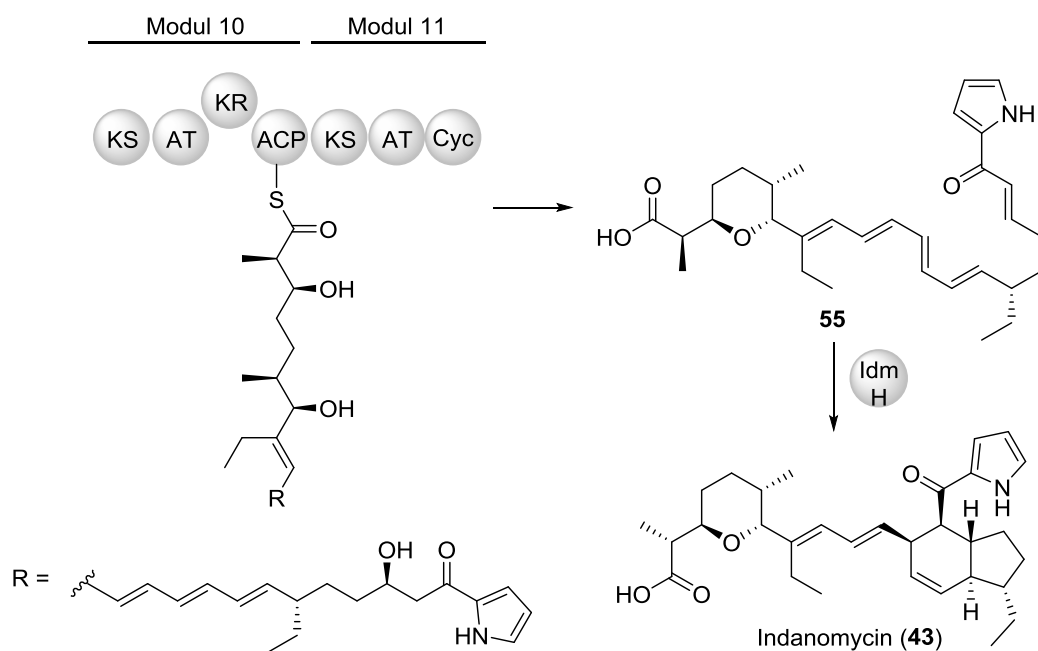


Abbildung 9: Ausschnitt aus dem Indanomycin-Biosyntheseweg. Das finale Modul beinhaltet anstelle einer TE- eine Zyklase-Domäne, welche vermutlich die THP-Bildung katalysiert.⁵⁵

Im Biosyntheseweg des NRPS-PKS-Hybrids Indanomycin befindet sich am C-terminalen Ende der PKS ein ungewöhnliches Abspaltungsmodul, bestehend aus einer AT-, einer KS- sowie einer Zyklase-Domäne. Anstelle der klassischen Thioesterase (TE)-Domäne ist eine Cyclase-Domäne (Cyc11) vermutlich für die Abspaltung der finalen Polyketidkette von der PKS verantwortlich. Im finalen Modul findet, bedingt durch die inaktive AT-Domäne, keine Verlängerung des Polyketidrückgrats statt (Abbildung 9). Entweder katalysiert die Cyc-

Domäne eine Dehydratisierungs-Zyklisierungs-Kaskade oder eine DH-Domäne aus einem vorausgehenden Modul katalysiert die Dehydratisierung und die Cyc-Domäne die finale Zyklisierung zur Abspaltung von **55**. Das erhaltene PKS-Produkt wird dann durch das *Tailoring*-Enzym ImdH zu Indanomycin (**43**) umgesetzt. Genauere mechanistische Details zur THP-Bildung in den Indanomycinen sind bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt.⁵⁵

1.5 Enoylisomerasen

Im Regelfall katalysieren Dehydratase-Domänen, wie in Kapitel 1.3 beschrieben, die Bildung von α,β -ungesättigten Thioestern durch eine formale *syn*-Eliminierung von Wasser. In diversen azyklischen und zyklischen Polyketiden ist jedoch ein ungewöhnliches Strukturmotiv zu finden, bei dem die Doppelbindung von der α,β - in die β,γ -Position verschoben ist.

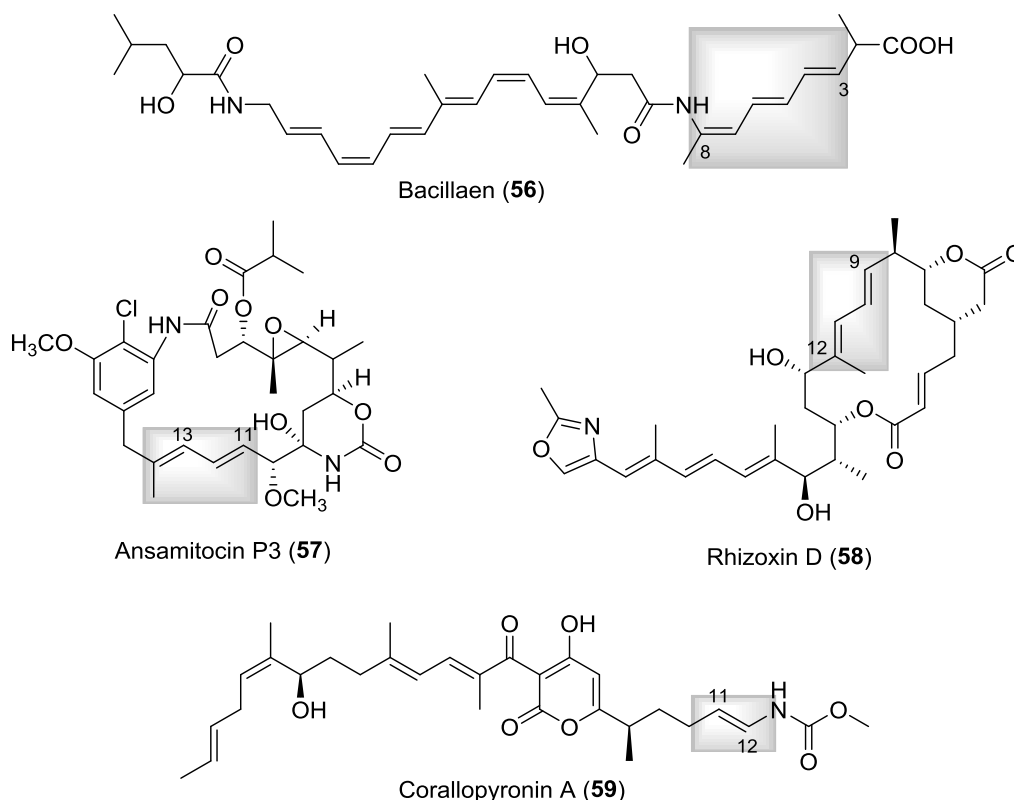


Abbildung 10: Strukturen von ausgewählten Polyketiden mit verschobenen Doppelbindungen. Die betrachteten verschobenen Doppelbindungssysteme sind in grau hervorgehoben.

Die meisten Polyketide, die solch ein Strukturmotiv beinhalten gehören zur Gruppe der *trans*-AT-Polyketide, wie z.B. Bacillaen (**56**), Rhizoxin (**58**) oder Corallopyronin A (**59**). Es sind bis zum jetzigen Zeitpunkt nur zwei Beispiele (Ansamitocin P3 (**57**) und Ambruticin (**15-22**))

mit isomerisierten Doppelbindungen aus der Gruppe der *cis*-AT-Polyketide bekannt (Abbildung 10). Alle hier vorgestellten Naturstoffe weisen die Gemeinsamkeit auf, dass es während der Biosynthese zur Verschiebung einer Doppelbindung kommt. In den ausgewählten Beispielen führt die Verschiebung stets zur Ausbildung von konjugierten Doppelbindungssystemen oder Enamiden.

Für den Ansamitocin-Biosyntheseweg postulierten KIRSCHNING *et al.* basierend auf Supplementierungsexperimenten mit synthetisch gewonnenen Vorläufern eine vinyloge *syn*-Eliminierung von Wasser. Diese wird vermutlich durch die Dehydratase-Domäne AsmDH3 katalysiert.⁵⁶

Bei Untersuchungen zum Rhizoxin- und Bacillaen-Biosyntheseweg konnten durch Deletionsexperimente und Charakterisierung der erhaltenen Abbruchfragmente die Module identifiziert werden, die für die Doppelbindungsisomerisierung verantwortlich sind. In beiden Biosynthesewegen sind diese sehr ähnlich organisiert.

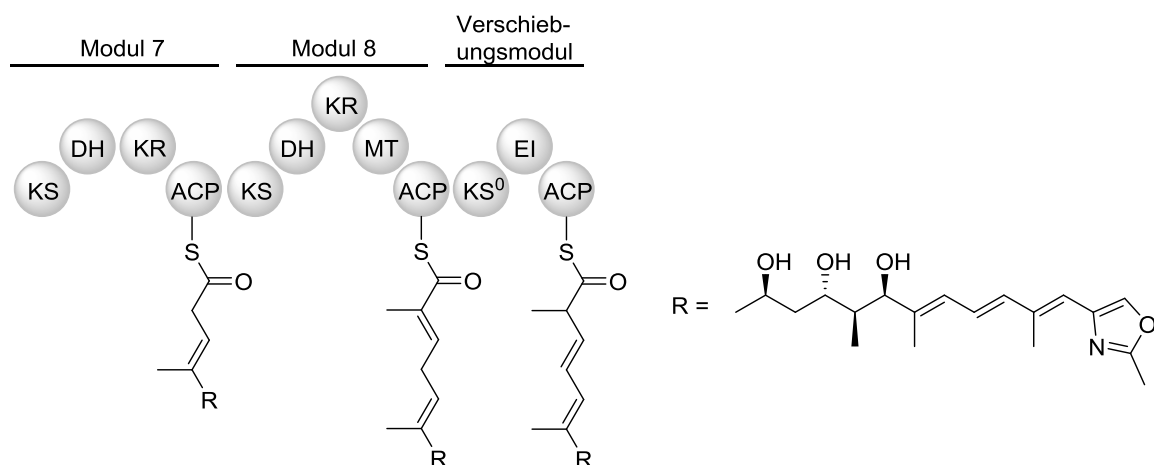
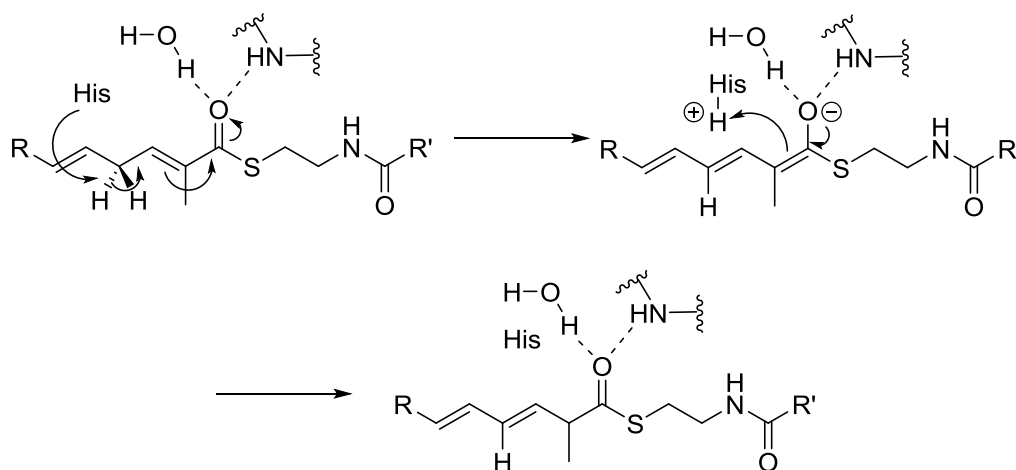


Abbildung 11: Ausschnitt aus dem Rhizoxin-Biosyntheseweg. In Modul 7 katalysiert die DH7 direkt einen Prozess, der zur Bildung eines β,γ -ungesättigten Thioesterintermediates führt. In Modul 8 erfolgt eine α,β -Dehydratisierung. Im nachfolgenden Verschiebungsmodul bestehend aus einer inaktiven KS⁰ und einer EI- und ACP-Domäne wird die Doppelbindungsisomerisierung katalysiert.⁵⁷ In älteren Publikationen werden die EI-Domänen als DH*-Domänen bezeichnet.

Im Rhizoxin-Biosyntheseweg erfolgt die Etablierung der ersten verschobenen Doppelbindung durch die Dehydratase-Domäne RhiDH7. Diese katalysiert entweder zunächst eine α,β -Dehydratisierung, gefolgt von der Doppelbindungsisomerisierung oder direkt eine β,γ -Dehydratisierung. Im nachfolgenden Modul kommt es zunächst durch RhiDH8 zur *syn*-Eliminierung von Wasser in der α,β -Position. Im anschließenden sogenannten Verschiebungsmodul bestehend aus einer inaktiven KS⁰, einer Enoylisomerase (EI)- (manchmal auch als DH* bezeichnet) und ACP-Domäne findet keine Verlängerung der Polyketidkette statt. Es wird ausschließlich die Verschiebung der Doppelbindung von der

α,β - in die β,γ -Position katalysiert, wodurch ein thermodynamisch günstigeres konjugiertes Diensystem zwischen C-9 und C-12 resultiert (Abbildung 11).⁵⁷

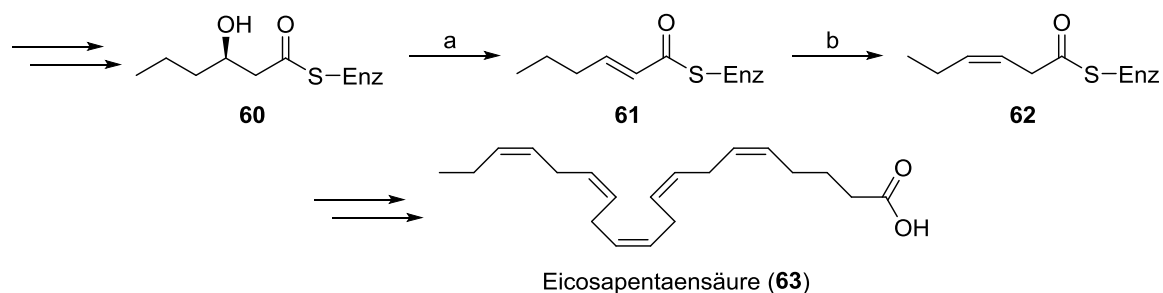
Bei der Bacillaen-Biosynthese konnten PIEL *et al.* durch Gendelektionsexperimente in Kombination mit einer HPLC-NMR-Technik die schnell zerfallenden und nicht isolierbaren Biosyntheseintermediate von Modul 13 und 14 charakterisieren. Bereits in Modul 13 erfolgt die Installation der ersten verschobenen Doppelbindung. Durch die weitere PKS-Prozessierung in Modul 14 wird die zweite verschobene Doppelbindung eingeführt, so dass ein konjugiertes Diensystem in der Enamid-Position resultiert.⁵⁸ Für die Erweiterung des konjugierten Diensystems zum finalen konjugierten Triensystem zwischen C-3 und C-8 postulierten KEATINGE-CLAY *et al.* anhand von Kristallstrukturanalyse, Deuterierungsexperimenten und *in vitro* Studien mit synthetisch hergestellten Substraten einige Jahre später einen Mechanismus. Im Bacillaen- konnte wie im Rhizoxin-Biosyntheseweg ein identisch organisiertes und agierendes Verschiebungsmodul (Modul 16) identifiziert werden.⁵⁹



Schema 7: Postulierter Mechanismus für die Doppelbindungsverschiebung nach KEATINGE-CLAY *et al.*. R = Bacillaen-Rückgrat; R' = ACP-Phosphopantetheinyarm.⁵⁹

Im Corallopyronin A-Biosyntheseweg konnte erstmals durch *in vitro* Studien mit einer heterolog produzierten EI-Domäne und synthetischen gewonnenen Substraten ein Einblick in den ablaufenden Mechanismus in Verschiebungsmodulen erhalten werden. Mit Hilfe von Deuterierungsexperimenten in Kombination mit der Erzeugung einer Punktmutante, in der das vermeintliche katalytisch aktive Histidin ausgetauscht wurde, konnte gezeigt werden, dass sowohl Dehydratasen als auch Enoylisomerasen das gleiche katalytisch aktive Histidin aufweisen. SCHÄBERLE *et al.* postulierten basierend auf diesen Ergebnissen einen Mechanismus in dem dieses Histidin als Protonenakzeptor und -donator bei der

Isomerisierung fungiert und eine zweite unbekannte katalytische Einheit zur Abstraktion des γ -Protons notwendig ist (Schema 7).⁶⁰ KEATINGE-CLAY *et al.* postulierten anhand der Kristallstrukturaufklärung von BaeEI16 einen modifizierten Mechanismus. In diesem ist das katalytisch aktive Histidin sowohl für die Abstraktion des γ -Protons als auch für die Verschiebungen des Protons zwischen der α - und γ -Position verantwortlich (Schema 7).⁵⁹ Die Verschiebungsmodule mit der charakteristischen EI-Domäne stellen eine besondere Klasse dar, die ausschließlich in der *trans*-AT-PKS zu finden sind. Durch Sequenzvergleiche von EI- mit DH-Domänen konnte gezeigt werden, dass beide Domänen das gleiche katalytisch aktive Histidin (H18) aufweisen. Bei DH-Domänen liegt dieses in einem konservierten HX8P-Motiv, in welchem die Imidazol-Einheit des Histidins durch das Prolin konformativ fixiert ist. Bei EI-Domänen ist das Prolin durch Leucin oder Valin ausgetauscht (HX8L/V), was zu einer konformativen Veränderung der Imidazol-Einheit im aktiven Zentrum führt. Zusätzlich ist die Asparaginsäure (D182), die die katalytische Diade von DH-Domänen vervollständigt, häufig durch Asparagin (N182) ersetzt. Die bei DH-Domänen katalytisch aktive Asparaginsäure liegt in einem DX3Q/H-Motiv. Das hoch konservierte Glutamin bzw. Histidin (Q186/H186) führt zur Erniedrigung des pKa-Wertes der Asparaginsäure, wodurch diese noch besser als Protonendonator bei der katalysierten Dehydratisierung fungieren kann. Die Konservierung des Glutamins bzw. Histidins bleibt in EI-Domänen nicht erhalten. Hierbei ist das Glutamin bzw. Histidin durch Valin oder Leucin substituiert.⁵⁹

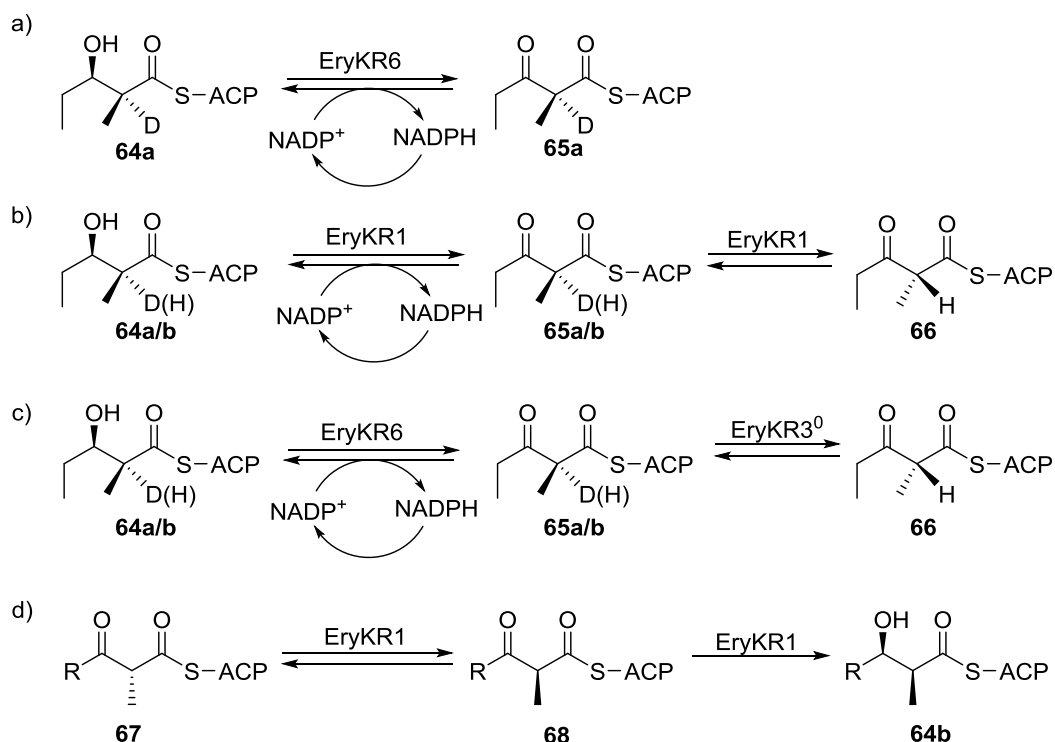


Schema 8: Mechanismus der Doppelbindungsisomerisierung bei der Synthese von PUFAs am Beispiel der Eicosapentaensäure-Fettsäuresynthese; a) Dehydratisierung; b) Doppelbindungsisomerisierung.⁶¹

Der Mechanismus der Doppelbindungsisomerisierung spielt nicht nur in der Polyketidsynthese, sondern auch bei der Synthese von bakteriellen polyungesättigten Fettsäuren (PUFA) eine wichtige Rolle. Bei der Eicosapentaensäure-Synthese katalysiert die FabA-ähnliche bifunktionale Dehydratase/Isomerase zunächst die Dehydratisierung und anschließend die *trans*-2,3-*cis*-Umlagerung (Schema 8).^{61,62,63}

1.6 Epimerasen

Epimerasen katalysieren die Inversion definierter Stereozentren in biologischen Molekülen. Bei der Inversion erfolgt zunächst ein Bindungsbruch von C-H, C-Heteroatom (O oder N) oder C-C-Bindungen. Die gebrochene Bindung wird im nachfolgenden Schritt unter Inversion der Konfiguration wieder neu ausgebildet. Epimerisierungen finden bevorzugt an Stereozentren statt, die sich in direkter Nachbarschaft zu einer Carbonylgruppe befinden, da diese den pKa-Wert des Wasserstoffatoms durch Resonanzstabilisierung reduziert.⁶⁴



Schema 9: a) EIX-Untersuchung der klassischen EryKR6-Domäne^{39,41} die ausschließlich die diastereospezifische Reduktion von β -Ketoverbindungen zu β -Hydroxyverbindungen katalysiert. b) EIX-Untersuchung der redox-aktiven epimerisierenden EryKR1-Domäne. c) Tandem-EIX-Untersuchung der redox-inaktiven epimerisierenden EryKR3⁰-Domäne. d) EryKR1 katalysierte Reaktionen (Epimerisierung und Reduktion) in der Erythromycin-Biosynthese. Die EIX-Methode ermöglicht die Verfolgung des Epimerase-katalysierten H/D-Austausches. Bei der Tandem-EIX-Methode werden gekoppelte enzymatische Reaktionen betrachtet, da die redox-inaktiven Domänen nicht isoliert untersucht werden können. Ery: Erythromycin.^{65,66}

In der PKS können Epimerisierungen beispielsweise durch KR-Domänen mit zusätzlicher Epimerase-Aktivität (z. B. EryKR1, Schema 9b oder d) oder durch redox-inaktive ausschließlich epimerisierende Domänen erfolgen. Diese weisen eine sehr hohe Sequenzhomologie zu KR-Domänen auf, wie beispielsweise EryKR3⁰ (Schema 9c). CANE *et al.* konnten durch Verwendung der Tandem-EIX-Methode (engl. *equilibrium isotope exchange*) die Epimerase-Aktivität von verschiedenen KR-Domänen (z. B. EryKR1, EryKR3⁰ und PicKR3⁰) nachweisen. Bei Verwendung von α -monodeutierten Ausgangsverbindungen ermöglicht

diese Methode in Kombination mit Massen-analytischen Verfahren die Verfolgung des Epimerase-katalysierten D/H-Austausches am α -Zentrum.⁶⁵ Durch die Veränderung der NADPH-Bindestelle in EryKR1 konnte gezeigt werden, dass die Epimerisierung unabhängig von der NADPH-abhängigen Reduktion erfolgt.⁶⁷ Jedoch ist für die Kettoreduktase- und Epimerase-Aktivität die gleiche katalytische Diade bestehend aus Serin und Tyrosin verantwortlich. Da nicht alle KR-Domänen eine zusätzliche Epimerase-Aktivität aufweisen, müssen weitere bis jetzt unbekannte katalytisch aktive Aminosäuren am Epimerisierungsprozess beteiligt sein oder solche, die entscheidende konformative Veränderungen des aktiven Zentrums bewirken.⁶⁶

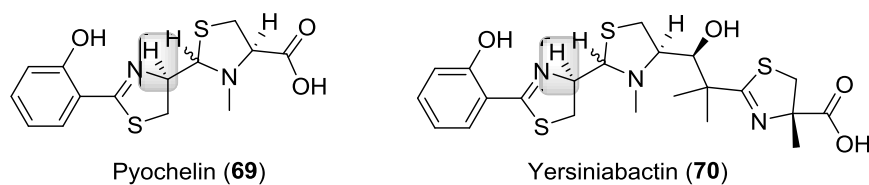
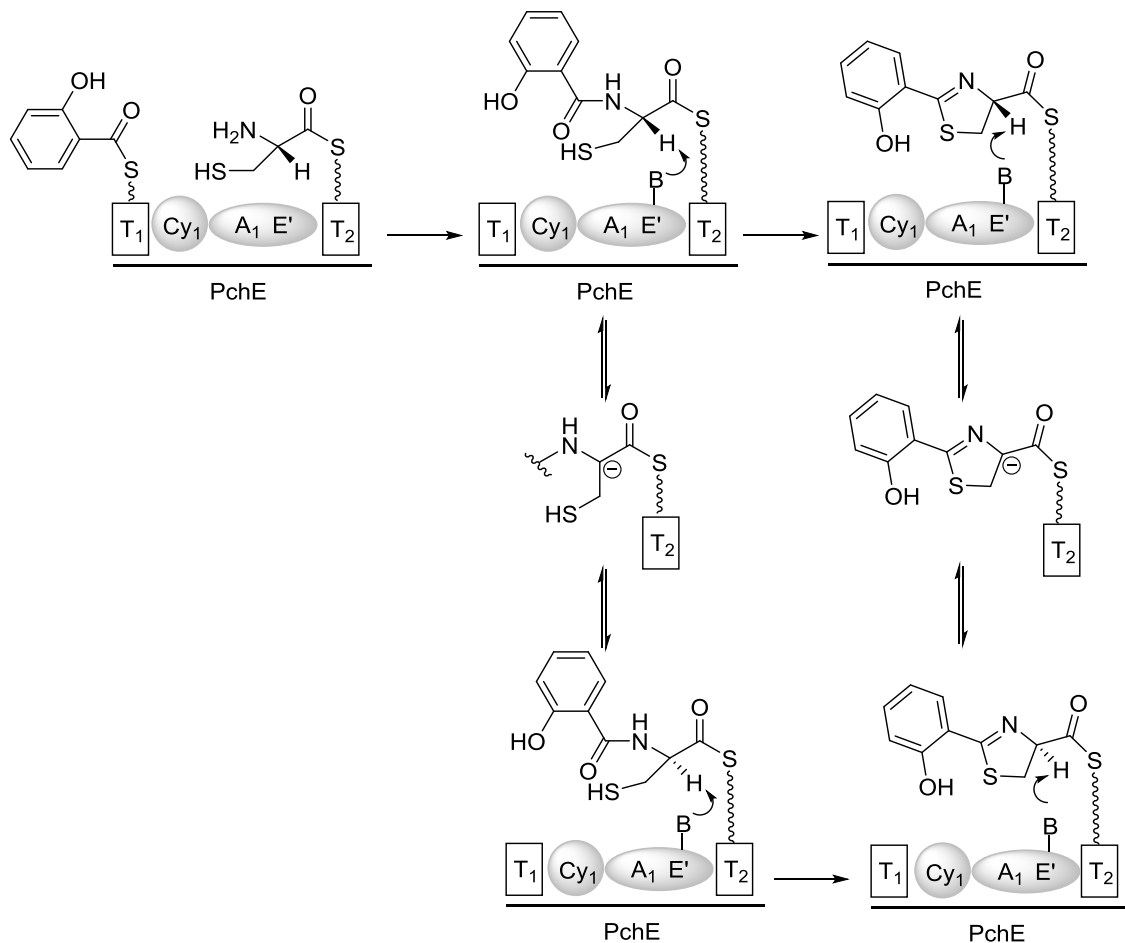


Abbildung 12: Strukturen der Thiazolin-beinhaltenen Siderophore Pyochelin (**69**) und Yersiniabactin (**70**). Die betrachteten Stereozentren sind in grau hervorgehoben.

In der NRP-Biosynthese erfolgt die Epimerisierung von Stereozentren gewöhnlicherweise durch Epimerase-Domänen.^{68,69} Die Siderophore Pyochelin (**69**) und Yersiniabactin (**70**) (Abbildung 12) weisen beide in ihrer Struktur einen D-Thiazolinring auf, welcher durch eine Zyklisierungs-Dehydratisierungs-Kaskade ausgehend von L-Cystein aufgebaut wird. Weder in der Pyochelin (Pch)- noch in der Yersiniabactin-Biosynthese ist eine Epimerase-Domäne zu finden.^{70,71,72}



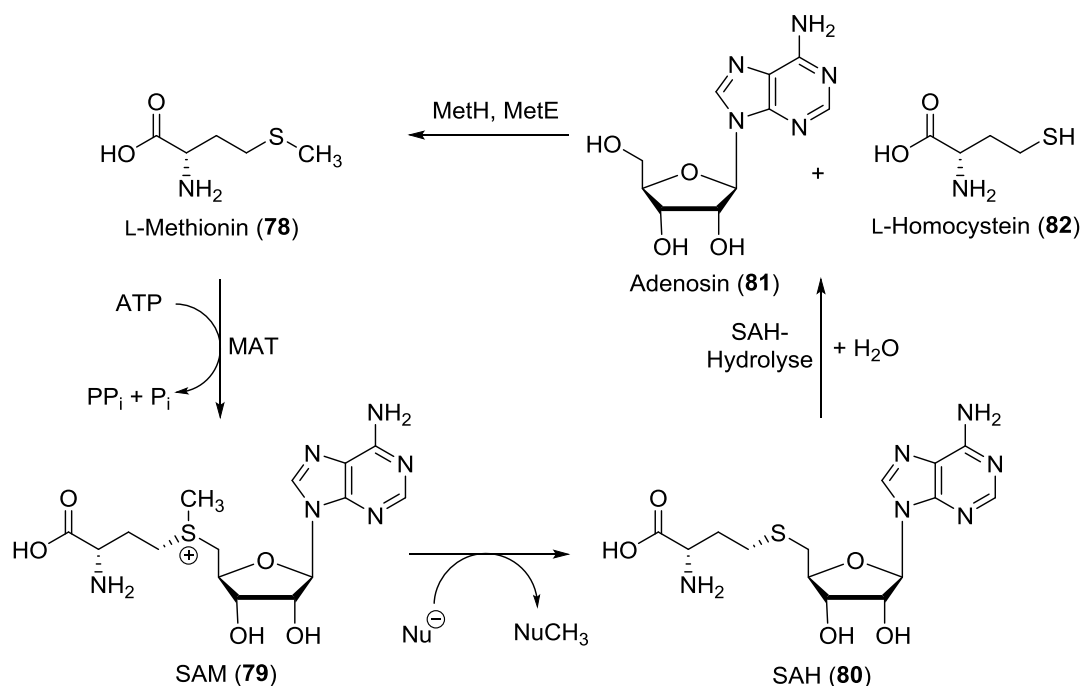
Schema 10: Ausschnitt aus dem Pyochelin-Biosyntheseweg. Die in PchE katalysierte Epimerisierung kann entweder am Hydroxybenzoylcystein-S-PchE- oder Hydroxyphenylthiazolin-S-PchE-Intermediat erfolgen. T: Thiolierung, Cy: Zyklase, A: Adenylierung, E': Epimerase.⁷³

WALSH *et al.* konnten durch Studien des isolierten PchE-Moduls aus der Pch-Biosynthese und des HMWP2-Moduls aus der Yersiniabactin-Biosynthese zeigen, dass beide eine Adenylierungs (A)-Domäne besitzen, in der eine Epimerase-Domäne (E') integriert ist. Diese ist für die Epimerisierung des C-2-Zentrums verantwortlich.^{72,74} Das nach erfolgter Amidbildung zwischen L-Cystein und 2-Hydroxy-Salicylsäure und anschließender Dehydratisierung erhaltene Intermediat entspricht strukturell der D-konfigurierten Dihydroaeruginensäure, isoliert aus den Kulturüberständen von *Pseudomonas fluorescens*.⁷⁵ Dementsprechend muss die Epimerisierung nach der Amidbildung entweder vor der Zyklisierungs-Dehydratisierungs-Kaskade oder direkt im Anschluss erfolgen. Da es sich hierbei um Gleichgewichtsreaktionen handelt, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt der genaue zeitliche Ablauf der Reaktionen nicht bekannt (Schema 10).⁷³

1.7 SAM-abhängige Methyltransferasen

S-Adenosyl-L-Methionin (SAM)-abhängige Methyltransferasen (MT) katalysieren die Übertragung einer Methylgruppe von SAM an verschiedenste Biomoleküle wie DNA, Proteine und Moleküle aus dem Sekundärmetabolismus.⁷⁶ Bei SAM handelt es sich um einen universellen, biologischen Kofaktor der nicht nur von SAM-abhängigen Methyltransferasen verwendet wird, sondern ebenfalls von Radikal-SAM-Enzymen, Spermidinsynthasen und *N*-Acyl-L-Homoserinlacton-Synthasen.⁷⁷ Die SAM-abhängigen Methyltransferasen werden in fünf Klassen (Klasse I-V), basierend auf den unterschiedlichen Strukturmotiven, eingeteilt.

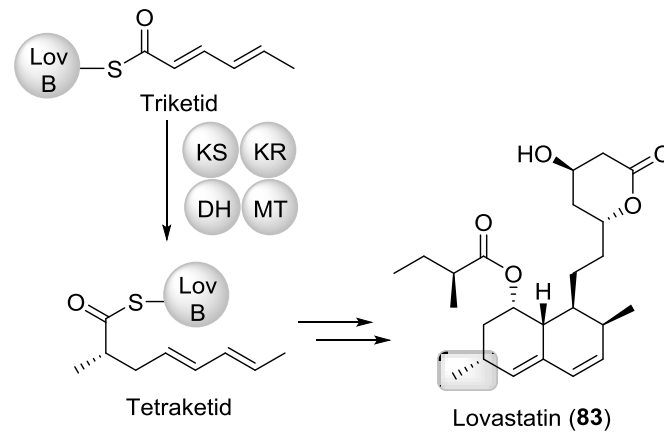
Die Methyltransferasen der Klasse I bilden die größte Gruppe und weisen eine charakteristische Domänenanordnung, ähnlich der NAD(P)-bindenden ROSSMANN-Faltung, auf. Trotz der hohen strukturellen Konsistenz zwischen den verschiedenen Methyltransferasen der Klasse I ist die Sequenzhomologie auf Aminosäurebasis nur sehr gering (weniger als 10%).⁷⁸ Die katalysierte Übertragung der Methylgruppe auf das Substrat erfolgt nach einem S_N2 -Mechanismus, wobei eine große Bandbreite an Nucleophilen, wie einfache Halogenidionen oder O-,N-,C-,S-,Se- und As-Nucleophile, involviert sein können.^{76,79}



Schema 11: *In vivo* Regenerationszyklus von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM, **79**) über die Zwischenstufen S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH, **80**), Adenosin (**81**) und Homocystein (**82**). MethH, MetE = Methioninsynthase, MAT = Methionin-Adenosyl-Synthase.⁷⁷

Bei der Übertragung der Methylgruppe von SAM auf das Nucleophil wird SAM (**79**) zu S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH, **80**) umgesetzt. *In vivo* erfolgt dann die Hydrolyse zu Adenosin

(**81**) und L-Homocystein (**82**). Die Methioninsynthase katalysiert anschließend die Überführung von L-Homocystein (**82**) in L-Methionin (**78**). Dieses kann durch die Methionin-Adenosyl-Synthase (MAT) unter ATP-Verbrauch zu SAM (**79**) umgesetzt werden (Schema 11).⁷⁷



Schema 12: Ausschnitt aus der Lovastatin-Biosynthese. Die Einführung der in grau hervorgehobenen Methylgruppe erfolgt während der PKS-Prozessierung durch eine Methyltransferase.

Die C-Methylierung bei der Synthese von Polyketiden kann entweder während der PKS-Prozessierung oder durch eine *post*-PKS-Modifikation erfolgen. Das Statin Lovostatin (**83**) wird durch eine iterativ agierende Typ I PKS aufgebaut. Die Einführung der Methylgruppe erfolgt durch eine SAM-abhängige Methyltransferase (Schema 12).^{80,81}

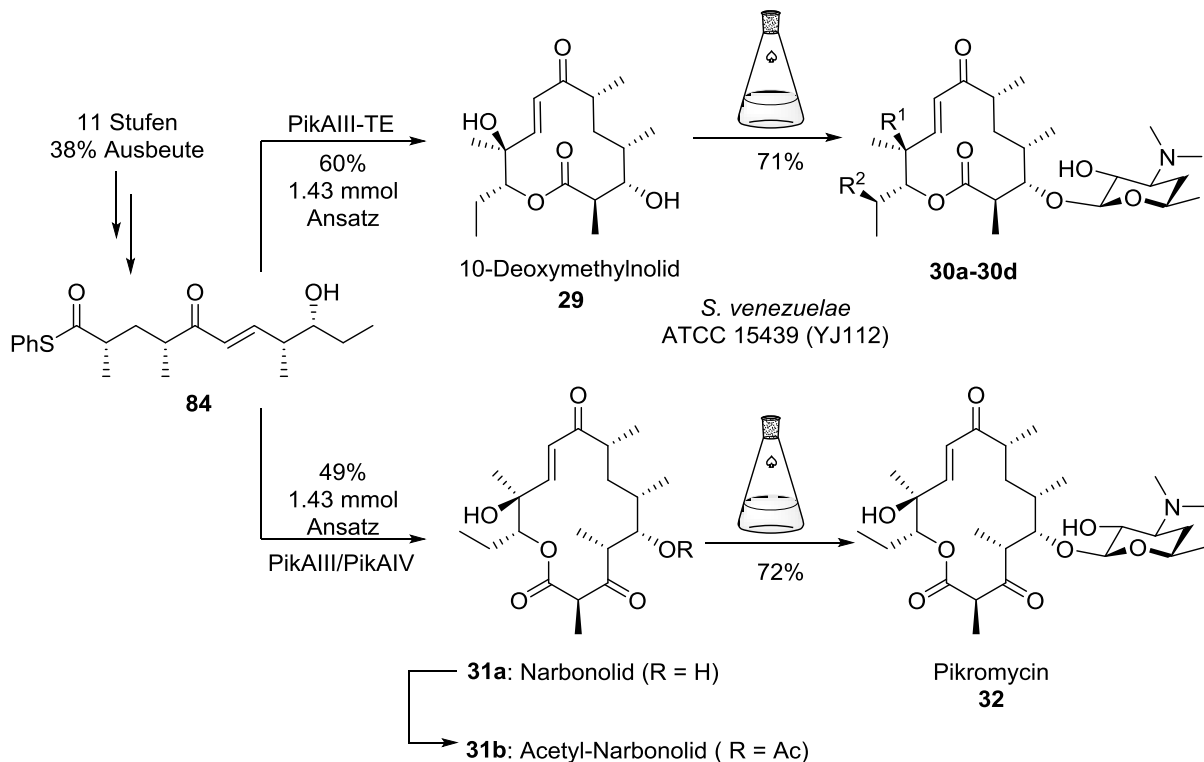
1.8 Biokatalyse

Die chemische Totalsynthese von komplexen, hochfunktionalisierten Polyketiden mit einer großen Bandbreite an pharmakologischen Eigenschaften stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar.⁸²

Enzymatisch katalysierte Reaktionen verlaufen in der Regel mit einer sehr hohen Regio-, Chemo- und Stereoselektivität, wodurch diese potentiell sehr interessant für die Anwendung in der chemoenzymatischen Synthese sind. Dies gilt insbesondere für die Verwendung in späten Syntheseschritten, in denen eine Differenzierung der unterschiedlichen Funktionalitäten zunehmend wichtiger wird.

Zusätzlich agieren sie unter milden Bedingungen in wässrigen Systemen bei Raumtemperatur. Durch die heterologe Produktion von einzelnen Enzymen aus Biosynthesewegen des Sekundärmetabolismus ist es möglich diese aus dem ursprünglichen Kontext herauszunehmen und in der Synthese von z. B. chiralen Bausteinen anzuwenden.^{8,83}

Um Enzyme biokatalytisch nutzbar zu machen müssen diese eine gewisse Substrattoleranz aufweisen. Zusätzlich muss die Reaktion im präparativen Maßstab in guten Ausbeuten durchführbar und die biokatalytische Reaktion der chemischen Variante überlegen sein.



Schema 13: Chemoenzymatische Synthese von Pikromycin (**32**) und Methymycin-Derivaten. Methymycin (**30a**, R¹ = OH, R² = H), Neomethymycin (**30b**, R¹ = H, R² = OH), Novamethymycin (**30c**, R¹ = OH, R² = OH) und Ketomethymycin (**30d**, R¹ = H, R² = O).^{34,83}

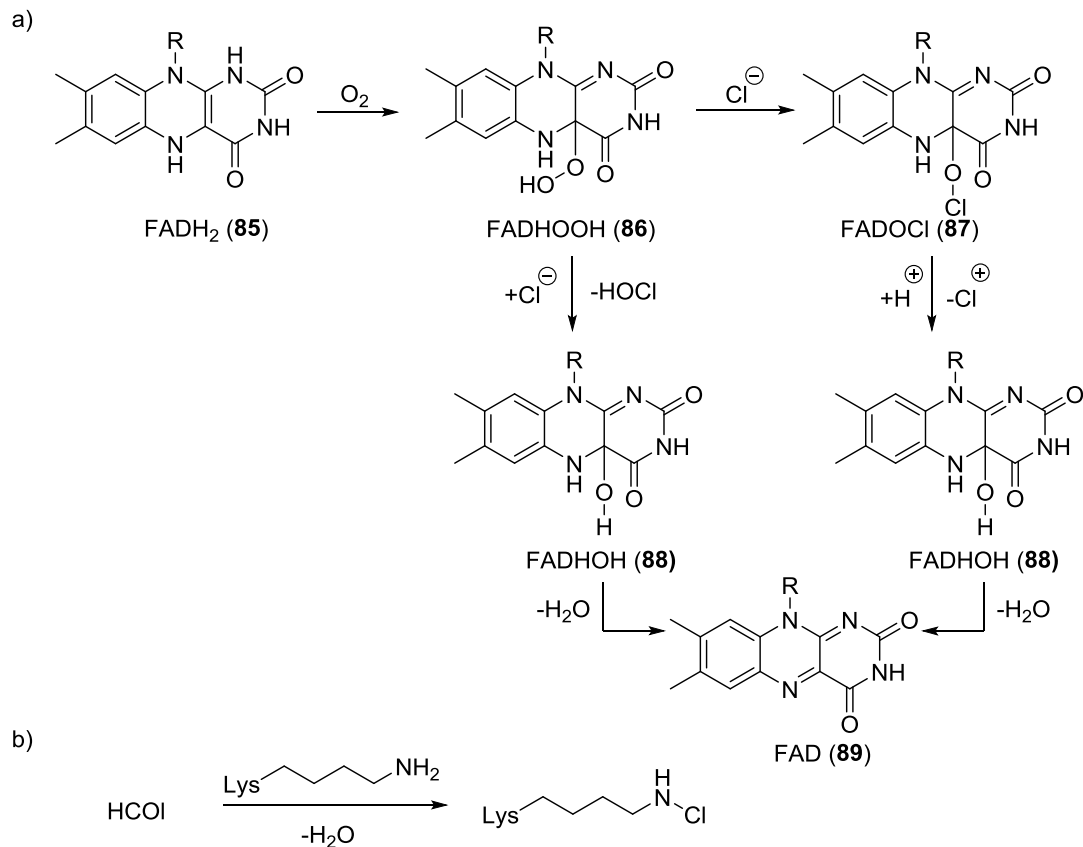
SHERMAN *et al.* veröffentlichten 2013 einen chemoenzymatischen Ansatz zur Synthese von Pikromycin, Methymycin und Methymycin-Derivaten (Schema 13). Hierbei wird die Substrattoleranz der Pikromycin PKS-Module PikAIII und PikAIV ausgenutzt. Beide sind verantwortlich für die Verlängerung der Polyketidkette um eine Acetateinheit. Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben wurde in vorrausgegangenen *in vitro* Studien gezeigt, dass die substrattolerante PikTE die Abspaltung sowohl zum 12-gliedrigen 10-Deoxymethynolid (**29**) als auch zum 14-gliedrigen Narbonolid (**31a**) katalysiert, wodurch diese potentiell für die Nutzung als Biokatalysator interessant ist.^{34,35}

Zunächst wurde das benötigte Pentaketid **84** in 11 Stufen ausgehend vom (*R*)-Roche-Ester synthetisiert. Durch die Synthese und *in vitro*-Testung verschiedener Thioester mit der PikAIII-TE Domäne wurde gezeigt, dass die Verwendung des Thiophenolester **84** zu einer 4-fachen Steigerung des Umsatzes (verglichen mit dem SNAC-Thioester) führt und darüber hinaus nicht hydrolyseempfindlich ist. Als Verlängerungsbaustein für die

chemoenzymatische Synthese wurde anstelle des teuren Methylmalonyl-CoA, der in zwei Stufen ausgehend von Meldrumssäure in hohen Ausbeuten, kostengünstig synthetisierbare Methylmalonyl-SNAC-Thioester verwendet.³⁴ Das unnatürliche Fusionsprotein PikAIII-TE sowie das Fusionsprotein PikAIII-PikAIV wurden heterolog in *E. coli* BAP1 Zellen exprimiert und ohne weitere Reinigung in der Synthese eingesetzt. Der Mengen des benötigten Kofaktors NADPH wurde durch Verwendung des G6PDH-abhängigen Regenerationssystem stark reduziert.⁸⁴ Nach Etablierung der optimalen Reaktionsbedingungen im präparativen Maßstab konnte die Umsetzung von 0.5 g des Pentaketids **84** mit PikAIII-TE zu 10-Deoxymethylnolid **29** in 60% Ausbeute und mit PikAIII/PikAIV zu Acetyl-Narbonolid in 49% Ausbeute durchgeführt werden (Schema 13).³⁴

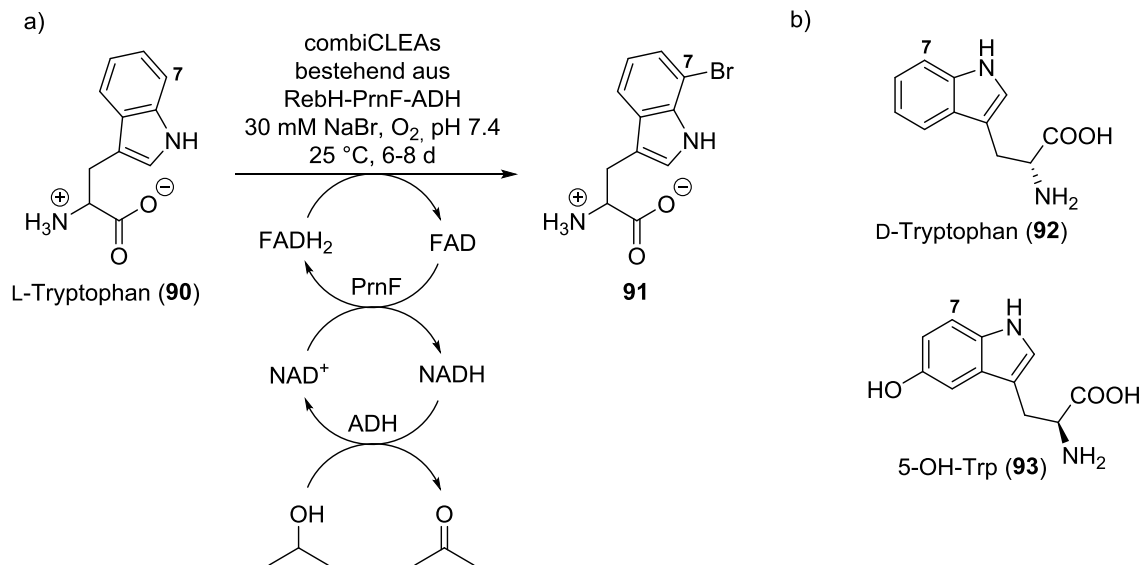
Die Überführung der erhaltenen Makrolactone **29** und **31a/31b** in die korrespondierenden Makrolide sowie die P450-initiierte C-H-Oxidierung erfolgte *in vivo* unter Verwendung der modifizierten *S. venezuelae* ATCC 15439 Stämme DHS2001 und YJ112.⁸⁵ Narbonolid **31a** konnte unter Verwendung von YJ112 in 72% in Pikromycin überführt werden (13% Gesamtausbeute ausgehend von (*R*)-Roche-Ester). Die YJ112-vermittelte Umsetzung von 10-Deoxymethylnolid **29** ergab **30a**, **30b**, **30c** und **30d** im Verhältnis 3.5:5:3:1 (Gesamtausbeute 71%). Bedingt durch die guten Ausbeuten weist dieses Katalysesystem ein hohes Potential für die Nutzbarkeit in der chemoenzymatischen Synthese auf.

Ein weiterer wichtiger Baustein in der Synthese von medizinisch und agrochemisch relevanten Verbindungen sind Arylhalogenide, da zum einen die Halogenfunktion häufig für die biologische Aktivität notwendig ist und zum anderen die Halogengruppe für weitere Derivatisierungen verwendet werden kann.⁸³ Arylhalogenide lassen sich chemisch durch elektrophile aromatische Substitution mit Halogenen generieren. Allerdings ist die Einführung auf chemischem Wege nicht an allen Positionen möglich und die Halogenierung erfordert harsche Reaktionsbedingungen. Einen alternativen Zugang unter deutlich milderen Bedingungen (wässriges Medium, Raumtemperatur, O₂) zu halogenierten Aromaten bieten Halogenasen. Halogenasen nutzen entweder ein Cl-Kation oder ein Cl-Radikal als aktives Intermediat. Eine Unterklasse von halogenierenden Enzymen sind die FAD-abhängigen Halogenasen. Diese nutzen als Halogenquelle Halogensalze wie z.B. NaCl und können die Einführung von Halogenen an wenig oder kaum aktivierten Positionen katalysieren.



Schema 14: a) Mechanismen zur Generierung der elektrophilen Chlorspezies bei Flavin-abhängigen Halogenierungen; b) Übertragung des erhaltenen Hypochlorits auf eine Lysinseitenkette des Enzyms.⁸⁶

Flavin-abhängige Halogenasen benötigen molekularen Sauerstoff zur Generierung von Flavinhydroperoxid (FADHOOH, **86**) aus FADH₂ (**85**). Durch einen nukleophilen Angriff des Cl⁻-Anions kommt es entweder zur Bildung von FADOCi (**87**). Dieses kann durch Protonierung unter Bildung von FADHOH (**88**) die elektrophile Chlorspezies freisetzen. Alternativ wird ausgehend von FADHOOH (**86**) die halogenierende Spezies HOCl generiert. Das bei beiden Prozessen gebildete FADHOH (**88**) wird durch Dehydratisierung zu FAD (**89**) umgesetzt (Schema 14a). Das erhaltene Hypochlorit kann entweder direkt oder gebunden an eine Lysinseitenkette des Enzyms für die Reaktion verwendet werden (Schema 14b).^{86,87,88}



Schema 15: a) Bromierung von L-Tryptophan mit dem multifunktionalen, wiederverwendbaren combiCLEAs Katalysesystem. b) Tryptophan-Derivate, die im Grammaßstab halogeniert wurden. PrnF: Flavinreduktase aus *Pseudomonas fluorescens*; ADH: Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus sp.*⁸⁹

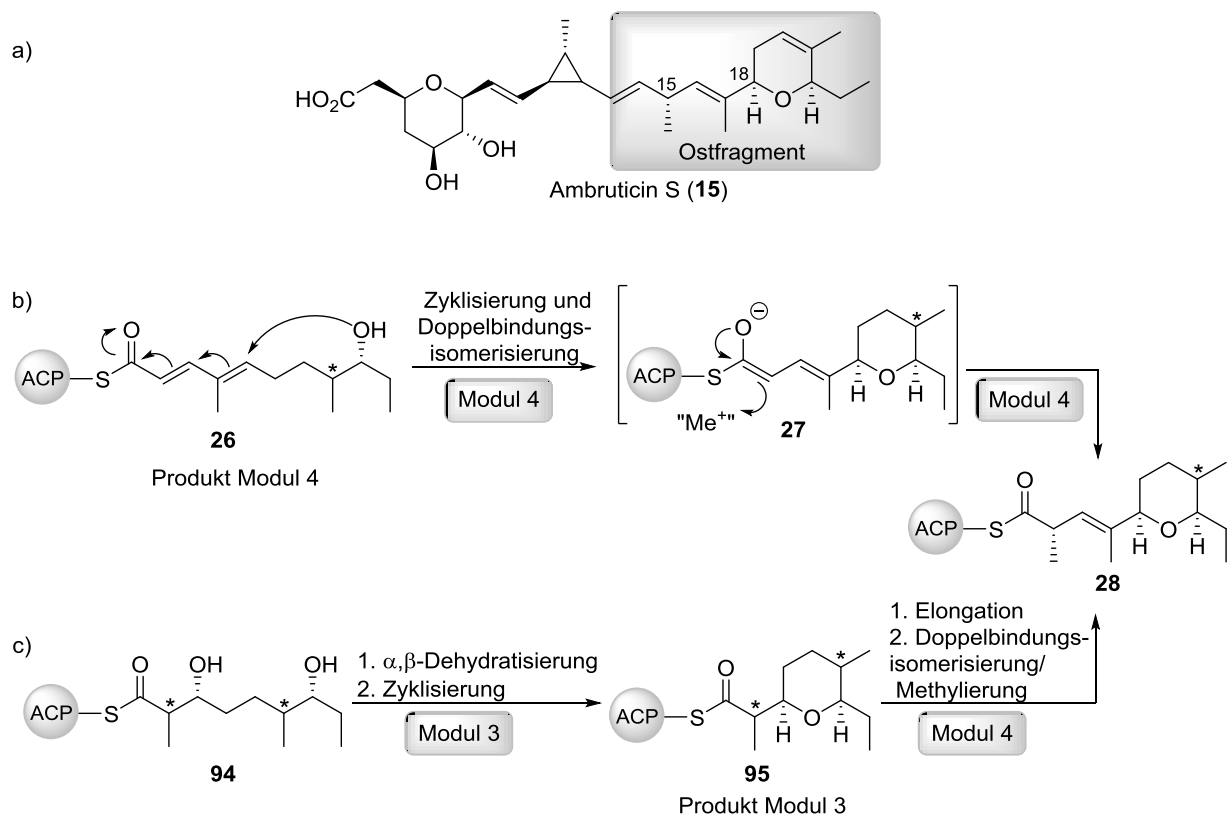
Die Halogenase aus dem Rebeccamycin-Biosyntheseweg (RebH) katalysiert die regioselektive Chlorierung an der elektronisch nicht begünstigten C-7-Position von L-Tryptophan (**90**). Durch die Umsetzung von RebH mit verschiedensten Tryptophan-Derivaten wurde gezeigt, dass RebH bevorzugt die Halogenierung an C-7 katalysiert. In Abhängigkeit des Substitutionsmusters des Tryptophan-Derivates konnten auch Halogenierungen der C-5 und C-6-Position beobachtet werden. Weiterhin wurden Indol- und Naphthalen-Derivate selektiv halogeniert. Bei allen getesteten Derivaten konnte immer ein Umsatz größer 94% und eine Ausbeute zwischen 53% bis 93% erreicht werden.^{90,91,92,93,94,95}

SEWALD *et al.* konnten ein RebH-Katalysesystem in Kombination mit der Flavinreduktase PrnF und einem NADPH-Regenerationssystem basierend auf einer Alkoholdehydrogenase etablieren. Dieses katalysiert die einfache oder zweifache Chlorierung oder Bromierung verschiedenster Tryptophan-Derivate (Schema 15a und b).⁹⁶

Die Immobilisierung von RebH zur Erzeugung von sogenannten *cross-linked enzyme aggregates* (combiCLEAs) erfolgt durch die Quervernetzung aller beteiligten Enzyme (RebH, PrnF, ADH) über die Lysinseitenketten. Die combiCLEAs haben den Vorteil, dass auch nach längerer Zeit kaum Aktivitätsverluste zu verzeichnen sind. Zusätzlich sind sie einfach durch Filtration vom Reaktionsmedium abzutrennen und in mehreren Halogenierungszyklen in guten Ausbeuten wiederverwendbar. Mit dem immobilisierten Katalysesystem konnte die regioselektive Halogenierung von L-Tryptophan (**90**), D-Tryptophan (**92**) und 5-OH-Tryptophan (**93**) im Grammaßstab durchgeführt werden (Schema 15a und b).⁸⁹

2 Zielsetzung

Die Ambruticine weisen für Polyketide vom Typ I ungewöhnliche Strukturelemente auf. Beispielsweise besteht das Ambruticin-Ostfragment aus einem THP-Ring verknüpft mit einer 1,4-Dienyl-Seitenkette (Schema 16a). Im Rahmen dieser Arbeit sollte einerseits die biosynthetische Bildung des Ambruticin-Ostfragments in einem interdisziplinären Ansatz bestehend aus organischer Synthese, Molekularbiologie sowie Enzymologie aufgeklärt werden. Andererseits sollte die für die THP-Ringbildung verantwortliche Domäne für die präparative chemoenzymatische Synthese von anderen Heterozyklen genutzt werden.



Schema 16: a) Struktur von Ambruticin S. Das in dieser Arbeit betrachtete Ostfragment ist in grau hervorgehoben; b) Postulierter Mechanismus für die konzertierte Bildung des THP-Rings und des 1,4-Diens nach REEVES *et al.*³¹ basierend auf Genclusteranalysen; c) Im Rahmen der vorliegenden Arbeit postulierter Mechanismus für die sequenzielle Bildung des THP-Rings und des 1,4-Diens. Bei mit Sternchen markierten Zentren handelt es sich um Stereozentren unbekannter Konfiguration.

Für den ersten Teil sollte durch die *in vitro* Charakterisierung der vermeintlich verantwortlichen Dehydratase-Domänen AmbDH3 und AmbDH4 gezeigt werden, ob die Doppelbindungsverschiebung von der α,β - in die β,γ -Position gleichzeitig mit der THP-Ringbildung über einen konzertierten Mechanismus in Modul 4, wie von REEVES *et al.* postuliert, erfolgt (Schema 16b).³¹ Alternativ könnte es sich um eine sequenzielle Etablierung

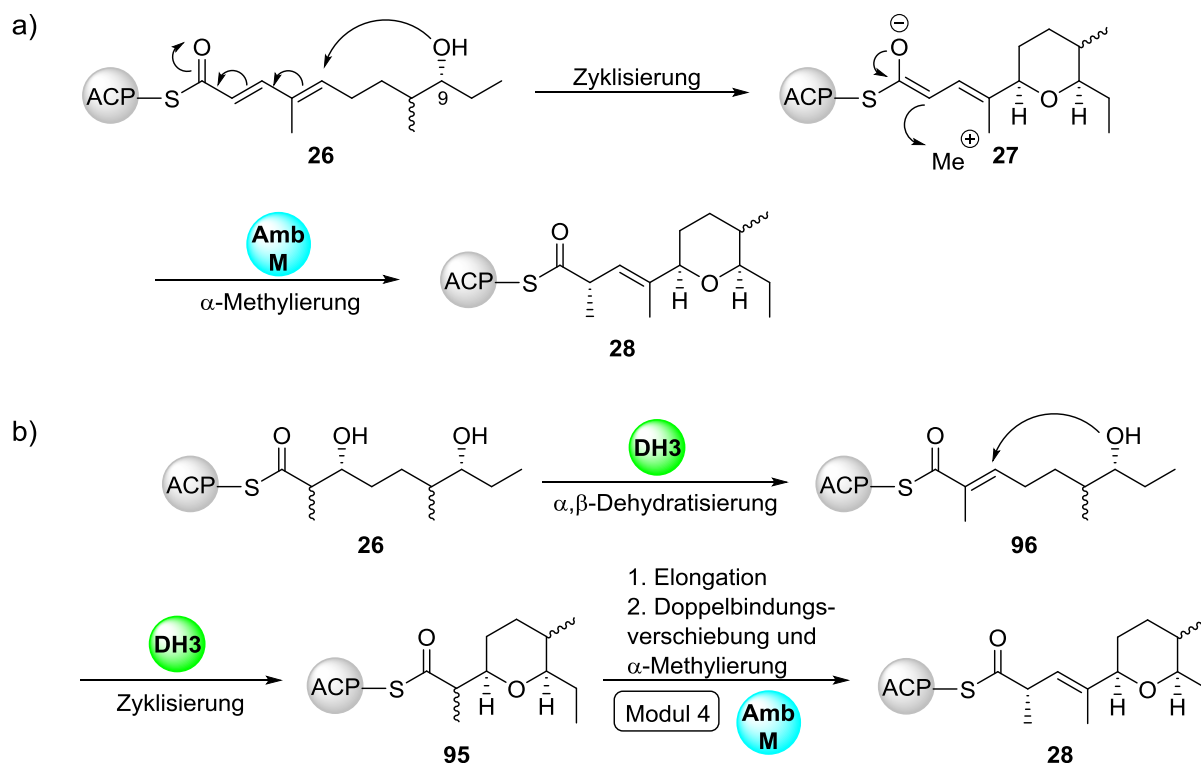
der beiden Strukturmodule in den Modulen 3 (THP-Ring) und 4 (Diensystem) handeln (Schema 16c). Zusätzlich sollte der Zeitpunkt der durch die C-Methyltransferase AmbM katalysierten Methylierung an C-15 definiert werden.

Für die *in vitro* Untersuchung sollten die an diesem Prozess vermeintlich beteiligten Dehydratase-Domänen AmbDH3 und AmbDH4 und die C-Methyltransferase AmbM ausgehend von den synthetischen Genen in geeignete Expressionsvektoren kloniert, heterolog in *E. coli* exprimiert und anschließend isoliert werden. Die benötigten Substratsurrogate sollten strukturell sehr stark mit den nativen Vorläufern verwandt und über eine flexible, divergente Syntheseroute zugänglich sein. Die Auswertung der Enzymaktivitätstests im analytischen und semi-präparativen Maßstab sollte über HPLC-MS- und NMR-Analyse erfolgen.

Für den zweiten Teil sollte das biokatalytische Potential von AmbDH3 in Bezug auf die Substrattoleranz und die Möglichkeit der Reaktionsvergrößerung in den präparativen Maßstab (>250 mg) untersucht werden. Dies ist von Interesse, da Heterozyklen ein wichtiges Strukturelement in Naturstoffen verschiedenster Klassen darstellen und häufig durch ihre konformatorischen Eigenheiten maßgeblich zu den strukturellen und physikalischen Eigenschaften beitragen.⁹⁷

3 Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse

3.1 Studien zur biosynthetischen Rolle der Dehydratase-Domäne AmbDH3⁹⁸

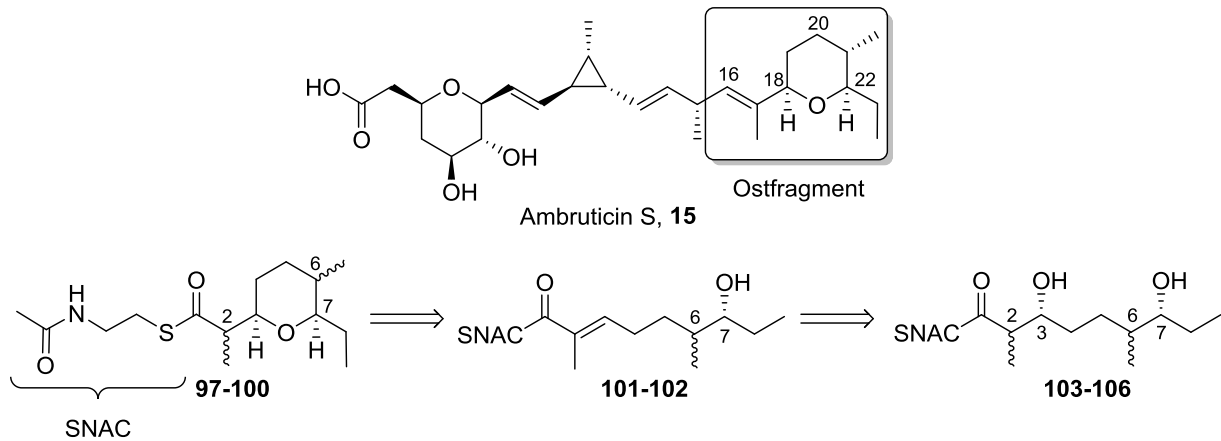


Schema 17: Hypothetische Mechanismen zur Bildung des THP-Rings im östlichen Teil der Ambruticine; a) Postulat von REEVES *et al.*³¹; b) eigenes Postulat.

Basierend auf Genclusternanalysen postulierten REEVES *et al.* einen Ambruticin-Biosyntheseweg in dem der THP-Ring durch eine konjugierte 1,6-Addition der C-9-Hydroxy-Funktion von Verbindung **29** an das Diensystem in Modul 4 aufgebaut wird. Das daraus resultierende Enolat **27** kann entweder durch eine elektrophile Methylgruppe von SAM oder durch Protonierung zum Produkt **28** abgefangen werden (Schema 17a).³¹ Chemisch betrachtet ist es jedoch ebenfalls möglich, dass die THP-Bildung bereits in Modul 3 durch eine Oxa-MICHAEL-Addition der Hydroxy-Funktion an das α,β -ungesättigte System erfolgt (Schema 17b). In den vergangenen Jahren wurde gezeigt, dass solche Zyklisierungen durch spezielle Epoxidhydrolasen, Dehydratase- oder Pyransynthase-Domänen (s. Kapitel 1.4) katalysiert werden können.^{52,53} Weder Modul 3 noch Modul 4 des Ambruticin-Biosynthesewegs weisen eine Zyklase-Domäne auf. Weiterhin sind im Ambruticin-Gencluster keine zusätzlichen nicht-kanonischen Domänen zu finden, welche die THP-Bildung katalysieren könnten. Hierauf basierend liegt dieser Arbeit das Postulat zu Grunde, dass

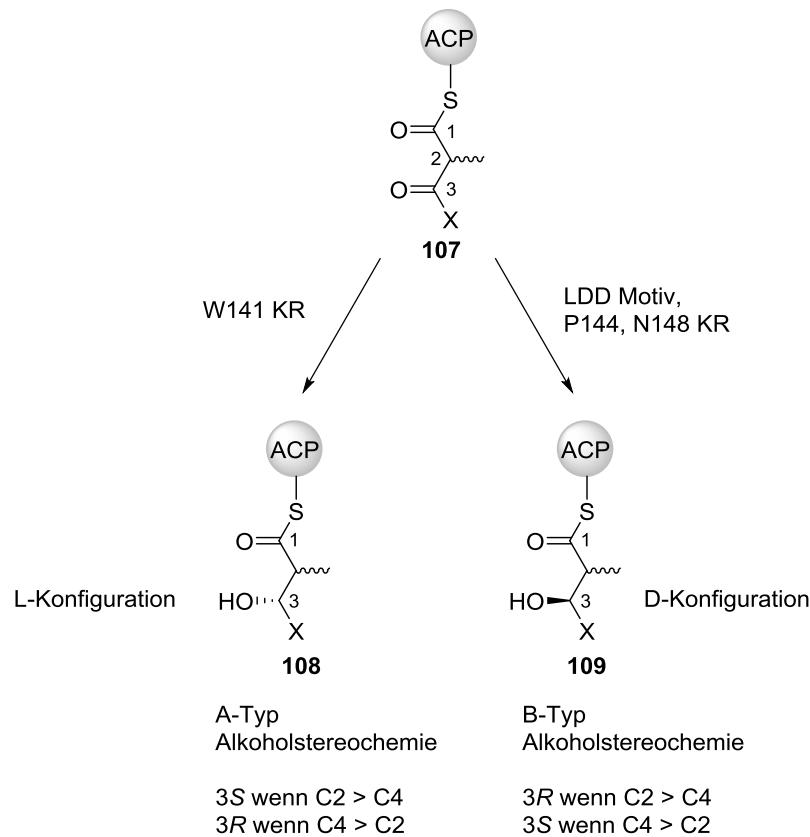
AmbDH3 *in vivo* nicht nur die Dehydratisierung von **26** katalysiert, sondern ebenfalls für die Bildung des THP-Rings verantwortlich ist.

3.1.1 Synthetische Arbeiten⁹⁸



Schema 18: Retrosynthetischer Ansatz ausgehend vom Ambruticin-Ostfragment. Die *N*-Acetylcysteamin-Einheit wird im Folgenden mit SNAC abgekürzt.

Für die *in vitro* Untersuchung der Dehydratase-Domäne AmbDH3 sollten vereinfachte Substrate in Form von α,β -ungesättigten- **101-102** und β -Hydroxy-SNAC-Thioestern **103-106** synthetisiert werden. Die Stereochemie der Hydroxy-Funktion an C-7 kann direkt aus Ambruticin (**15**, C-7 entspricht im Ambruticin aufgrund der unterschiedlichen Nummerierung C-22) abgeleitet werden (Schema 18). Die Stereochemie der Hydroxy-Funktion an C-3 kann unter zu Hilfenahme der Studien von CAFFREY und REID zu Ketoreduktase-Domänen vorausgesagt werden. Hierbei wird die Aminosäuresequenz AmbKR3 betrachtet. CAFFREY und REID konnten unabhängig voneinander zeigen, dass eine charakteristische Aminosäuresequenz in der aktiven Tasche der Ketoreduktase-Domäne verantwortlich ist für die resultierende Konfiguration der β -Hydroxy-Funktion.^{99,100}



Schema 19: Korrelation der Aminosäuresequenz der Kettoreduktase-Domäne mit der Stereochemie der gebildeten β -Hydroxy-Funktion.⁹⁹

Im Allgemeinen wird zwischen A- und B-Typ Kettoreduktase-Domänen unterschieden. Die A-Typ Kettoreduktasen weisen in ihrer Aminosäuresequenz ein konserviertes Tryptophan (W141) auf und führen zur Bildung von L-konfigurierten Alkoholen. Die B-Typ Kettoreduktasen haben zwischen Position 93-95 ein charakteristisches Leucin-Asparaginsäure-Asparaginsäure (LDD)-Motiv und zusätzlich an Position 144 ein konserviertes Prolin sowie an Position 148 ein konserviertes Aspargin. B-Typ Kettoreduktasen führen zur Bildung von D-konfigurierten Alkoholen (Schema 19).⁹⁹

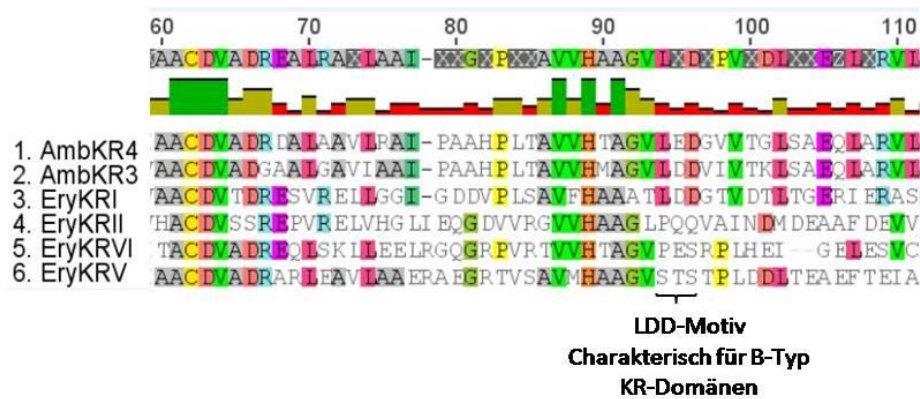


Abbildung 13: Alignment der Ketoreduktase-Domänen AmbKR3 und AmbKR4 aus dem Ambruticin-Biosyntheseweg mit repräsentativen Ketoreduktase-Domänen aus dem Erythromycin-Biosyntheseweg. Das Alignment wurde mittels Geneious 7.1.5 erstellt.

Durch Vergleich der Aminosäuresequenz der Ketoreduktase-Domäne AmbKR3 mit den sehr gut untersuchten Ketoreduktase-Domänen aus dem Erythromycin-Biosyntheseweg¹⁰¹ konnte die Stereochemie der Hydroxy-Funktion an C-3 der Substrate vorausgesagt werden. AmbKR3 weist das charakteristische LDD-Motiv an Position 93-95 auf und gehört somit zur Gruppe der B-Typ Ketoreduktasen (Abbildung 13). Hieraus ergibt sich eine D-Konfiguration für die β -Hydroxy-Funktion.

Die Konfiguration der Methylgruppe an C-6 der Substratsurrogate kann nicht anhand des von REEVES *et al.* postulierten Ambruticin-Biosynthesewegs vorhergesagt werden. Im Postulat findet zwischen Modul 3 und Modul 4 aus unbekanntem Gründen eine Invertierung dieses Stereozentrums statt (Abbildung 4).

Ergänzend zu den Studien von CAFFREY und REID konnten KALESSE *et al.* eine bioinformatische Methode etablieren, mit der bei Kenntnis der Stereochemie des sekundären Alkohols die Stereochemie der α -Verzweigung in Polyketiden vorhergesagt werden kann. Die Methode basiert auf der Analyse von bekannten Ketoreduktase-Domänen, welche sich anhand von spezifischen Aminosäuresequenzen in vier Unterklassen teilen lassen. In Kombination mit dem stochastischen HIDDEN-MARKOV-Model (HMM)¹⁰² konnten konservierte Regionen in den Proteinfamilien festgelegt werden, anhand derer die Konfiguration der α -Verzweigung vorhergesagt werden kann.¹ Unter Verwendung dieser Methode konnte jedoch keine eindeutige Vorhersage der Stereochemie der Methylgruppen an C-2 und C-6 der Substrate **101-106** getroffen werden.

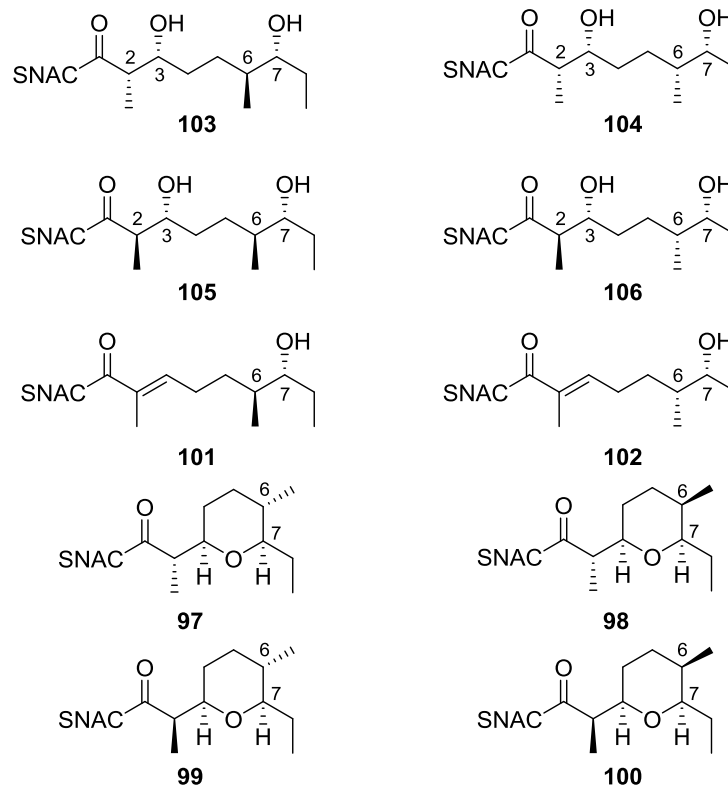
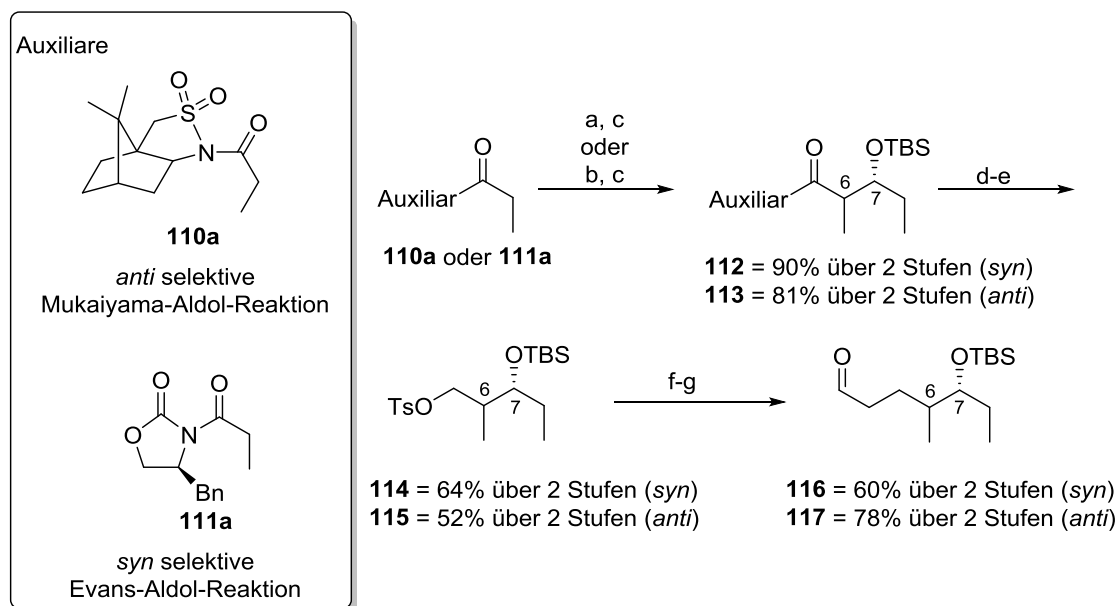


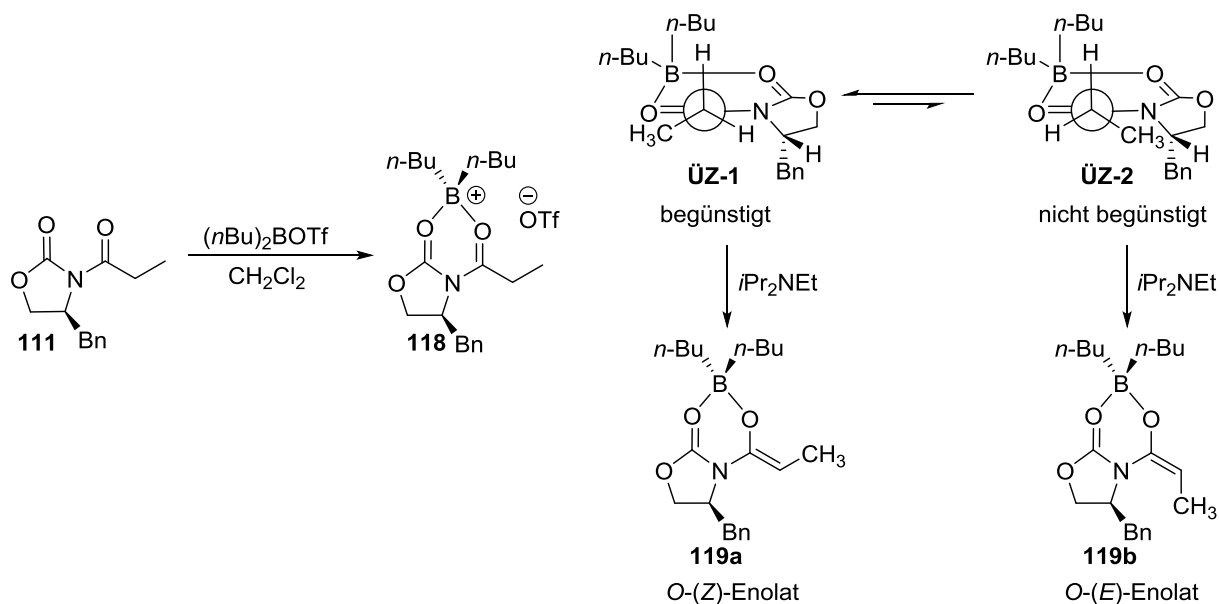
Abbildung 14: Zu synthetisierende Substrate und Referenzverbindungen für die *in vitro* Untersuchung der Dehydratase-Domäne AmbDH3.

Durch die unbekannte Konfiguration der Methylgruppen an C-2 und C-6 ergeben sich sechs mögliche Vorläufermoleküle **101-106** (Abbildung 14). Zur vollständigen biochemischen Untersuchung von AmbDH3 sollten die verschiedenen Stereoisomere **101-106** durch eine möglichst einfache und breit anwendbare Syntheseroute zugänglich gemacht werden. Da eine Unterscheidung zwischen den α,β -ungesättigten Substraten **101** und **102** und den korrespondierenden THP-Ring enthaltenden Produkten **97**, **98**, **99** und **100** massenspektrometrisch nicht möglich ist, sollten die Referenzverbindungen **97/99** und **98/100** für die spätere Auswertung der *in vitro* Aktivitätstests synthetisiert werden. Anhand dieser ist eine genaue Zuordnung der erhaltenen Produkte über die Retentionszeit und ^1H NMR-Spektroskopie möglich. Zusätzlich kann durch die Bereitstellung der vier synthetisch hergestellten Produkte **97/99** und **98/100** eine eindeutige Aussage über die Stereochemie des gebildeten Produktes im Ambruticin-Biosyntheseweg getroffen werden.



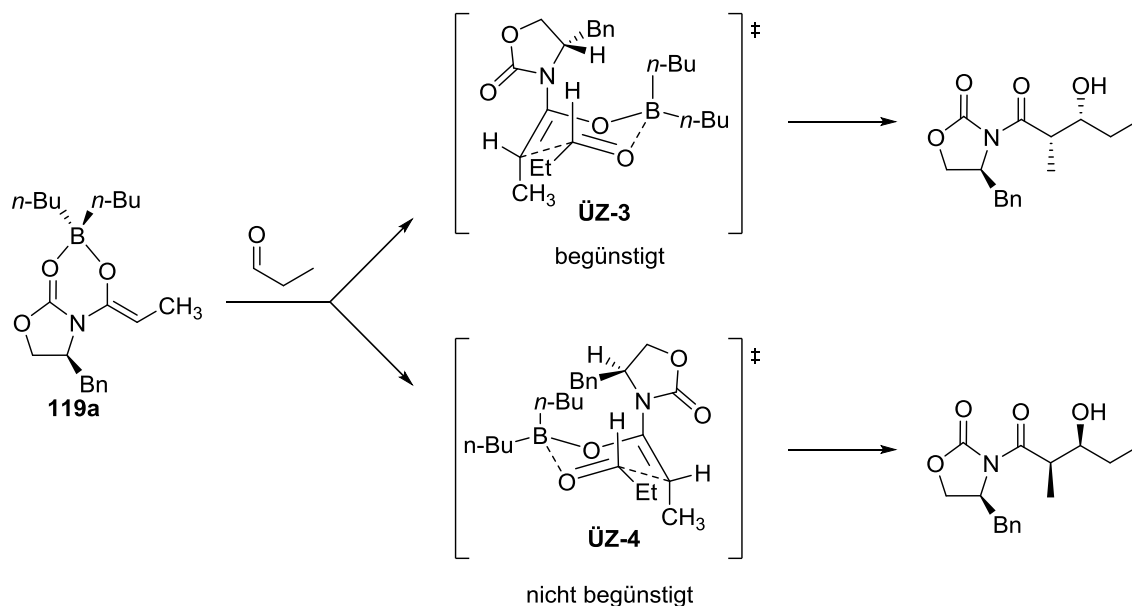
Schema 20: Synthese der Vorläufer-Aldehyde **116** und **117**. Bedingungen: a) **110a**, NEt_3 , TMSOTf , $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, TiCl_4 , CH_2Cl_2 , -78°C auf 0°C , 1.5 h; b) **111a**, $n\text{Bu}_2\text{BOTf}$, DIPEA , $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, CH_2Cl_2 , 0°C auf -78°C , 3 h; c) 2,6-Lutidin, TBSOTf , CH_2Cl_2 , -78°C auf RT, über Nacht; d) LiBH_4 , $\text{Et}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (20:1), 0°C , über Nacht; e) TsCl , Pyridin, CH_2Cl_2 , 0°C auf RT, 96 h; f) Allylmagnesiumbromid, Et_2O , 45°C , 3 h; g) O_3 , PPh_3 , CH_2Cl_2 , -78°C , 10 min. Die Nummerierung ist bezogen auf die finalen Produkte. Die in Klammern angegebene Konfiguration bezieht sich auf die relative Stereochemie der Stereozentren an C-6 und C-7.

Über sechs Stufen ausgehend von Propionaldehyd konnte Aldehyd **116** bzw. **117** synthetisiert werden (Schema 20). Bereits im ersten Schritt der Syntheseroute wurde die Stereochemie an C-6 und C-7 selektiv durch eine Aldol-Reaktion eingeführt. Eine *syn*-selektive EVANS-Aldol-Reaktion unter Verwendung des propionierten (4*S*)-EVANS-Auxiliars **111a** mit anschließender TBS-Schützung lieferte **112** in guten Ausbeuten. Zur Generierung des Produkts **113** wurde eine *anti*-selektive MUKAIYAMA-Aldol-Reaktion unter Verwendung des propionierten OPPOLZER-Auxiliars **110a** mit anschließender TBS-Schützung durchgeführt. Sowohl das EVANS- als auch das OPPOLZER-Auxiliar wurden im nächsten Schritt reduktiv unter Verwendung von LiBH_4 abgespalten und der erhaltene primäre Alkohol anschließend zum Tosylat **114** bzw. **115** umgesetzt. Die nachfolgende Substitutionsreaktion mit Allylmagnesiumbromid ergab die entsprechenden terminalen Alkene, welche direkt durch Ozonolyse zu den korrespondierenden Aldehyden **116** bzw. **117** umgesetzt wurden.



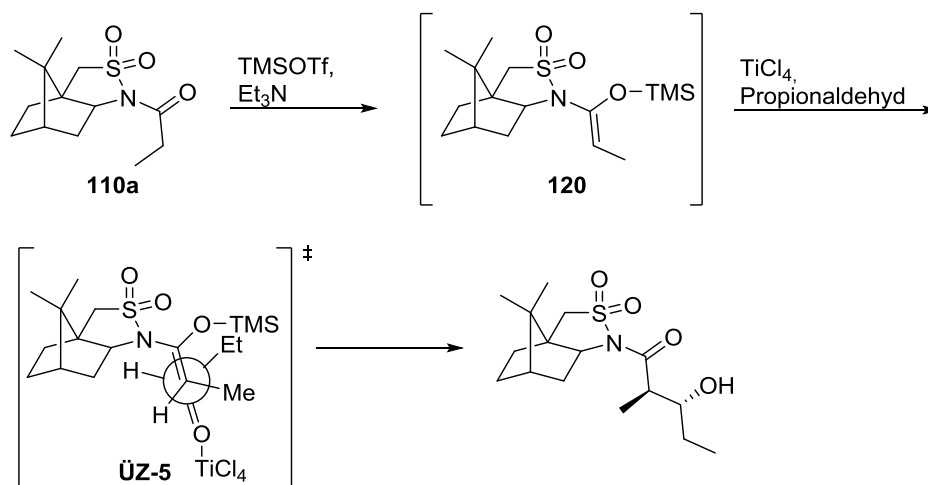
Schema 21: Selektive Darstellung des *O*-(*Z*)-Borenolats durch Verwendung von $n\text{Bu}_2\text{BOTf}$ und $i\text{Pr}_2\text{NEt}_2$.¹⁰³

Bei der EVANS-Aldol-Reaktion kommt es zunächst unter Verwendung von $n\text{Bu}_2\text{BOTf}$ in Kombination mit $i\text{Pr}_2\text{NEt}$ zur Ausbildung des *O*-(*Z*)-Enolats **119a**. Dass die Bildung des *O*-(*Z*)-Enolats gegenüber der Bildung des *O*-(*E*)-Enolats **119b** begünstigt ist, lässt sich aus den Übergangszuständen **ÜZ-1** und **ÜZ-2** ableiten (Schema 21). Der Übergangszustand **ÜZ-1** ist begünstigt, da hier die sterische Abstoßung zwischen der α -ständigen Methylgruppe und dem Benzylsubstituenten des Oxazolidinons am geringsten ist. Durch die Geometrie des Enolats wird bereits die relative Stereochemie des Aldol-Produktes festgelegt. Im Fall des hier gebildeten *O*-(*Z*)-Enolats wird das gewünschte *syn*-Produkt erhalten.



Schema 22: Mechanismus der *syn*-selektiven EVANS-Aldol-Reaktion.¹⁰³

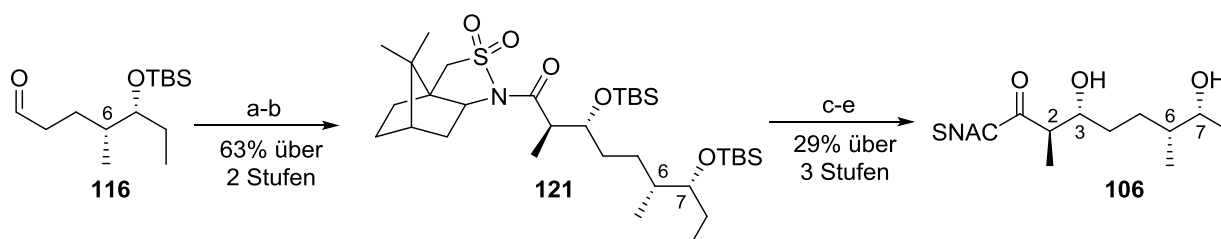
Die absolute Konfiguration des Produkts kann durch den ZIMMERMANN-TRAXLER Übergangszustand erklärt werden (Schema 22). Um die Dipol-Dipol-Abstoßung zwischen dem Enolat-Sauerstoff und dem Oxazolidinon-Carbonylsauerstoff minimal zu halten, sind beide zueinander entgegengesetzt orientiert. In der Theorie ist die Ausbildung der zwei gezeigten Übergangszustände **ÜZ-3** und **ÜZ-4** möglich. Allerdings ist der Übergangszustand **ÜZ-3** gegenüber dem Übergangszustand **ÜZ-4** favorisiert, da hier die Benzylgruppe sterisch günstig vom gebildeten pseudo-Sechsring wegorientiert ist und nicht wie bei dem Übergangszustand **ÜZ-4** in den Halbraum des gebildeten pseudo-Sechsrings ragt. Ausgehend vom Übergangszustand **ÜZ-3** wird selektiv das gewünschte *syn*-Produkt erhalten.¹⁰³



Schema 23: Mechanismus der *anti*-selektiven MUKAIYAMA-Aldol-Reaktion unter Verwendung des OPPOLZER-Auxiliars.¹⁰⁴

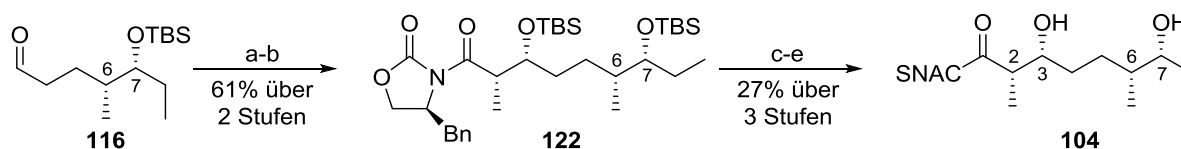
Bei der gewählten MUKAIYAMA-Aldol-Reaktion unter Verwendung des OPPOLZER-Auxiliars handelt es sich um eine *anti*-selektive Reaktion. Hierbei wird zunächst das propionierte OPPOLZER-Sultam **110a** mit NEt_3 und TMSOTf zum (*Z*)-Ketenacetal **120** umgesetzt. Der nukleophile *si*-Seitenangriff aus der α -Position des (*Z*)-Ketenacetals am Carbonyl-Kohlenstoffatom vom Propionaldehyd verläuft über den offenen Übergangszustand **ÜZ-5**. In diesem weist die mit TiCl_4 aktivierte Carbonylgruppe den größten sterischen Anspruch auf, so dass diese sich *anti*-ständig zum Silylether des Ketenacetals orientiert. Die Ethylgruppe des Aldehyds stellt die nächst größere Seitenkette dar und orientiert sich *anti*-ständig zum OPPOLZER-Sultam (Schema 23). Die absolute Konfiguration ergibt sich durch den *si*-Seitenangriff des Ketenacetals am Aldehyd und führt zum gewünschten Produkt.¹⁰⁴

Ausgehend von Aldehyd **116** oder **117** sind die benötigten Substrate für die biochemische Charakterisierung von AmbDH3 über unterschiedliche Syntheserouten zugänglich. Im nachfolgenden werden diese exemplarisch für die Substratsurrogate und Referenzverbindungen mit (6*L*,7*D*)-Konfiguration gezeigt.



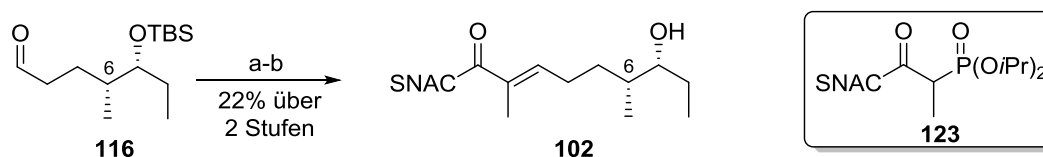
Schema 24: Darstellung des β -Hydroxythioesters **106** über eine *anti*-selektive MUKAIYAMA-Aldol-Reaktion unter Verwendung des OPPOLZER Auxiliars. Bedingungen: a) **110a**, NEt_3 , TMSOTf, TiCl_4 , CH_2Cl_2 , -78°C auf 0°C , 1.5 h; b) 2,6-Lutidin, TBSOTf, CH_2Cl_2 , -78°C auf RT, über Nacht; c) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, H_2O_2 (35%ig), $\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$ (3:1), 0°C auf RT, über Nacht; d) HSNAC, EDC·HCl, 4-DMAP, CH_2Cl_2 , 0°C auf RT, über Nacht; e) PPTS, MeOH, 50°C , 96 h.

Über die MUKAIYAMA-Aldol-Reaktion unter Verwendung des pOPPOLZER-Auxiliars sollten die Stereozentren an C-2 und C-3 *anti*-selektiv aufgebaut werden. Durch Reaktion des propionierten OPPOLZER-Auxiliars (**110a**) mit Aldehyd **116** und anschließender TBS-Schützung konnte **121** in moderaten Ausbeuten erhalten werden. Unter Verwendung von *in situ* erzeugtem LiOOH wurde das OPPOLZER-Auxiliar abgespalten und die so erhaltene freie Carbonsäure direkt in den entsprechenden SNAC-Thioester überführt. Zur Generierung des β -Hydroxy-SNAC-Thioesters **106** wurden die beiden sekundären Hydroxy-Funktionen in einem Schritt unter Verwendung von PPTS entschützt (Schema 24).



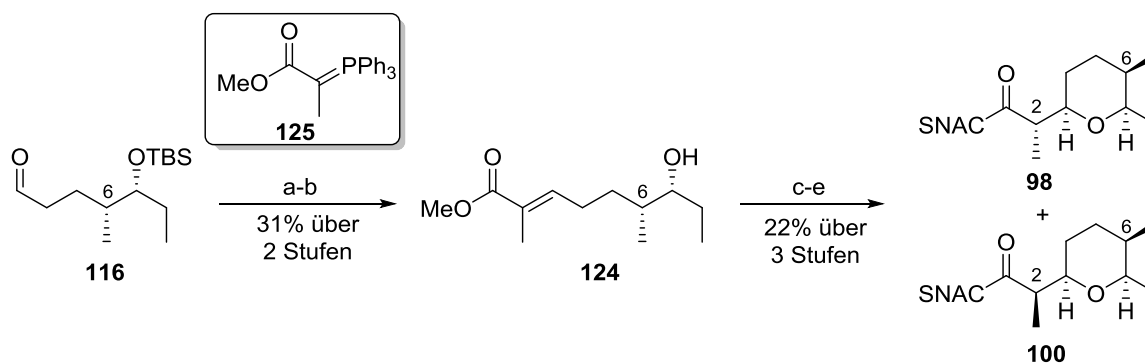
Schema 25: Darstellung des β -Hydroxythioesters **104** über eine *syn*-selektive EVANS-Aldol-Reaktion. Bedingungen: a) **111a**, $n\text{Bu}_2\text{BOTf}$, DIPEA, CH_2Cl_2 , 0°C auf -78°C , 3 h; b) 2,6-Lutidin, TBSOTf, CH_2Cl_2 , -78°C auf RT, über Nacht; c) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, H_2O_2 (35%ig), $\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$ (3:1), 0°C auf RT, über Nacht; d) HSNAC, EDC·HCl, 4-DMAP, CH_2Cl_2 , 0°C auf RT, über Nacht; e) PPTS, MeOH, 50°C , 96 h.

Zur Etablierung der *syn*-Konfiguration zwischen der Methylgruppe an C-2 und der Hydroxyfunktion an C-3 wurde die EVANS-Aldol-Reaktion gewählt. Ausgehend vom propionierten (4S)-EVANS-Auxiliar (**111a**) und Aldehyd **116** und nach anschließender TBS-Schützung konnte **122** in Ausbeuten von 61% über zwei Stufen erhalten werden. Über die bereits beschriebene Reaktionskaskade, bestehend aus der Abspaltung des EVANS-Auxiliars zur freien Säure, anschließender Veresterung zum SNAC-Thioester und der direkt folgenden TBS-Entschützung der beiden sekundären Hydroxy-Funktionen konnte **104** generiert werden (Schema 25).



Schema 26: Darstellung des α,β -ungesättigten Thioesters **102** über eine (*E*)-selektive HWE-Reaktion. Bedingungen: a) **123**, DBU, THF, 0°C auf RT, über Nacht; b) PPTS, MeOH, 50°C , 24 h.

Über eine (*E*)-selektive HORNER-WADSWORTH-EMMONS (HWE) Reaktion unter Verwendung des stabilisierten Phosphonats **123** und anschließender TBS-Entschützung mit PPTS konnte das α,β -ungesättigten Substrat **102** ausgehend von Aldehyd **116** synthetisiert werden (Schema 26).



Schema 27: Synthese der Referenzverbindungen **98** und **100** über eine basen-induzierte Oxa-MICHAEL-Addition. Bedingungen: a) **125**, CH_2Cl_2 , RT, über Nacht; b) PPTS, MeOH, 50°C , 24h; c) *t*-BuOK, CH_2Cl_2 , 0°C , 4 h, d)

LiOH·H₂O, MeOH:H₂O (3:1), 0 °C auf RT, über Nacht; e) HSNAC, EDC·HCl, 4-DMAP, CH₂Cl₂, 0 °C auf RT, über Nacht.

Zum Aufbau des THP-Rings wurde eine basen-induzierte Oxa-MICHAEL-Addition der C-7 Hydroxy-Funktion an das olefinische System gewählt. Die Synthese der Referenzmoleküle **98** und **100** konnte nicht durch einen direkten Zugang ausgehend von dem α,β -ungesättigten SNAC-Thioester **102** verwirklicht werden, da unter basischen Bedingungen nur eine Zersetzung des Edukts zu beobachten war. Deshalb wurde der Umweg über den Methylester **124** gewählt. Dieser konnte über eine (*E*)-selektive WITTIG-Reaktion von Aldehyd **116** mit dem stabilisierten Phosphorylid **124** und anschließender TBS-Entschützung gewonnen werden. Eine *t*-BuOK vermittelte Oxa-MICHAEL-Addition zum Aufbau des THP-Rings lieferte ein Diastereomergemisch an C-2. Die Hydrolyse des Methylester und anschließende Veresterung mit HSNAC ergab ein C-2-Epimerengemisch. Die C-2-Epimere **98** und **100** wurden über präparative Umkehrphasen-HPLC voneinander separiert.

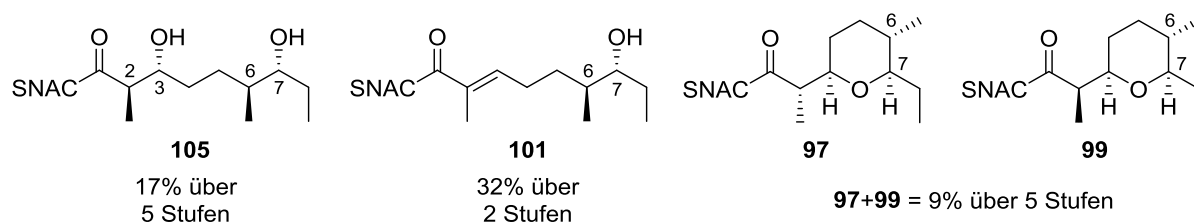


Abbildung 15: Synthetisierte Substratsurrogate **105** und **101** und Referenzverbindungen **97** und **99** mit (6D,7D)-Konfiguration. Die Ausbeuten sind angegeben ausgehend von Aldehyd **117**.

Die Synthese der Substratsurrogate **105** und **101** und der Referenzverbindungen **97** und **98** mit (6D,7D)-Konfiguration erfolgte analog zu den beschriebenen Syntheserouten ausgehend von Aldehyd **117** (Abbildung 15).

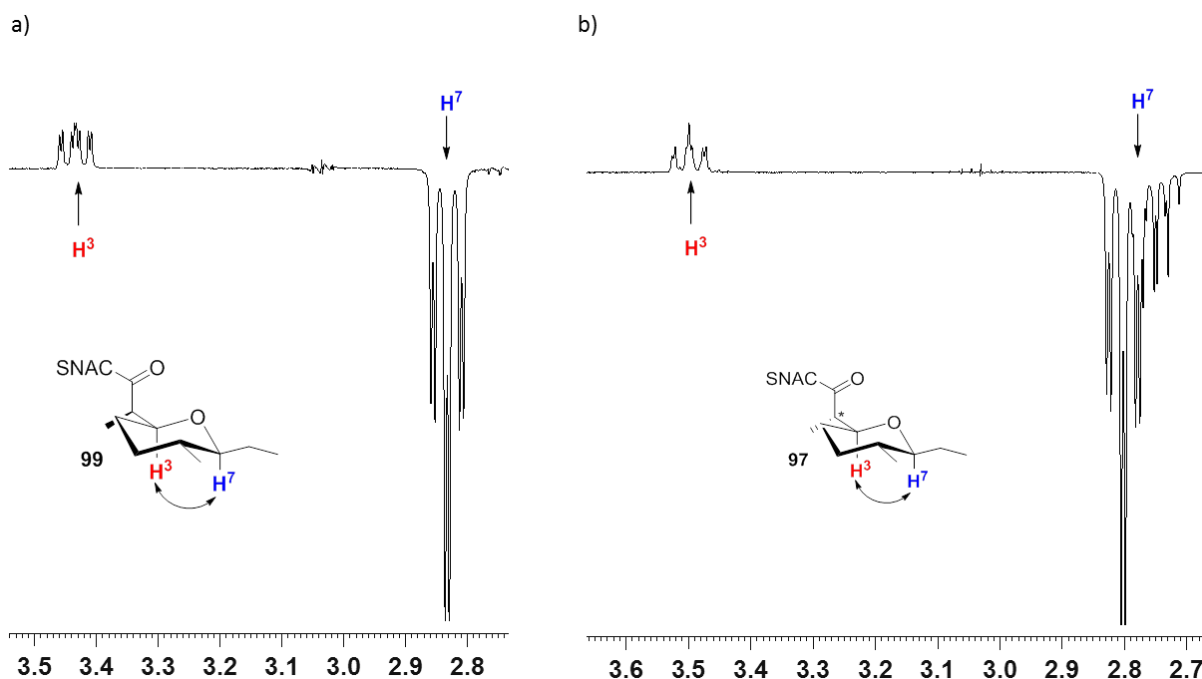


Abbildung 16: a) Ausschnitt aus dem 1D-NOE-Spektrum der Verbindung **99** mit Sättigung bei 2.83 ppm; b) Ausschnitt aus dem 1D-NOE-Spektrum der Verbindung **97** mit Sättigung bei 2.80 ppm. Die NOE-Spektren wurden bei 400 MHz in CDCl_3 aufgenommen.

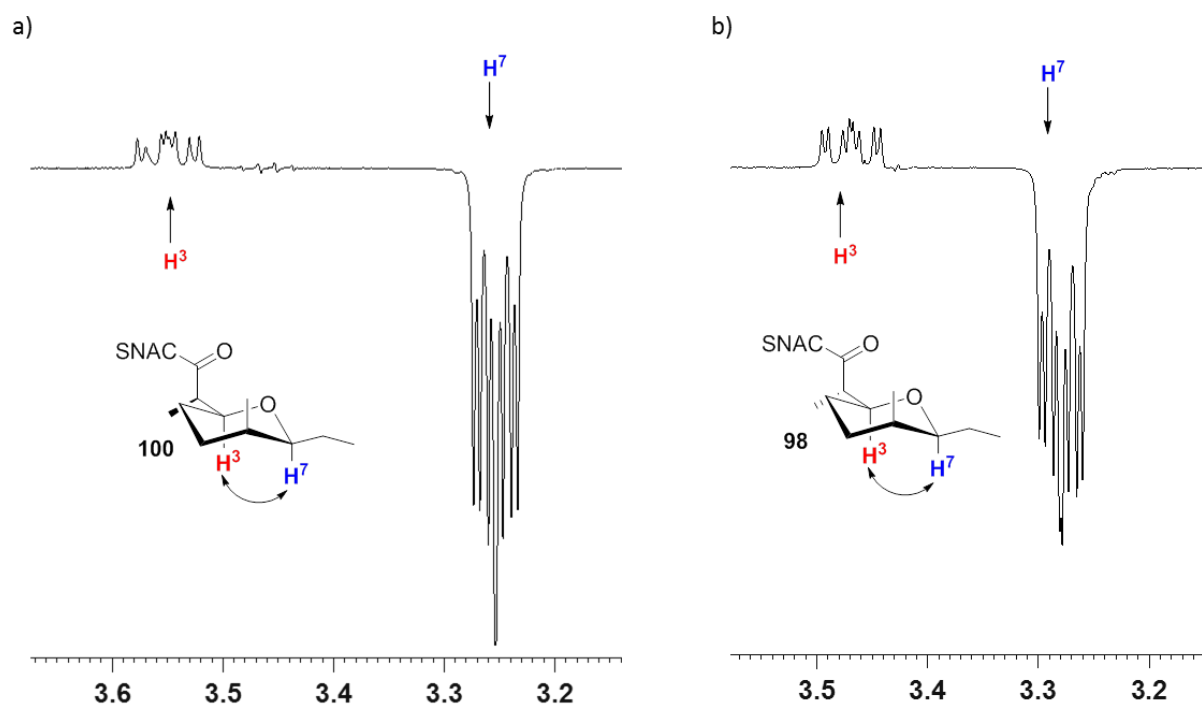


Abbildung 17: a) Ausschnitt aus dem 1D-NOE-Spektrum der Verbindung **100** mit Sättigung bei 3.25 ppm; b) Ausschnitt aus dem 1D-NOE-Spektrum der Verbindung **98** mit Sättigung bei 3.28 ppm. Die NOE-Spektren wurden bei 400 MHz in CDCl_3 aufgenommen.

Die Konfiguration des neu gebildeten Stereozentrums C-3 am THP-Ring konnte für die vier Referenzmoleküle **97/99** und **98/100** durch 1D-NOE-Experimente aufgeklärt werden. Hierfür wurde jeweils auf das Signal des Protons an C-7 (in blau hervorgehoben) eingestrahlt,

wodurch eine Wechselwirkung mit dem Proton an C-3 (in rot hervorgehoben) resultierte (Abbildung 16 und Abbildung 17). Daraus ergibt sich für alle Referenzmoleküle eine *syn*-Konfiguration der Protonen H-3 und H-7 zueinander. Wie bereits beschrieben, wurde durch die gewählte Aldol-Reaktion die Konfiguration an C-6 und C-7 festgelegt. Hiervon ausgehend und in Kombination mit den NOE-Experimenten ergibt sich eine (3D)-Konfiguration für alle synthetisierten Referenzmoleküle.

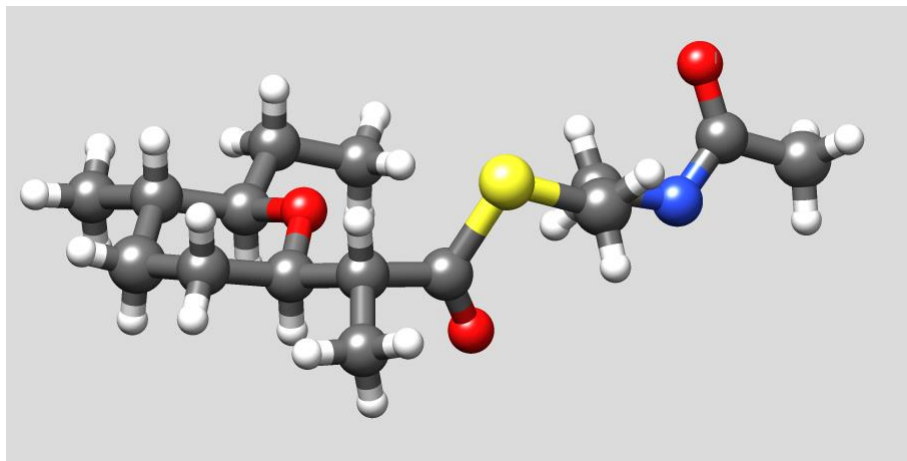


Abbildung 18: Einkristall-Röntgenstrukturanalyse von Verbindung **99**. Die Abbildung wurde erstellt mit UCSF Chimera 1.10.2. Darstellung: gelb: Schwefelatom, rot: Sauerstoffatom, blau: Stickstoffatom, weiß: Wasserstoffatom, grau: Kohlenstoffatom. CCDC 1017520 enthält detaillierte Informationen zur Kristallstruktur (www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif).

Durch Einkristall-Röntgenstrukturanalyse von Verbindung **99** konnte gezeigt werden, dass diese eine (2D,3D)-Konfiguration aufweist (Abbildung 18). Da es sich bei Verbindung **97** um das C-2-Epimer handelt, muss dieses in der (2L,3D)-Konfiguration vorliegen.

3.1.2 Molekularbiologische und enzymologische Arbeiten zur Darstellung der Punktmutante AmbDH3_H51A⁹⁸

Aus vorausgegangenen Studien von KEATINGE-CLAY ist bekannt, dass die katalytische Diade bei Dehydratase-Domänen in der aktiven Tasche aus einem konservierten Histidin und einer konservierten Asparaginsäure besteht (s. Kapitel 1.3).¹⁰⁵ Die Erzeugung einer nicht-aktiven Punktmutante von AmbDH3 für Referenzexperimente sollte über eine nicht synonyme Mutation des katalytisch aktiven Histidins gegen Alanin erfolgen. Mit Hilfe der erzeugten Punktmutante ist es möglich die katalytische Aktivität der AmbDH3-Domäne zweifelsfrei nachzuweisen.

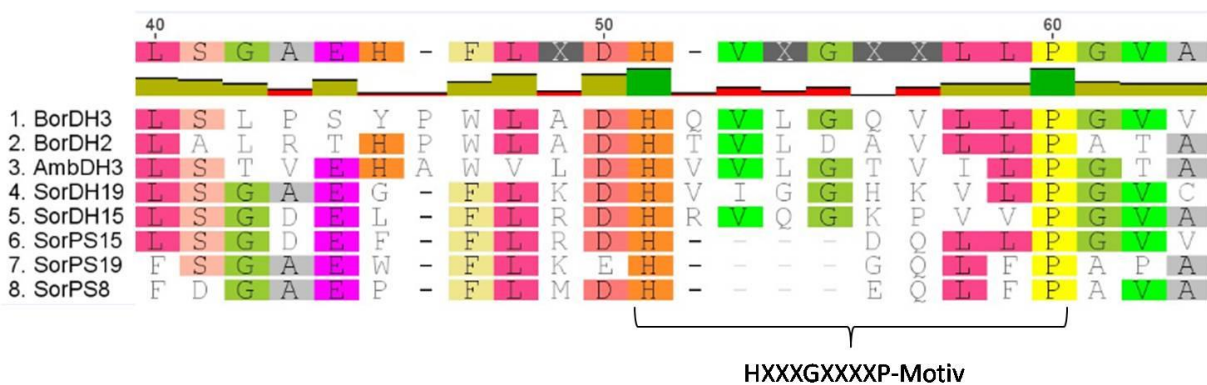
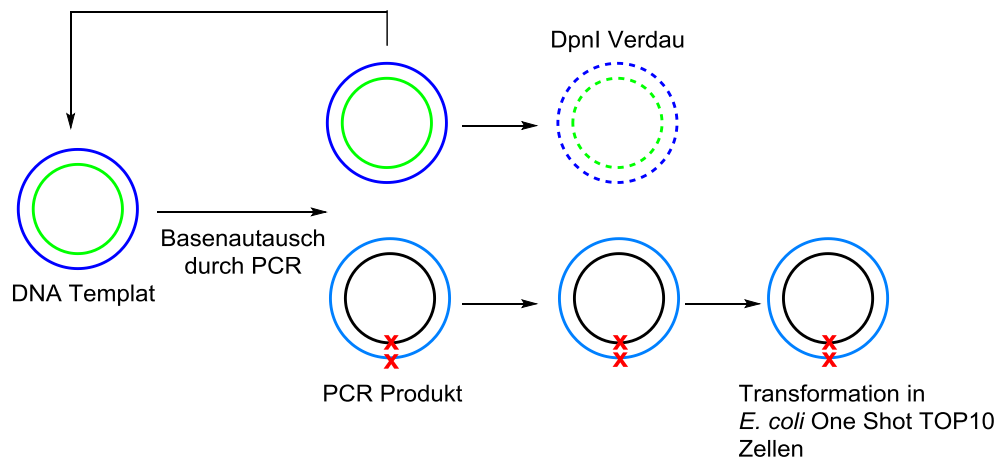


Abbildung 19: Alignment der Dehydratase-Domäne AmbDH3 mit repräsentativen Dehydratase- und Pyransynthase-Domänen aus unterschiedlichen Biosynthesewegen (Bor: Borrelidin, Sor: Sorangicin, PS: Pyransynthase). Das Alignment wurde mittels Geneious 7.1.5 erstellt.

Durch Alignments der Dehydratase-Domäne AmbDH3 mit repräsentativen Dehydratase- und Pyransynthase-Domänen aus dem Borrelidin-¹⁰⁶ und dem Sorangicin-Biosyntheseweg⁵⁰ konnte das katalytische Histidin an Position 51 in einem charakteristischen konservierten HX3GX4P-Motiv ermittelt werden (Abbildung 19). Für die Darstellung der Punktmutante H51A wurden zunächst Oligonukleotide entworfen (Tabelle 5) um die für Histidin codierende Basensequenz (CAT) in die für Alanin codierende Basensequenz (GCA) zu mutieren. Bei den Oligonukleotiden zur Generierung einer Punktmutante ist zu beachten, dass die neu einzuführenden Basenpaare in der Mitte dieser angesiedelt sind und beide Seiten von 10-15 Basenpaaren der korrekten DNA-Sequenz flankiert sind.



Schema 28: Allgemeines Schema zur Generierung einer Punktmutante durch PCR-Amplifizierung ausgehend von einem Plasmid.

Die PCR zur Erstellung der Punktmutante pET28a(+)_{ambDH3}_H51A wurde ausgehend vom Plasmid pET28a(+)_{ambDH3} bei einem Hybridisierungstemperaturgradient von 45.2-57.2 °C mit DMSO-Zusatz durchgeführt (PCR-Programm s. Tabelle 14). Das parentale DNA-Templat wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym DpnI hydrolysiert.

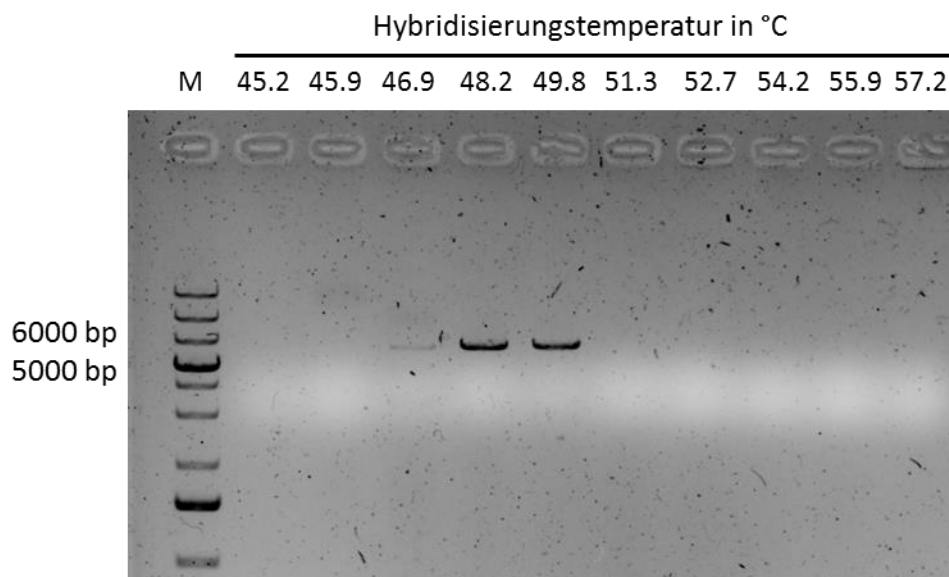


Abbildung 20: Agarosegel (0.7%) unter UV-Licht nach PCR-Amplifizierung zur Darstellung der Punktmutante *ambDH3*_H51A, angefärbt mit Roti®-GelStain. Für Oligonukleotiddetails s. Tabelle 5. pET28a(+)_{ambDH3}_H51A = 6271 bp; M = Marker, GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Thermo Fisher Scientific.

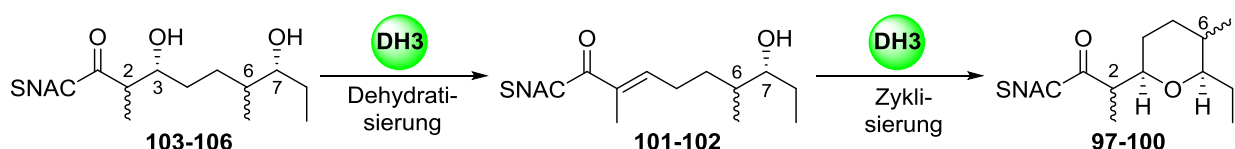
Die Analyse der PCR-Ansätze erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Die Amplifizierung lieferte bei einer Hybridisierungstemperatur von 46.9 °C, 48.2 °C und 49.8 °C das gewünschte Resultat (Abbildung 20, pET28a(+)_{ambDH3}_H51A = 6271 bp). Chemisch kompetente *E. coli* One Shot® TOP10 Zellen wurden mit den erfolgreichen PCR-Ansätze (je 5 µL) transformiert, die erhaltenen Kolonien über Nacht in 2TY-Medium unter

Selektionsdruck (Kanamycin, 50 µg/mL) bei 37 °C kultiviert und die Plasmid DNA durch alkalische Lyse isoliert (Schema 28). Die erfolgreiche Mutation der Basensequenz CAT zu GCA konnte durch DNA-Sequenzierung bestätigt werden.

Für die heterologe Genexpression wurde das Plasmid pET28a(+)_*ambDH3*_H51A in *E. coli* BL21(DE3) Zellen transformiert. Die Induktion der Expression erfolgte mit 0.1 mM IPTG und die anschließende Kultivierung bei 25 °C für 16 h. Nach Zellaufschluss wurde das erhaltene His₆-Fusionsprotein über Ni-NTA gereinigt und nach Pufferwechsel zu HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.8) direkt in den Enzymaktivitätstests eingesetzt.

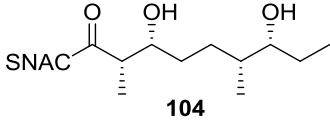
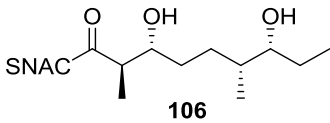
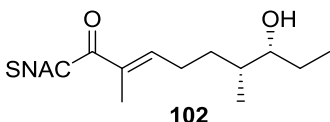
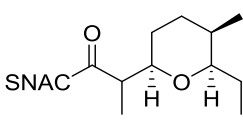
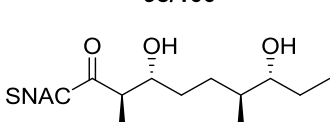
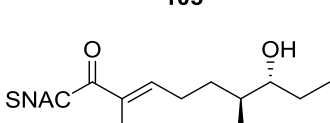
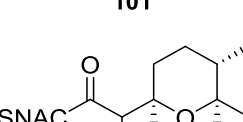
3.1.3 Enzymaktivitätstests⁹⁸

Die Charakterisierung der Dehydratase-Domäne AmbDH3 aus dem Ambruticin-Biosyntheseweg erfolgte durch *in vitro* Aktivitätstest bestehend aus dem gereinigten His₆-Fusionsprotein AmbDH3 (Molekulargewicht ca. 34 kDa) und den synthetischen Substratanaloga **101-106**. In einer vorausgegangen Masterarbeit konnten bereits die optimalen heterologen Genexpressionsbedingungen für His₆-AmbDH3 ausgehend vom Plasmid pET28a(+)_*ambDH3* etabliert werden und die Reinigung mittels Ni-NTA erfolgreich durchgeführt werden.¹⁰⁷ Die Auswertung der Enzymaktivitätstests erfolgte nach extraktiver Aufarbeitung mittels HPLC-MS- und ¹H NMR-Analytik.



Schema 29: Zu untersuchende, durch AmbDH3 katalysierte, Dehydratisierungs-Zyklisierungs-Kaskade

Tabelle 1: Übersicht der durchgeführten Enzymaktivitätstests mit der Dehydratase-Domäne AmbDH3 und den zugehörigen Kontrollexperimenten.

Eintrag	Substrat	Zugefügtes Enzym			
		AmbDH3	-	+BorDH3	AmbDH3_H51A
1	-	✓	✗	✗	✗
2	 104	✓	✓	✗	✗
3	 106	✓	✓	✗	✗
4	 102	✓	✓	✗	✗
5	 98/100	✗	✓	✗	✗
6	 105	✓	✓	✓	✓
7	 101	✓	✓	✓	✓
8	 97/99	✓	✓	✗	✗

Ein Haken bedeutet, dass die Enzymaktivitätstests in der angegebenen Kombination durchgeführt wurden. Ein Kreuz bedeutet, dass die Enzymaktivitätstests in der angegebenen Kombination nicht durchgeführt wurden. Alle Enzymaktivitätstest und die zugehörigen Kontrollexperimente erfolgten bei 37 °C in HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.8).

In Tabelle 1 ist eine Übersicht der durchgeführten Enzymaktivitätstest und den zugehörigen Kontrollexperimenten gezeigt. Alle Substratsurrogate, einschließlich der jeweiligen Referenzverbindung, wurden mit dem frisch hergestellten und gereinigten His₆-Fusionsprotein AmbDH3 im HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.8) über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend extraktiv aufgearbeitet und per HPLC-MS analysiert (Tabelle 1, 2-8, Spalte 3). Zusätzlich zu den Enzymaktivitätstests wurde jedes Substrat über

Nacht bei 37 °C in reinem HEPES-Puffer inkubiert, um eine spontane Reaktion auszuschließen (Tabelle 1, 2-8, Spalte 4). Für die Substrate **101** und **105** wurden zusätzlich noch Kontrollexperimente mit der charakterisierten Dehydratase-Domäne BorDH3^{106,108} und der Punktmutante AmbDH3_H51A unter Aktivitätstestbedingungen durchgeführt (Tabelle 1, 6 und 7, Spalte 5 und 6). Zusätzlich wurde gereinigtes His₆-AmbDH3 ohne Substrat über Nacht unter den Standardbedingungen (37 °C, 16 h) in HEPES-Puffer inkubiert um Hintergrundsignale identifizieren zu können (Tabelle 1, Eintrag 1, Spalte 1).

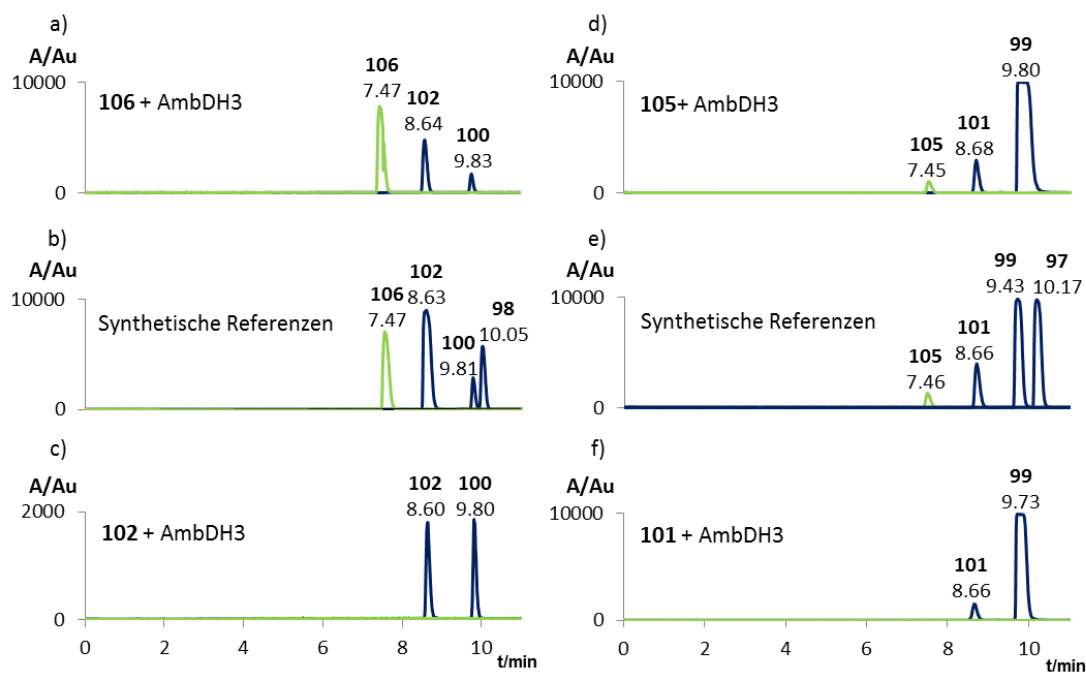


Abbildung 21: HPLC-MS-Analyse der *in vitro* Enzymaktivitätstests mit dem His₆-AmbDH3 Fusionsprotein nach extraktiver Aufarbeitung mit EtOAc. a) Über Nacht Inkubation von **106** mit His₆-AmbDH3; b) Synthetische Referenzverbindungen **106**, **102** und **98/100**, die einzelnen Massenspektren wurden in einem Diagramm kombiniert; c) Über Nacht Inkubation von **102** mit His₆-AmbDH3; d) Über Nacht Inkubation von **105** mit His₆-AmbDH3; e) Synthetische Referenzverbindungen **105**, **101** und **97/99**, die einzelnen Massenspektren wurden in einem Diagramm kombiniert; f) Über Nacht Inkubation von **101** mit His₆-AmbDH3. Für unprozessierte HPLC-MS-Spektren s. Anhang 7.2. Enzymaktivitätstestbedingungen: HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.8), 37 °C, 300 Upm, Proteinkonzentration: 5.0-5.4 mg/mL, Substratkonzentration: 5 mM.

In Abbildung 21a sind die Ergebnisse der Umsetzung von **106** mit AmbDH3 gezeigt. Bei der Inkubation konnte keine Umsetzung zur α,β -ungesättigten Verbindung **104** beobachtet werden. Ausschließlich der (2D,3D)-konfigurierte Thioester **106** ($t_R = 7.47$ min) wurde durch AmbDH3 zu **102** ($t_R = 8.64$ min) dehydratisiert und anschließend stereoselektiv zum THP-Ring **100** ($t_R = 9.83$ min) zyklisiert. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit vorherigen Studien in denen gezeigt wurde, dass Dehydratasen eine hohe Substratspezifität bezüglich der C-2- und C-3-Konfiguration aufweisen.¹⁰⁶ Beim Vergleich der Retentionszeiten der Produkte aus den

Enzymaktivitätstests mit den synthetischen Proben ist zu erkennen, dass die beiden gebildeten hydrophoberen Produkte mit den synthetischen Standards **102** und **100** zeitgleich eluieren (Vergleich Abbildung 21a und b).

Um nachzuweisen, dass es sich beim Zwischenprodukt **102** gleichzeitig auch um ein Substrat für AmbDH3 handelt, wurde dieses einzeln mit His₆-AmbDH3 über Nacht inkubiert. In Abbildung 21c ist zu erkennen, dass hierbei ebenfalls stereoselektiv der THP-Ring **100** ($t_R = 9.80$ min) gebildet wurde. Obwohl es sich bei Dehydratase-Domänen katalysierten Reaktionen im Allgemeinen um Gleichgewichtsreaktionen handelt, konnte keine Rehydratisierung zur β -Hydroxyverbindung beobachtet werden. Hieraus lässt sich schließen, dass das Gleichgewicht stark auf der Seite des zyklisierten Produktes liegt.

Bei der Inkubation von **105** mit His₆-AmbDH3 (Abbildung 21d) konnte ebenfalls die Umsetzung zur α,β -ungesättigten Verbindung **101** ($t_R = 8.68$ min) beobachten werden, welche direkt stereoselektiv zum THP-Ring **99** ($t_R = 9.80$ min) zyklisiert wurde. Auffällig ist hierbei, dass nur noch Spuren des Startmaterials **105** und des Zwischenprodukts **101** detektierbar sind. Die direkte Umsetzung von **101** mit AmbDH3 (Abbildung 21f) verlief annähernd vollständig zu **99**. Eine Rehydratisierung zur β -Hydroxyverbindung konnte nicht detektiert werden.

Aus den gezeigten Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Dehydratase-Domäne AmbDH3 sowohl Substrate mit (6L,7D)- als auch mit (6D,7D)-Konfiguration akzeptiert, allerdings mit deutlicher Präferenz für die (6D,7D)-konfigurierten Substrate. Somit ist es höchstwahrscheinlich, dass es sich bei den AmbACP3-gebundenen Formen der Substratsurrogate **101** und **105** um die vorkommenden Intermediate der Biosynthese handelt.

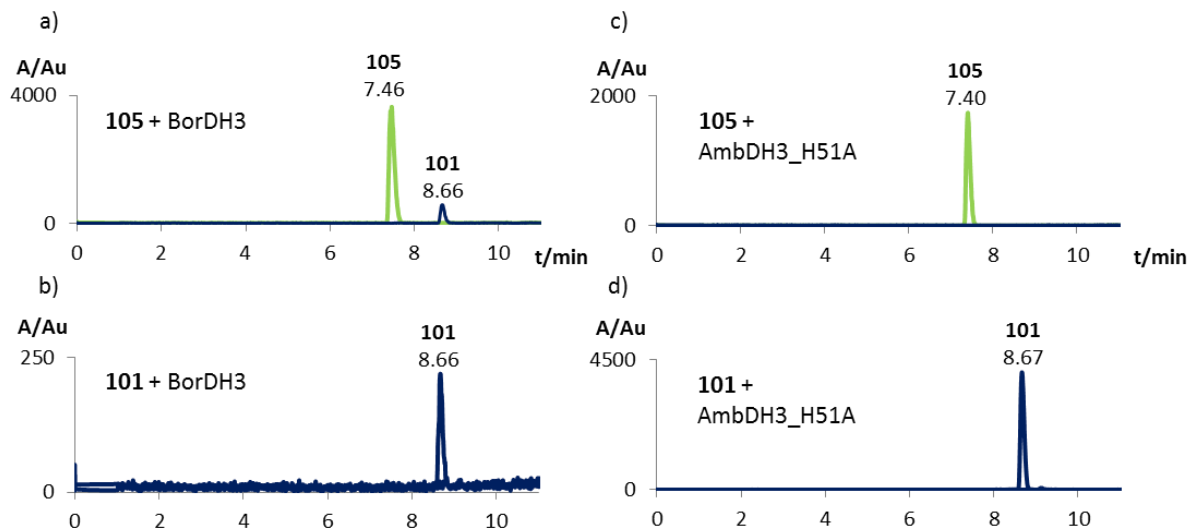


Abbildung 22: HPLC-MS-Analyse der *in vitro* Kontrolleexperimente nach extraktiver Aufarbeitung mit EtOAc. a) Über Nacht Inkubation von **105** mit His₆-BorDH3; b) Über Nacht Inkubation von **101** mit His₆-BorDH3; c) Über Nacht Inkubation von **105** mit His₆-AmbDH3_H51A; d) Über Nacht Inkubation von **101** mit His₆-AmbDH3_H51A. Für unprozessierte HPLC-MS-Spektren s. Anhang 7.2. Enzymaktivitätstestbedingungen: HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.8), 37 °C, 300 Upm, Proteinkonzentration BorDH3: 2 mg/mL, Proteinkonzentration AmbDH3_H51A: 3.5 mg/mL, Substratkonzentration: 5 mM.

Um die festgestellte Aktivität direkt AmbDH3 zuzuordnen wurden die Substrate **105** und **101** mit der charakterisierten Dehydratase-Domäne BorDH3 unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Für diese wurde ebenfalls eine Spezifität für 2D,3D-konfigurierte Vorläufer nachgewiesen bei gleichzeitig hoher Substrattoleranz bezüglich des polyketidischen Substratanteils.¹⁰⁸ In Abbildung 22a ist die zu erwartende Dehydratisierung von **105** ($t_R = 7.46$ min) zu **101** ($t_R = 8.66$ min) in geringen Mengen zu erkennen. Bei der einzelnen Umsetzung der α,β -ungesättigten Verbindung **101** ($t_R = 8.66$ min) mit BorDH3 (Abbildung 22b) konnte keine Reaktion beobachtet werden.

Um auszuschließen, dass die beobachtete Dehydratisierungs-Zyklisierungs-Kaskade durch Spuren von anderen Proteinen katalysiert wird, wurden die Enzymaktivitätstests mit der Punktmutante AmbDH3_H51A wiederholt. AmbDH3_H51A besitzt eine Mutation (H51A) in der aktiven Tasche, wodurch die Dehydratisierung nicht mehr katalysiert werden kann (s. Kapitel 1.3). Die Gesamtstruktur des Proteins sowie dessen globale Eigenschaften wie molekulare Masse und isoelektrischer Punkt ändern sich dadurch hingegen nur minimal. Bei der Inkubation von **105** ($t_R = 7.40$ min) und **101** ($t_R = 8.67$ min) mit AmbDH3_H51A konnte keine Umsetzung beobachtet werden (Abbildung 22c und Abbildung 22d). Dies zeigt, dass AmbDH3 für die Dehydratisierung verantwortlich ist und die Domäne zusätzlich eine von anderen DH-Domänen nicht geteilte Zyklaseaktivität besitzt.

Um die Stereoselektivität der Domäne zu bestätigen wurden die Enzymaktivitätstests mit den Substraten **105**, **106**, **101** und **102** erneut im semi-präparativen Maßstab wiederholt. Dafür wurden jeweils 8 mg Substrat (Substratkonzentration: 10 mM) mit gereinigtem His₆-AmbDH3 (Proteinkonzentration: 5.0-5.4 mg/mL) über Nacht bei 37 °C inkubiert, anschließend mit EtOAc extrahiert und mittels ¹H NMR-Spektroskopie analysiert.

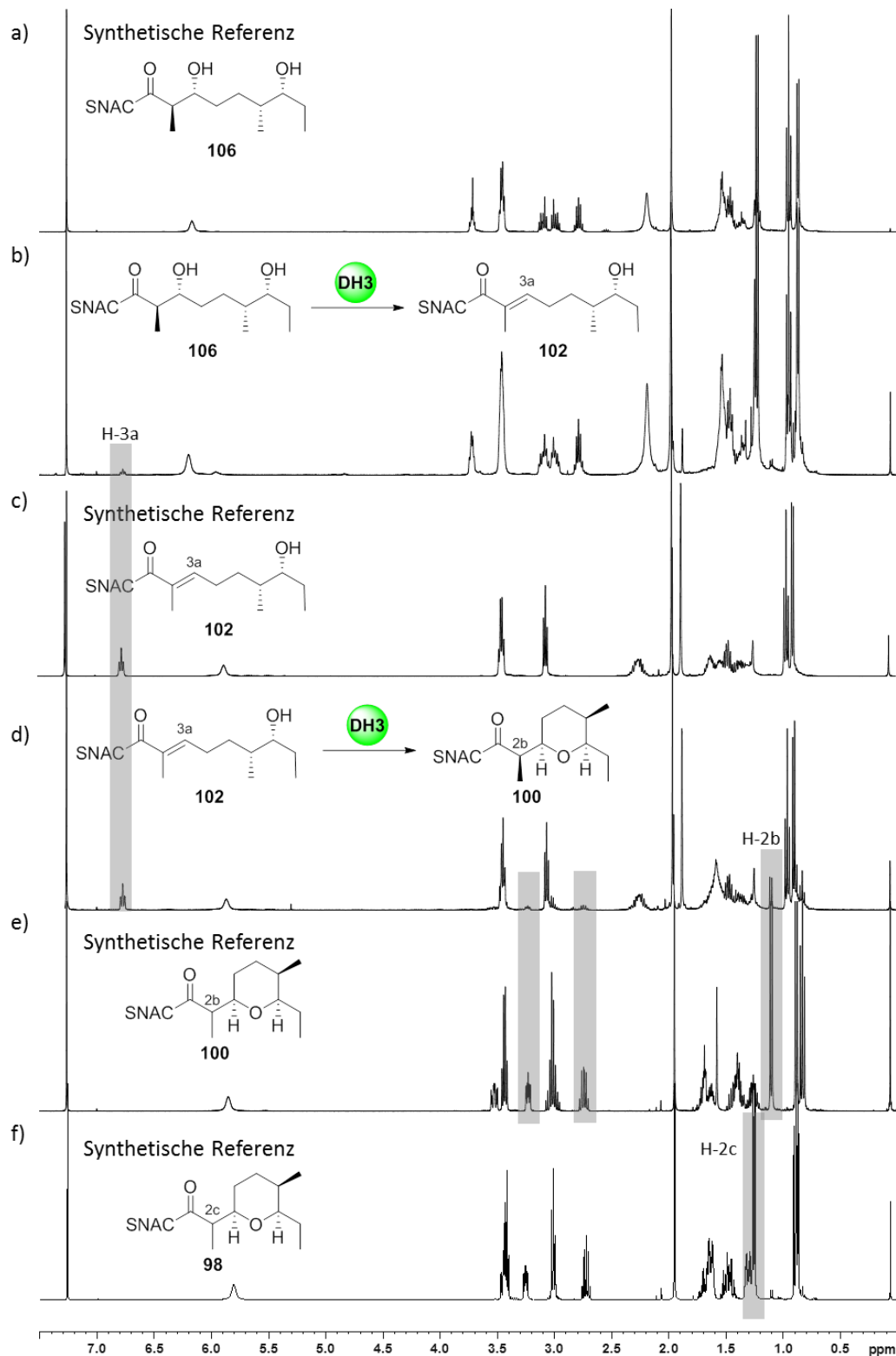


Abbildung 23: ^1H NMR-spektroskopische Analyse der Umsetzung mit His₆-AmbDH3 im semi-präparativen Maßstab. a) Referenzspektrum der synthetischen Verbindung 106; b) Über Nacht Inkubation von 106 mit His₆-AmbDH3; c) Referenzspektrum der synthetischen Verbindung 102; d) Über Nacht Inkubation von 102 mit His₆-AmbDH3; e) Referenzspektrum der synthetischen Verbindung 100; f) Referenzspektrum der synthetischen Verbindung 98. Die charakteristischen Signale sind in grau hervorgehoben. Alle Spektren wurden in CDCl_3 bei 400 MHz aufgenommen.

In Abbildung 23 sind die ^1H NMR-Spektren der Umsetzung von **106** und **102** mit His₆-AmbDH3 im semi-präparativen Maßstab und die zugehörigen Referenzspektren gezeigt. Bei der Inkubation von **106** mit His₆-AmbDH3 sind Spuren des dehydratisierten Produktes (8% Umsatz, kalkuliert anhand des ^1H NMR-Spektrums) detektierbar. Charakteristisch für das gebildete Produkt ist hierbei das Dublett von Triplets bei 6.77 ppm ($J = 1.4, 7.3$ Hz, 3a-H, Abbildung 23b). Bei der Inkubation von **102** mit His₆-AmbDH3 konnte die stereoselektive Zyklisierung mit einem Umsatz von 18% beobachtet werden (kalkuliert anhand des ^1H NMR-Spektrums, Abbildung 23d). Charakteristisch ist hierbei das Dublett bei 1.11 ppm ($J = 7.2$ Hz, 2b-H), anhand dessen die beiden möglichen Produktdiastereomere **100** (1.11 ppm, d, $J = 7.2$ Hz, 2b-H) und **98** (1.26 ppm, d, $J = 7.0$ Hz, 2c-H) eindeutig unterschieden werden können (Abbildung 23e und Abbildung 23f).

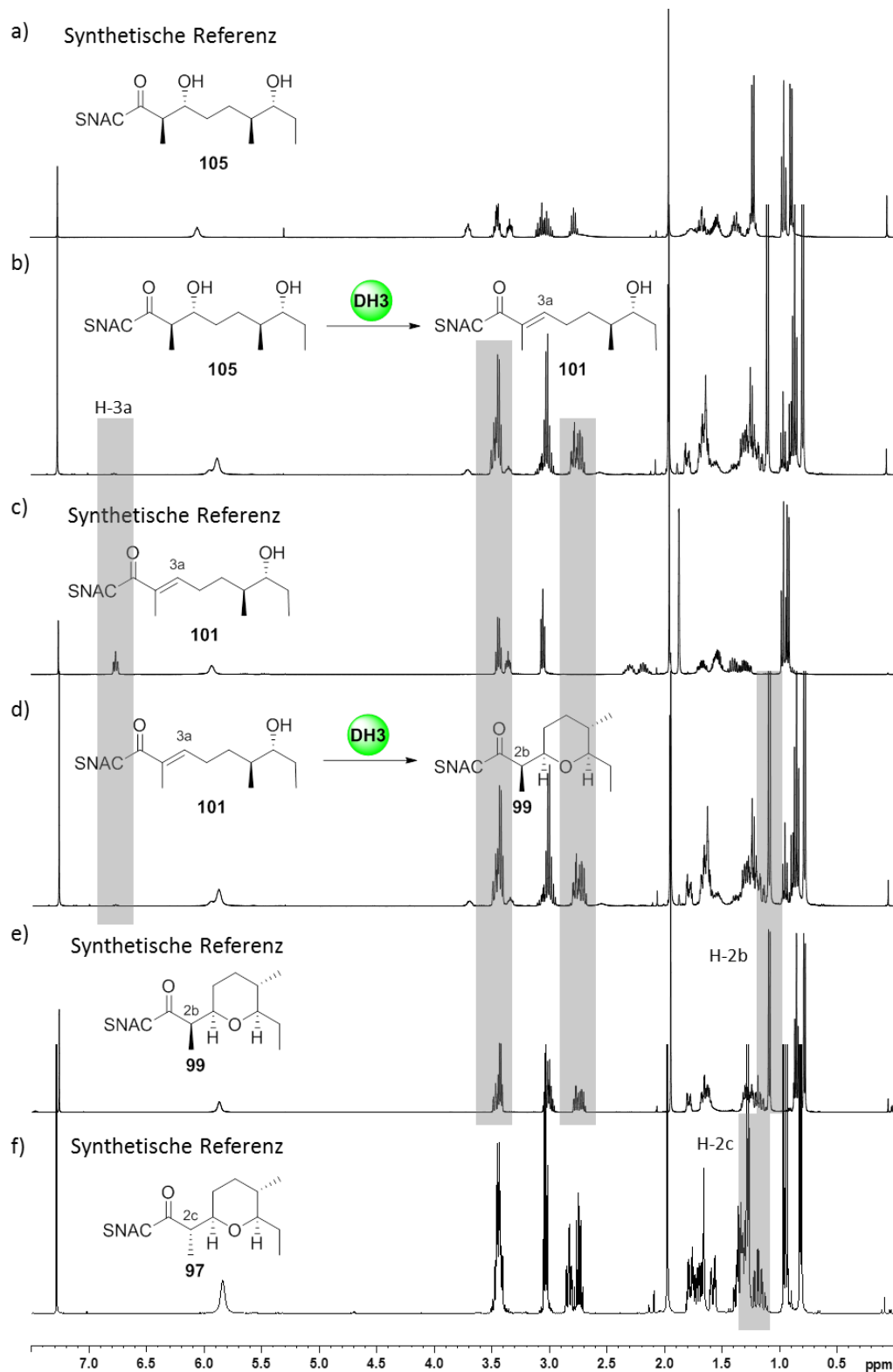


Abbildung 24: ^1H NMR-spektroskopische Analyse der Umsetzung mit His₆-AmbDH3 im semi-präparativen Maßstab. a) Referenzspektrum der synthetischen Verbindung **105**; b) Über Nacht Inkubation von **105** mit His₆-AmbDH3; c) Referenzspektrum der synthetischen Verbindung **101**; d) Über Nacht Inkubation von **101** mit His₆-AmbDH3; e) Referenzspektrum der synthetischen Verbindung **99**; f) Referenzspektrum der synthetischen Verbindung **97**. Die charakteristischen Signale sind in grau hervorgehoben. Alle Spektren wurden in CDCl_3 bei 400 MHz aufgenommen.

In Abbildung 24 sind die ^1H NMR-Spektren der enzymatischen Umsetzung von **105** und **101** mit His₆-AmbDH3 im semi-präparativen Maßstab gezeigt. Sowohl bei Inkubation von **105** als auch bei der Inkubation von **101** mit His₆-AmbDH3 konnte eine annähernd vollständige Umsetzung zum zyklisierten Produkt **99** beobachtet werden (Abbildung 24b und Abbildung 24d). Anhand der ^1H NMR-Spektren ergibt sich ausgehend von **105** ein Umsatz von 76% und ausgehend von **101** von 87% (kalkuliert anhand der ^1H NMR-Spektren) zum Produkt. Auch hier lassen sich die beiden möglichen zyklisierten Produkte eindeutig durch die Dubletts bei 1.09 ppm ($J = 7.6$ Hz, 2b-H) oder bei 1.28 ppm ($J = 7.2$ Hz, 2c-H) unterscheiden (Abbildung 24e und Abbildung 24f).

Die erhaltenen Ergebnisse aus den semi-präparativen Enzymaktivitätstests sind für alle untersuchten Substrate im Einklang mit den Ergebnissen aus den analytischen Untersuchungen. Die Domäne AmbDH3 weist neben der klassischen Dehydratase-Aktivität noch eine zusätzliche Zyklase-Aktivität auf. Basierend auf den sehr guten Umsätzen im semi-präparativen Maßstab bei Inkubation von **105** und **101** und der hohen Stereoselektivität der katalysierten Zyklisierung, bietet sich eine Weiterentwicklung der Enzymaktivitätstests von AmbDH3 an, um dessen Nutzbarkeit als chemoenzymatisches Werkzeug für die stereoselektive Synthese von Heterozyklen zu untersuchen.

Im Rahmen einer laufenden Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. WULF BLANKENFELDT vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung werden zur Zeit strukturgeleitete Mutagenesestudien zur Verbesserung der Stabilität von AmbDH3 durchgeführt.

Bei AmbDH3 handelt es sich wie in den *in vitro* Untersuchungen gezeigt um eine ungewöhnliche Dehydratase-Domäne mit zusätzlicher Zyklaseaktivität. Ein zentraler Punkt ist deshalb die Aufklärung des ablaufenden Mechanismus der katalysierten Dehydratisierungs-Zyklisierungs-Kaskade und die Identifizierung der am Mechanismus beteiligten Aminosäuren.

Basierend auf strukturellen Überlegungen wurde eine Aminosäure (V173) im aktiven Zentrum identifiziert, welche vermeintlich am Zyklisierungsprozess beteiligt sein könnte. Für die Verifizierung dieser Annahme wurde das vermeintlich katalytisch aktive Valin zu Alanin (V173A) oder Tyrosin (V173Y) mutiert. Die generierten Punktmutanten wurden heterolog in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert, die erhaltenen löslichen Fusionsproteine mittels Affinitätschromatographie isoliert und *in vitro* mit den Substraten **105** und **101** bei 37 °C

über Nacht umgesetzt. Nach extraktiver Aufarbeitung erfolgte die Analyse mittels Massenspektrometrie.

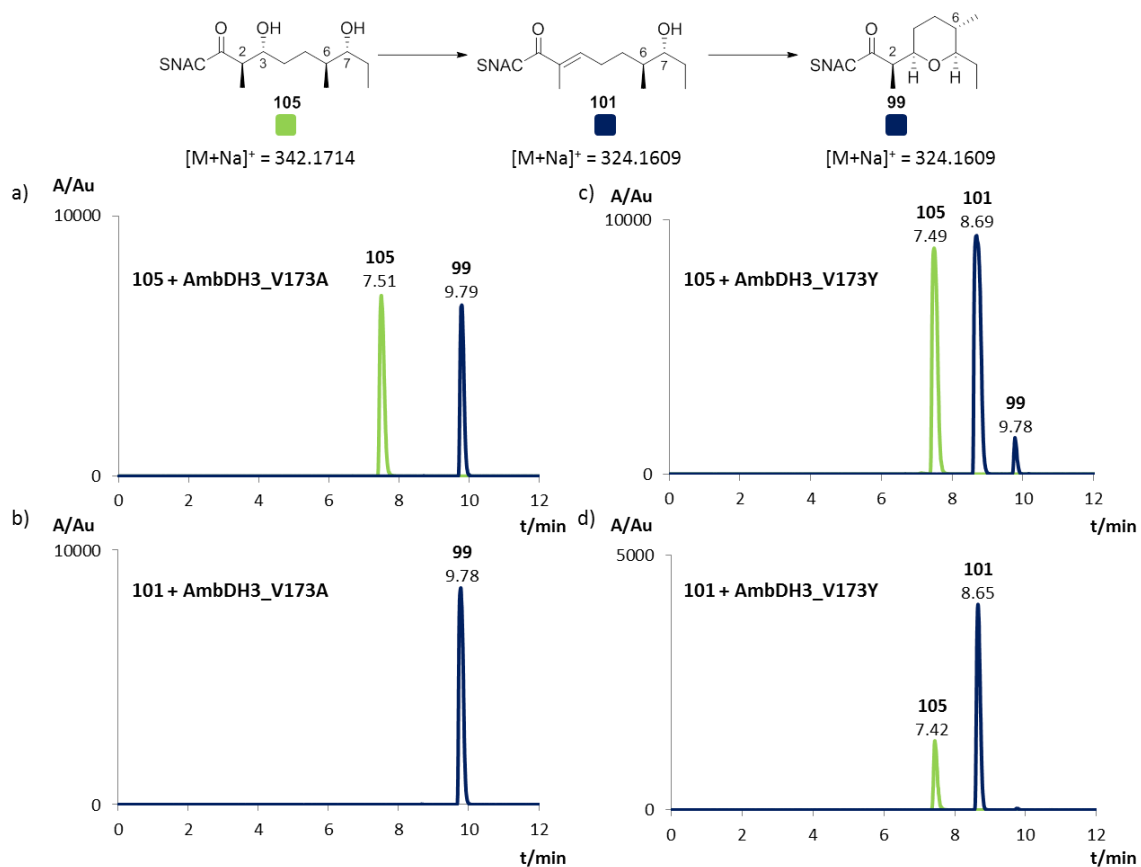


Abbildung 25: HPLC-MS-Analyse der *in vitro* Umsetzung von **105** und **101** mit His₆-AmbDH3_V173A und His₆-AmbDH3_V173Y nach extraktiver Aufarbeitung mit EtOAc. a) Über Nacht Inkubation von **105** mit His₆-AmbDH3_V173A; b) Über Nacht Inkubation von **101** mit His₆-AmbDH3_V173A; c) Über Nacht Inkubation von **105** mit His₆-AmbDH3_V173Y; d) Über Nacht Inkubation von **101** mit His₆-AmbDH3_V173Y. Für unprozessierte HPLC-MS-Spektren s. Anhang 7.2. Enzymaktivitätstestbedingungen: HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.8), 37 °C, 300 Upm, Proteinkonzentration His₆-AmbDH3_V173A: 2.2 mg/mL, Proteinkonzentration His₆-AmbDH3_V173A: 2.5 mg/mL, Substratkonzentration: 5 mM.

Die Umsetzung von **105** und **101** mit den Fusionsproteinen His₆-AmbDH3_V173A zeigte, dass die Mutation von Valin gegen Alanin scheinbar keinen Einfluss auf die Zyklaseaktivität von AmbDH3 hat. His₆-AmbDH3_V173A katalysiert sowohl die Dehydratisierung als auch die Zyklisierung. Interessanterweise konnte bei der Umsetzung von **105** mit His₆-AmbDH3_V173A nur die Ausgangsverbindung **105** bei einer Retentionszeit von 7.51 min und das zyklisierte Produkt **99** bei einer Retentionszeit von 9.79 min detektiert werden. Das α,β -ungesättigte Intermediat konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 25a). Die Inkubation von **101** mit His₆-AmbDH3_V173A führte zur vollständigen Umsetzung zu **99** mit einer Retentionszeit von 9.78 min (Abbildung 25b).

Bei Inkubation von **105** mit His₆-AmbDH3_V173Y konnte sowohl die Ausgangsverbindung ($t_R = 7.49$ min), als auch das α,β -ungesättigte Intermediat ($t_R = 8.69$ min) und das zyklisierte Produkt ($t_R = 9.78$ min) detektiert werden (Abbildung 25c). Die Zyklisierung zum THP-Ring beinhaltenden Produkt scheint durch die Mutation von Valin zu Tyrosin stark unterdrückt zu werden. Bei der Umsetzung von **105** mit His₆-AmbDH3_V173Y wird nach wie vor die Bildung von **99** katalysiert, aber in deutlich geringeren Mengen als mit dem nativen AmbDH3.

Bei der Inkubation von **101** mit dem Fusionsprotein His₆-AmbDH3_V173Y konnte neben der Ausgangsverbindung **101** bei einer Retentionszeit von 8.65 min ebenfalls die hydratisierte Verbindung **105** bei einer Retentionszeit von 7.42 min detektiert werden. Die Zyklisierung scheint in diesem Fall durch die Mutation vollständig unterdrückt zu werden (Abbildung 25d).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Valin an Position 173 eine wichtige Rolle im Zyklisierungsmechanismus spielen könnte. Ob dieses allein verantwortlich für die Initiierung der Zyklisierung ist oder ob noch weitere Aminosäuren beteiligt sind, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht gesagt werden. Dafür sollten weitere Punktmutationen im aktiven Zentrum des Enzyms erzeugt werden. Die Aufklärung der Kristallstruktur von AmbDH3 und den entsprechenden Punktmutanten würden zusätzlich zum besseren Verständnis der katalysierten Reaktionen beitragen.

3.2 Studien zur biosynthetischen Rolle der Dehydratase-Domäne AmbDH4 und der C-Methyltransferase AmbM

Das Ambruticin-Ostfragment besteht aus einem Dihydropyranring, welcher mit einer 1,4-Dienyl-Seitenkette verknüpft ist. Solche nicht-konjugierten Diensysteme stellen ein selten anzutreffendes Strukturmotiv in Polyketiden dar. Die Installation des verschobenen Doppelbindungssystems erfolgt in der Regel während der PKS-Prozessierung durch ungewöhnliche, nacheinander agierende Dehydratase-Domänen oder sogenannte Verschiebungsmodule (s. Kapitel 1.5). Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nur wenig bekannt über die beteiligten enzymatischen Domänen bzw. Module die während der PKS-Prozessierung zur Etablierung der Doppelbindung in der β,γ -Position führen.

Aus den oben beschriebenen *in vitro* Untersuchungen zu AmbDH3 ist bekannt, dass das Produkt aus Modul 3 **126** des Ambruticin-Biosynthesewegs bereits den THP-Ring beinhaltet.⁹⁸ Daraus resultiert, dass entgegen der Annahme von REEVES *et al.* die Bildung des 1,4-Diensystems unabhängig von der THP-Bildung stattfinden muss. Die für die Elongation verantwortliche Acyltransferase AT4 weist Sequenzmotive auf, die typisch für eine Verlängerung mit Malonyl-CoA sind.^{109,110} Diese Hypothese konnte durch Fütterungsexperimente mit ¹³C-markierten Bausteinen unterstützt werden, in denen eine Acetat- und keine Propionateinheit an der entsprechenden Stelle des Naturstoffs eingebaut wurde.³¹ Hierdurch ergibt sich, dass die α -Methylverzweigung durch die zusätzliche einzelständige C-Methyltransferase AmbM eingebaut werden muss.

Ausgehend von der Polyketidzwischenstufe **127** ergeben sich verschiedene Möglichkeiten zur Einführung der Doppelbindung in der β,γ -Position.

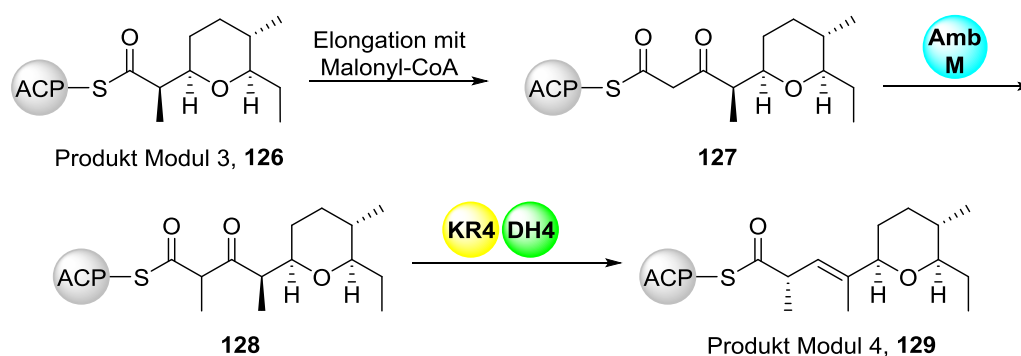


Abbildung 26: Mögliche Reaktionssequenz zur Einführung der β,γ -Doppelbindung in Verbindung **129**.

Die erste mögliche Reaktionssequenz ist in Abbildung 26 gezeigt. Hierbei würde direkt nach der Verlängerung mit Malonyl-CoA die α -Position durch die C-Methyltransferase AmbM methyliert. Anschließend würde die Ketoreduktase-Domäne AmbKR4 die β -Ketoverbindung zur β -Hydroxyverbindung reduzieren, gefolgt von der durch AmbDH4 katalysierten *syn*-Eliminierung von Wasser in der β,γ -Position zu Produkt **129**. Jedoch ist der beschriebene Reaktionsablauf eher unwahrscheinlich, da hier die Frage aufkommt warum der Umweg über die zusätzliche Methylierung durch AmbM gewählt wird und nicht direkt der Einbau von Methylmalonyl-CoA bevorzugt wird.

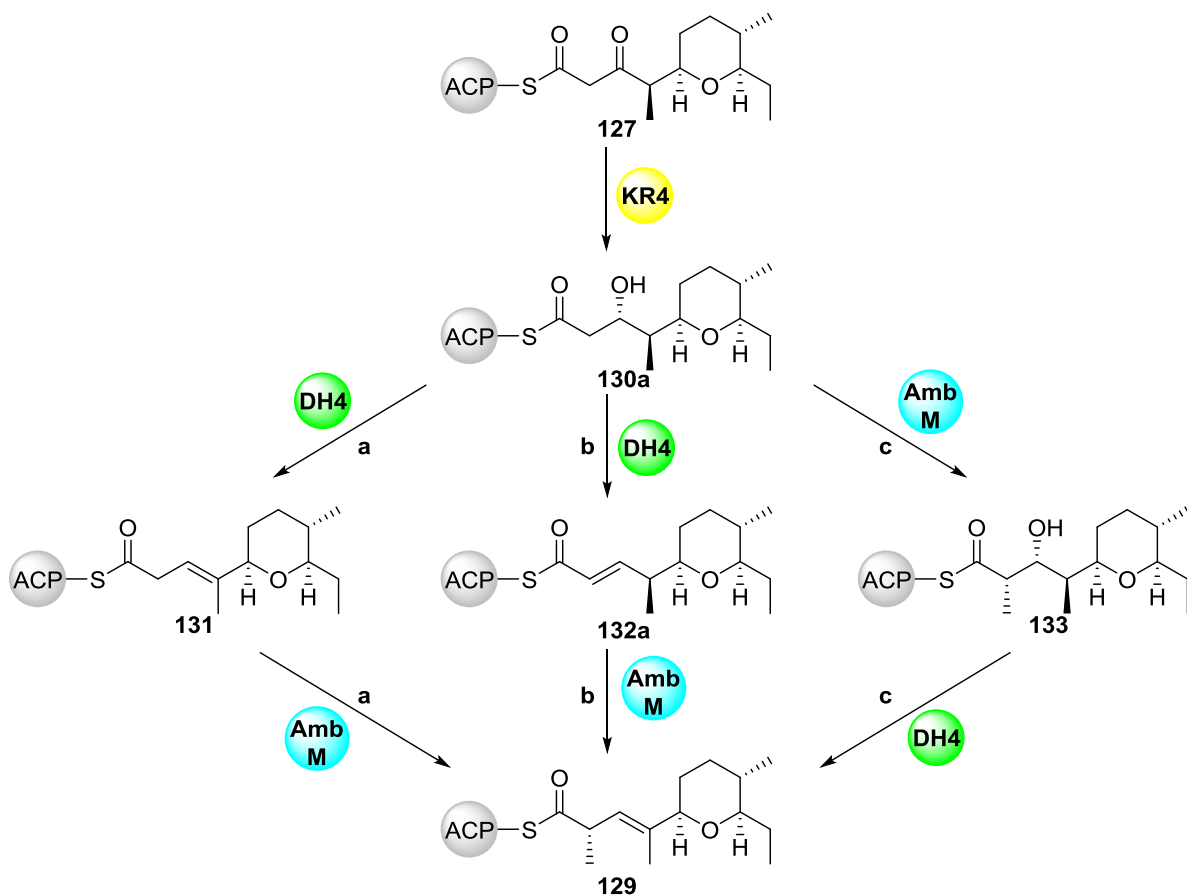


Abbildung 27: Drei mögliche Reaktionspfade zur Generierung der β,γ -ungesättigten Verbindung **129** ausgehend von der β -Hydroxyverbindung **130**.

Alternativ kann AmbKR4 zunächst die Reduktion von Verbindung **127** zur β -Hydroxyverbindung **130** katalysieren. Daraus wiederum ergeben sich drei mögliche Reaktionspfade die zur Zielverbindung **129** führen (Abbildung 27).

Im Reaktionspfad a schließt sich an die Reduktion direkt die β,γ -Dehydratisierung, katalysiert durch AmbDH4, an. Die α -Methylierung der β,γ -ungesättigten Verbindung **131** erfolgt im Anschluss durch AmbM.

Dem Reaktionspfad b folgend, kommt es nach der Reduktion zunächst zur klassischen Dehydratisierung der α,β -Position. Die nachfolgende α -Methylierung führt gleichzeitig zur Verschiebung der Doppelbindung von der thermodynamisch günstigen α,β -Position in die thermodynamisch weniger begünstigte β,γ -Position.

Die letzte denkbare Reaktionskaskade ist in Reaktionspfad c dargestellt. Hierbei kommt es nach der Reduktion zur stereoselektiven α -Methylierung katalysiert durch AmbM. Aus vorausgegangenen Studien ist bekannt, dass Dehydratase-Domänen bevorzugt eine formale *syn*-Dehydratisierung katalysieren (s. Kapitel 1.3). Unter Annahme, dass das Polyketidrückgrat wie in anderen DH-Domänen positioniert ist, wäre dieser Mechanismus nicht möglich. Bedingt dadurch, könnte AmbDH4 nur eine β,γ -Dehydratisierung katalysieren, wodurch direkt Produkt **129** erhalten werden würde.

3.2.1 Synthetische Arbeiten

In Abbildung 26 und Abbildung 27 sind die zahlreichen potentiellen Mechanismen zur Doppelbindungsverschiebung in der Ambruticin-Biosynthese dargestellt. Es wird angenommen, dass AmbDH4 vermeintlich involviert in die thermodynamisch ungünstige Doppelbindungsverschiebung von der α,β - in die β,γ -Position ist, da Modul 4 keine zusätzliche Enoylisomerase (EI)-Domäne aufweist. Basierend auf der Hypothese liegt der Fokus dieser Arbeit auf der *in vitro* Charakterisierung der Dehydratase-Domäne AmbDH4.



Abbildung 28: Alignments der Dehydratase-Domäne AmbDH4 mit repräsentativen Dehydratase- und Enoylisomerase-Domänen aus verschiedenen Biosynthesewegen (Amb: Ambruticin, Bor: Borrelidin¹¹¹, Rhi: Rhizoxin²⁴, Bae: Bacillaen²¹, Sor: Sorangicin⁵⁰, Bry: Bryostatatin⁵¹, Ped: Pederin²³, Cor: Corallopyronin²²). Erstellt mit Geneious 7.1.5.

Alignments der Dehydratase-Domäne AmbDH4 mit repräsentativen Dehydratase- und Enoylisomerase-Domänen (Abbildung 28) aus verschiedenen Biosynthesewegen zeigten, dass AmbDH4 die charakteristischen Sequenzmotive einer Dehydratase, bestehend aus der katalytischen Diade aus Histidin (H51) und Asparaginsäure (D261), aufweist. Das katalytisch aktive Histidin befindet sich in einem konservierten HX8P-Motiv und ist bei Dehydratasen wahrscheinlich für die Deprotonierung der α -Position zuständig.⁵⁹ SCHÄBERLE *et al.* konnten in ihren Studien zur EI-Domäne aus dem Corallopyronin A-Biosyntheseweg zeigen, dass Enoylisomerasen das gleiche katalytisch aktive Histidin (H51) aufweisen, welches bei den Enoylisomerase-katalysierten Reaktionen jedoch für die Doppelbindungsverschiebung verantwortlich ist.⁶⁰ Die katalytisch aktive Asparaginsäure (D261) fungiert während der Dehydratisierung als Säure und wird durch das konservierte Histidin (H265) aktiviert.¹¹² Bei Enoylisomerasen ist die katalytisch aktive Asparaginsäure häufig durch Leucin oder Valin ausgetauscht. KEATINGE-CLAY *et al.* postulierten basierend auf der Kristallstruktur von BaeEI16 in Kombination mit Deuterierungsexperimenten ebenfalls einen Mechanismus zur

Doppelbindungsverschiebung. Hierbei katalysiert ein konformativ flexibles Histidin in der aktiven Tasche des Enzyms die Protonenverschiebung zwischen der α - und γ -Position des PKS-Intermediates.⁵⁹ Diese Ergebnisse unterstützen das Postulat von SCHÄBERLE *et al.*

In der Literatur sind nur wenige Fälle bekannt in denen während der Polyketidbiosynthese die Doppelbindung von der α,β - in die β,γ -Position verschoben wird (s. Kapitel 1.5).

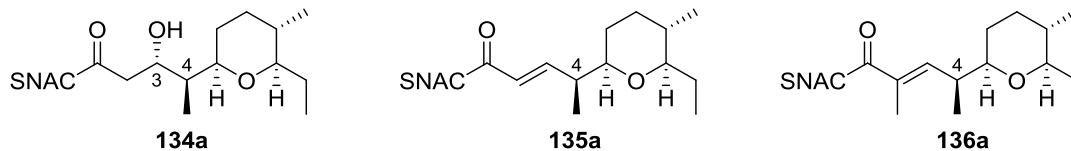
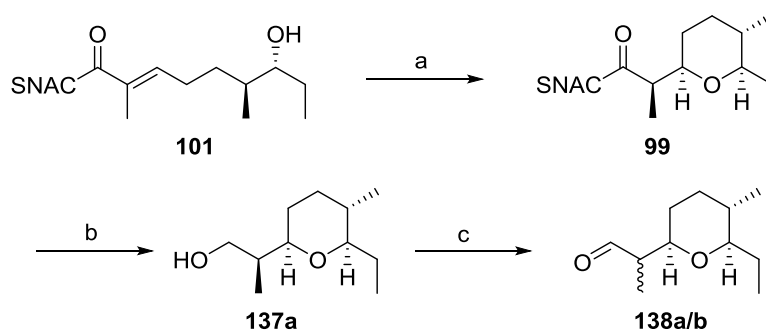


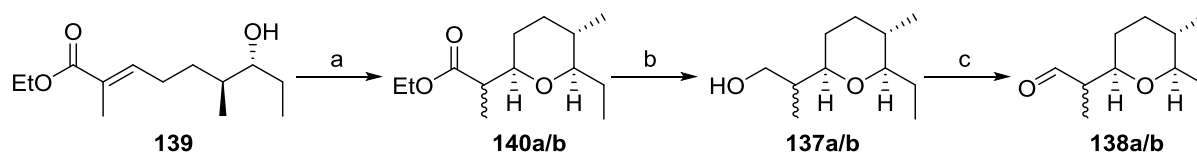
Abbildung 29: Zielmoleküle für die *in vitro* Untersuchung der Dehydratase-Domäne AmbDH4.

Für die *in vitro* Untersuchung der Domäne AmbDH4 sollten die in Abbildung 29 gezeigten Substrate **134a**, **135a** und **136a** synthetisiert werden. Diese Testverbindungen wurden gewählt, weil sie strukturell sehr stark mit den möglichen nativen Vorläufern verwandt sind. Es ist nicht bekannt, ob AmbDH4 zusätzlich zur erwarteten Dehydratase-Aktivität noch weitere katalytische Eigenschaften aufweist. Zur vollständigen biochemischen Charakterisierung sollten deshalb sowohl der β -Hydroxythioester **134a** als auch die α,β -ungesättigte Verbindung **135a** synthetisiert werden. Die Konfiguration der Hydroxy-Funktion an C-3 konnte wie bereits in Kapitel 3.1.1 beschrieben anhand der Aminosäuresequenz der vorausgehenden Ketoreduktase-Domäne AmbKR4 bestimmt werden (s. Abbildung 13). In der Aminosäuresequenz von AmbKR4 ist nicht das charakteristische LDD-Motiv zu finden, sondern das leicht abgewandelte LED-Motiv. Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E) gehören beide zur Klasse der sauren Aminosäuren, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei AmbKR4 um eine B-Typ Ketoreduktase handelt die zur Bildung von D-konfigurierten Alkoholen führt (s. Schema 19). Zusätzlich sollte das α -methylierte Substrat **136a** synthetisiert werden, da die zeitliche Abfolge der AmbM katalysierten α -Methylierung und der Doppelbindungseinführung bzw. -verschiebung nicht bekannt ist.



Schema 30: Diastereoselektive Synthese des Vorläufer-Aldehyds **138a/b**. Bedingungen: a) AmbDH3, HEPES-Puffer (pH 6.8), 37 °C, über Nacht; b) DIBAL-H, CH₂Cl₂, -78 °C auf 0 °C, 5 h, 67%; c) DMP, NaHCO₃, CH₂Cl₂, RT, 1 h, *d.r.*: 3.3:1 (**138a**:**138b**) oder TPAP, NMO, 4Å MS, CH₂Cl₂, 0 °C auf RT, 3 h, *d.r.*: 4.3:1 (**138a**:**138b**).

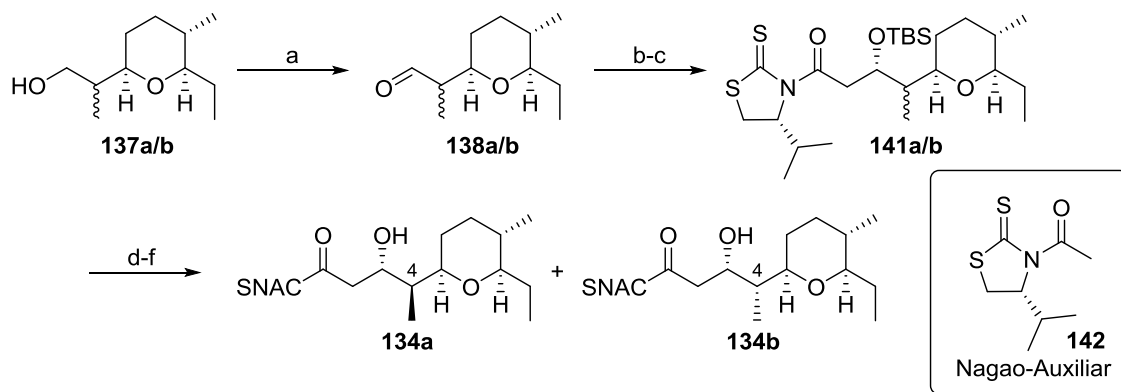
Zunächst wurde versucht die Synthese für die benötigten Substrate **134a**, **135a** und **136a** diastereoselektiv durchzuführen. Hierfür wurde der chemoenzymatische Ansatz unter Verwendung der Domäne AmbDH3 zum stereoselektiven Aufbau des THP-Rings gewählt. Substrat **101** ist ausgehend von propioniertem OPPOLZER-Auxiliar über eine im Rahmen dieser Arbeit etablierte 8-stufige Synthese zugänglich. Der nach Zyklisierung erhaltene SNAC-Thioester **99** wurde in einer Reduktions-Oxidations-Kaskade zum Aldehyd **138a/b** umgesetzt (Schema 30). Die Oxidation des primären Alkohols **137a** zum Aldehyd **138a/b** wurde sowohl mit DESS-MARTIN-Periodinan (DMP) als auch mit Tetrapropylammoniumperruthenat (TPAP) in Kombination mit *N*-Methylmorpholin-*N*-oxid (NMO) durchgeführt. Beide Oxidationsbedingungen führten zur Racemisierung der α -Position und ergaben Aldehyd **138a/b** als Diastereomergemisch. Da die chemoenzymatische Zyklisierung zum Zeitpunkt der Arbeit nicht in größeren Maßstäben als 50 mg durchgeführt werden konnte, wurde für die Herstellung des racemischen Aldehyd-Gemisches die in Schema 31 gezeigte Route verwendet.



Schema 31: Synthese des Vorläufer-Aldehyds **138a/b**. Bedingungen: a) *t*-BuOK, CH₂Cl₂, 0 °C, 4 h, 83%; b) DIBAL-H, CH₂Cl₂, -78 °C auf 0 °C, 4 h, 73%; c) DMP, NaHCO₃, CH₂Cl₂, RT, 1 h.

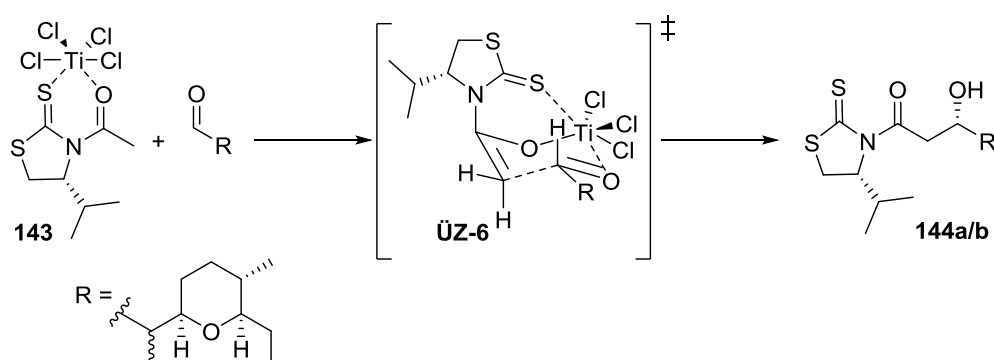
Einen Alternativzugang zum racemischen Gemisch des Aldehyds **138a/b** bietet Verbindung **139**. Die 8-stufige Synthese von **139** ausgehend vom propioniertem OPPOLZER-Auxiliar konnte bereits in den Studien zur *in vitro* Untersuchung der Domäne AmbDH3 etabliert werden. Die basen-induzierte Zyklisierung erfolgte nicht stereoselektiv bezüglich der C-2-Position, so dass

ein Diastereomergemisch von **140a/b** erhalten wurde. Vorteilhaft hierbei ist, dass die basen-induzierte Zyklisierung im Vergleich zur vorgestellten chemoenzymatischen Variante nicht zu einer Limitierung der Ansatzgröße führt. Der Ethylester **140a/b** wurde in einer Reduktions-Oxidations-Kaskade zum Aldehyd **138a/b** umgesetzt (Schema 31).



Schema 32: Synthese der β -Hydroxythioester **134a** und **134b**. Bedingungen: a) DMP, NaHCO_3 , CH_2Cl_2 , RT, 1 h; b) **142**, TiCl_4 , DIPEA, CH_2Cl_2 , -40°C auf -78°C , 30 min; c) 2,6-Lutidin, TBSOTf, CH_2Cl_2 , -78°C auf RT, über Nacht, 27% über 3 Stufen ausgehend von Alkohol **137a/b**; d) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, H_2O_2 , $\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$ (3:1), 0°C auf RT, über Nacht; e) HSNAC, EDC-HCl, 4-DMAP, CH_2Cl_2 , 0°C auf RT, über Nacht, 40% über zwei Stufen; f) PPTS, MeOH, 50°C , 24 h, 43%.

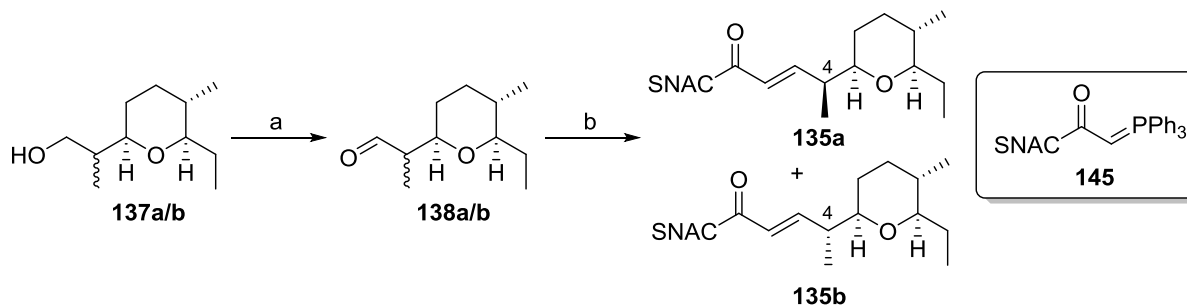
Ausgehend von Aldehyd **138a/b** wurde durch eine Acetat-Aldol-Reaktion nach NAGAO stereoselektiv die Hydroxyfunktion an C-3 aufgebaut und anschließend direkt TBS-geschützt. Das NAGAO-Auxiliar wurde durch *in situ* erzeugtes LiOOH abgespalten und die erhaltene Säure in den SNAC-Thioester überführt. Die anschließende TBS-Entschützung mit PPTS lieferte **134a/b** als Diastereomergemisch (Schema 32). Die erhaltenen C-4 Epimere **134a** und **134b** konnten durch Umkehrphasen-HPLC voneinander getrennt werden.



Schema 33: Mechanismus der NAGAO-Aldol-Reaktion.¹¹³

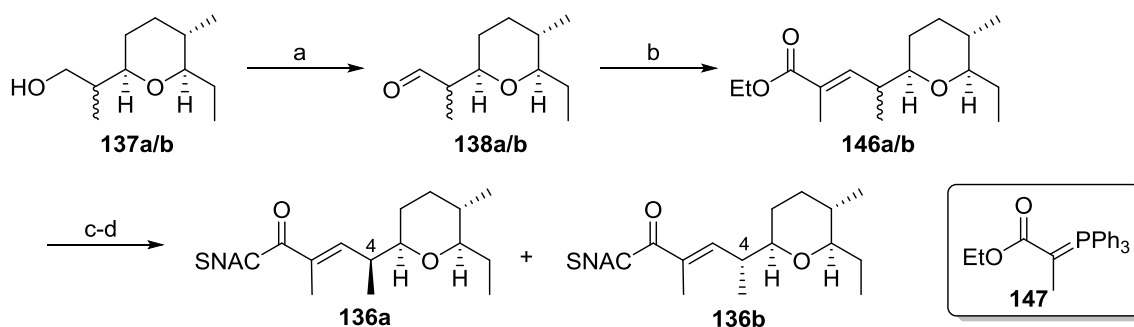
Die NAGAO-Aldol-Reaktion gehört zur Gruppe der Acetat-Aldol-Reaktionen und verläuft unter Verwendung von Thiazolidinthion abgeleiteter Titanenolaten über den in Schema 33 gezeigten chelatisierten ZIMMERMANN-TRAXLER-Übergangszustand **ÜZ-6**. Die chelatisierende

Lewis-Säure TiCl_4 kann zusätzlich zur Komplexierung an die Sauerstoffatome an den Thionschwefel komplexieren und so den Fünfring im Übergangszustand fixieren. Alternativ zu TiCl_4 kann auch die chelatisierende Lewis-Säure $\text{Sn}(\text{OTf})_2$ verwendet werden.^{114,115}



Schema 34: Synthese der α,β -ungesättigten Verbindungen **135a** und **135b**. Bedingungen: a) DMP, NaHCO_3 , CH_2Cl_2 , RT, 1 h; b) **145**, CH_2Cl_2 , RT, über Nacht, 53% über 2 Stufen ausgehend vom Alkohol **137a/b**.

Über eine (*E*)-selektive WITTIG-Reaktion mit Phosphoran **145** wurden ausgehend von Aldehyd **138a/b** die α,β -ungesättigten C-4-Epimere **135a** und **135b** erhalten (Schema 34). Diese wurden über Umkehrphasen-HPLC getrennt.



Schema 35: Synthese der α -methylierten- α,β -ungesättigten Verbindungen **136a** und **136b**. Bedingungen: a) DMP, NaHCO_3 , CH_2Cl_2 , RT, 1 h; b) **147**, CH_2Cl_2 , RT, über Nacht, 41% über 2 Stufen ausgehend von Alkohol **137a/b**; c) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:1), 0°C auf RT, über Nacht; d) HSNAC, EDC-HCl, 4-DMAP, CH_2Cl_2 , 0°C auf RT, über Nacht, 15% über 2 Stufen.

Zur Generierung der α -methylierten- α,β -ungesättigten Verbindungen **136a** und **136b** wurde im ersten Schritt über eine (*E*)-selektive WITTIG-Reaktion mit Phosphoran **147** und Aldehyd **138a/b** das olefinische System aufgebaut. Der erhaltene Ethylester wurde mit LiOH zur freien Säure umgesetzt und anschließend in den SNAC-Thioester **136a/b** überführt (Schema 35). Die beiden C-4-Epimere **136a** und **136b** konnten durch Umkehrphasen-HPLC voneinander getrennt werden.

Durch die nicht stereoselektive Zyklisierung stellte die Aufklärung der Konfiguration an C-4 für alle erhaltenen Produkte **134a/b**, **135a/b** und **136a/b** nach Trennung über Umkehrphasen-HPLC eine Herausforderung dar. Bei keiner der Verbindungen konnte

anhand der Kopplungskonstanten aus den ^1H NMR-Spektren oder durch 1D-NOE-Spektroskopie eine Aussage über die räumliche Anordnung der Methylgruppe an C-4 der jeweiligen Verbindung getroffen werden.

Eine Möglichkeit zur Aufklärung der Konfiguration an C-4 bietet die Schwingungs-Circulardichroismus-Spektroskopie (VCD, engl. *Vibrational circular dichroism*). Bei dieser Methode handelt es sich um eine Kombination von IR- und CD-Spektroskopie. Die Bestimmung der Konfiguration basiert darauf, dass chirale Moleküle in Wechselwirkung mit IR-Licht ein unterschiedliches Absorptionsverhalten in Abhängigkeit von der zirkulären Polarisation des Lichts zeigen. Die Auswertung erfolgt anhand der experimentell ermittelten Absorptionsdifferenz aus links- und rechts-zirkular polarisiertem Licht in Kombination mit dem simulierten Absorptionsverhalten.¹¹⁶

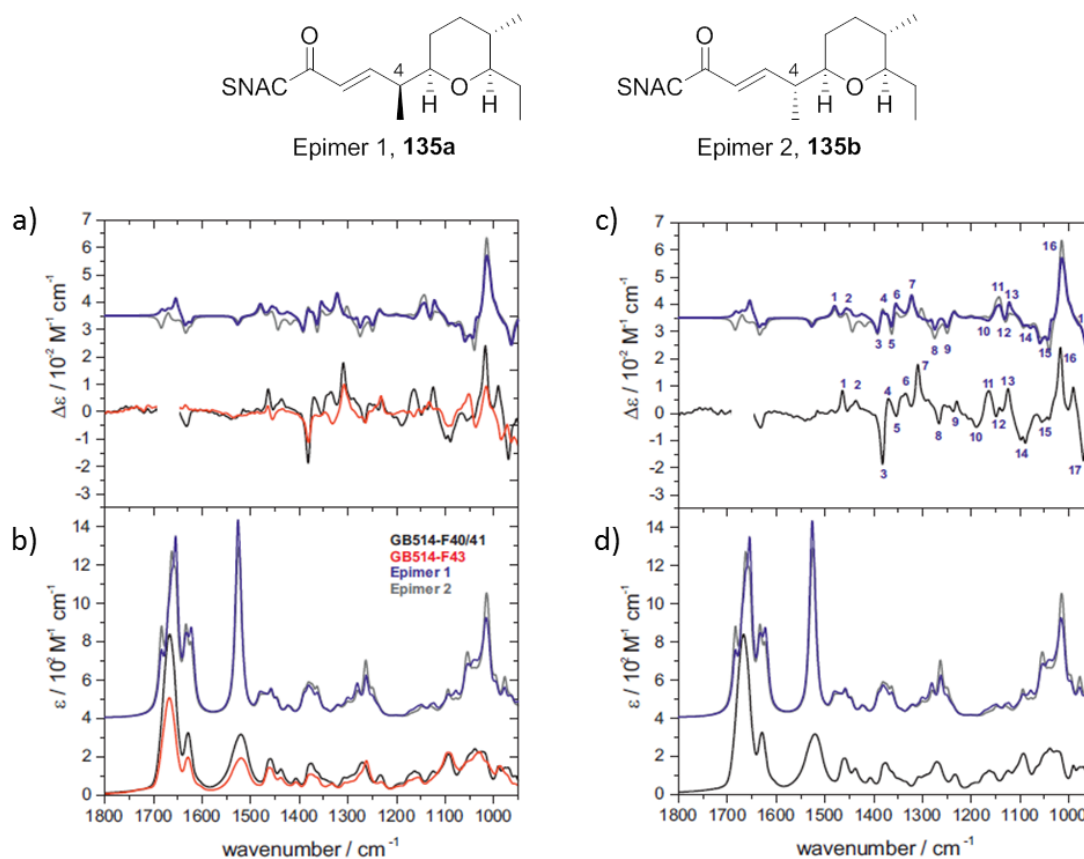


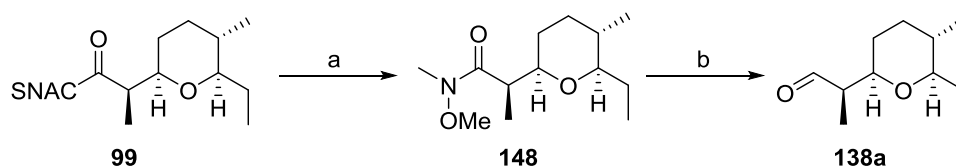
Abbildung 30: Ergebnisse der VCD-Spektroskopie für die Verbindungen **135a** und **135b**. a) Experimentelle und simulierte VCD-Spektren der Verbindungen **135a** und **135b**; b) Experimentelle und simulierte IR-Spektren der Verbindungen **135a** und **135b**; c) Vergleich der simulierten VCD-Spektren mit dem experimentellen VCD-Spektrum von GB514-F40/41; d) Vergleich der simulierten IR-Spektren mit dem experimentellen IR-Spektrum von GB514-F40/41; Experimentelles Absorptionsverhalten: schwarz (GB514-F40/41) und rot (GB514-F43). Simuliertes Absorptionsverhalten: blau (Epimer 1) und grau (Epimer 2). Die Messungen erfolgten in Kooperation mit Dr. CHRISTIAN MERTEN von der Ruhr Universität Bochum.

In einer Kooperation mit Dr. CHRISTIAN MERTEN von der Ruhr Universität Bochum wurden solche VCD-Spektren für **135a** und **135b** aufgenommen (Abbildung 30).

Für die theoretischen Berechnungen wurde davon ausgegangen, dass Epimer 1 eine (4D)-Konfiguration und Epimer 2 eine (4L)-Konfiguration aufweist. Die simulierten IR-Spektren und VCD-Spektren sind für das mögliche Epimer 1 in blau und für das mögliche Epimer 2 in grau dargestellt und die experimentell erhaltenen Spektren sind für die synthetischen Proben mit unbekannter C-4 Konfiguration GB514-F40/41 in schwarz und für GB514-F43 in rot dargestellt.

Die simulierten und experimentellen IR-Spektren (Abbildung 30, b) sind für beide C-4-Epimere sehr ähnlich. Die experimentell erhaltenen VCD-Spektren (Abbildung 30a) zeigen deutliche Unterschiede zwischen den Epimeren GB514-F40/41 und GB514-F43 im Bereich von $1400\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ und unterhalb von 1100 cm^{-1} . Diese Unterschiede sind entgegen der Erwartungen in den simulierten Spektren nicht so stark ausgeprägt.

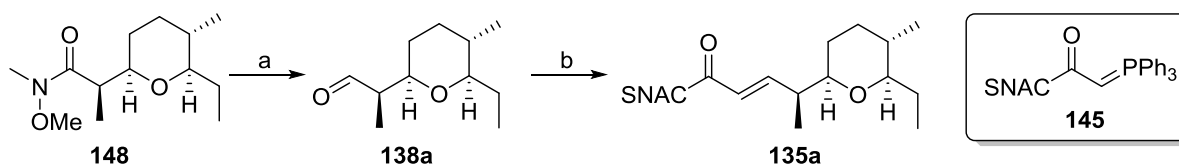
Anhand der erhaltenen Datensätze ist keine eindeutige Aussage über die C-4-Konfiguration der untersuchten Verbindungen **135a** und **135b** möglich. Die erhaltenen simulierten Datensätze passen tendenziell etwas besser zum Absorptionsverhalten der synthetischen Verbindung GB514-F40/41 (in schwarz dargestellt). Durch den direkten Vergleich der VCD-Spektren (Abbildung 30c) lässt sich vermuten, dass GB514-F40/41 dem simulierten Epimer 1 entsprechen könnte, woraus für die synthetische Probe eine (4D)-Konfiguration resultieren würde. Daraus folgend würde sich für GB514-F43 eine (4L)-Konfiguration ergeben. Diese Methode zur Bestimmung der C-4-Konfiguration reicht aufgrund der sehr ähnlich simulierten Datensätze nicht aus um eine eindeutige Aussage zu treffen, so dass zusätzlich noch eine alternative diastereoselektive Syntheseroute durchgeführt wurde.



Schema 36: Diastereoselektive Synthese des Vorläufer-Aldehyds **138a**. Bedingungen: a) $\text{CH}_3\text{ONHCH}_3\cdot\text{HCl}$, $(\text{CH}_3)_2\text{CHMgCl}$, THF, 2.5 h bei $-30\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h bei $0\text{ }^\circ\text{C}$, 45%; b) DIBAL-H, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h.

Um zu verhindern, dass es bei der Synthese des Aldehyds **138a** wieder zur Racemisierung des α -chiralen Zentrums kommt, wurde eine Syntheseroute ohne Reduktions-Oxidations-Kaskade gewählt. Im ersten Schritt wurde der über chemoenzymatische Synthese mit

AmbDH3 erhaltene SNAC-Thioester **99** in Weinrebamid **148** überführt und dieses anschließend mit DIBAL-H direkt zum Aldehyd **138a** reduziert (Schema 36). Eine Racemisierung des α -Stereozyentrums unter den gewählten Synthesebedingungen konnte NMR-spektroskopisch ausgeschlossen werden.



Schema 37: Diastereoselektive Synthese der α,β -ungesättigten Testverbindung **135a**. Bedingungen: a) $\text{CH}_3\text{ONHCH}_3\cdot\text{HCl}$, $(\text{CH}_3)_2\text{CHMgCl}$, THF, 2,5 h bei -30°C , 2 h bei 0°C , 45%; b) **145**, CH_2Cl_2 , RT, über Nacht, 12% über zwei Stufen ausgehend von Weinrebamid **147**.

Die in Schema 37 dargestellte (*E*)-selektive WITTIG-Reaktion mit Aldehyd **138a** und Phosphoran **145** ermöglichte einen direkten Zugang zur α,β -ungesättigten Verbindung **135a**.

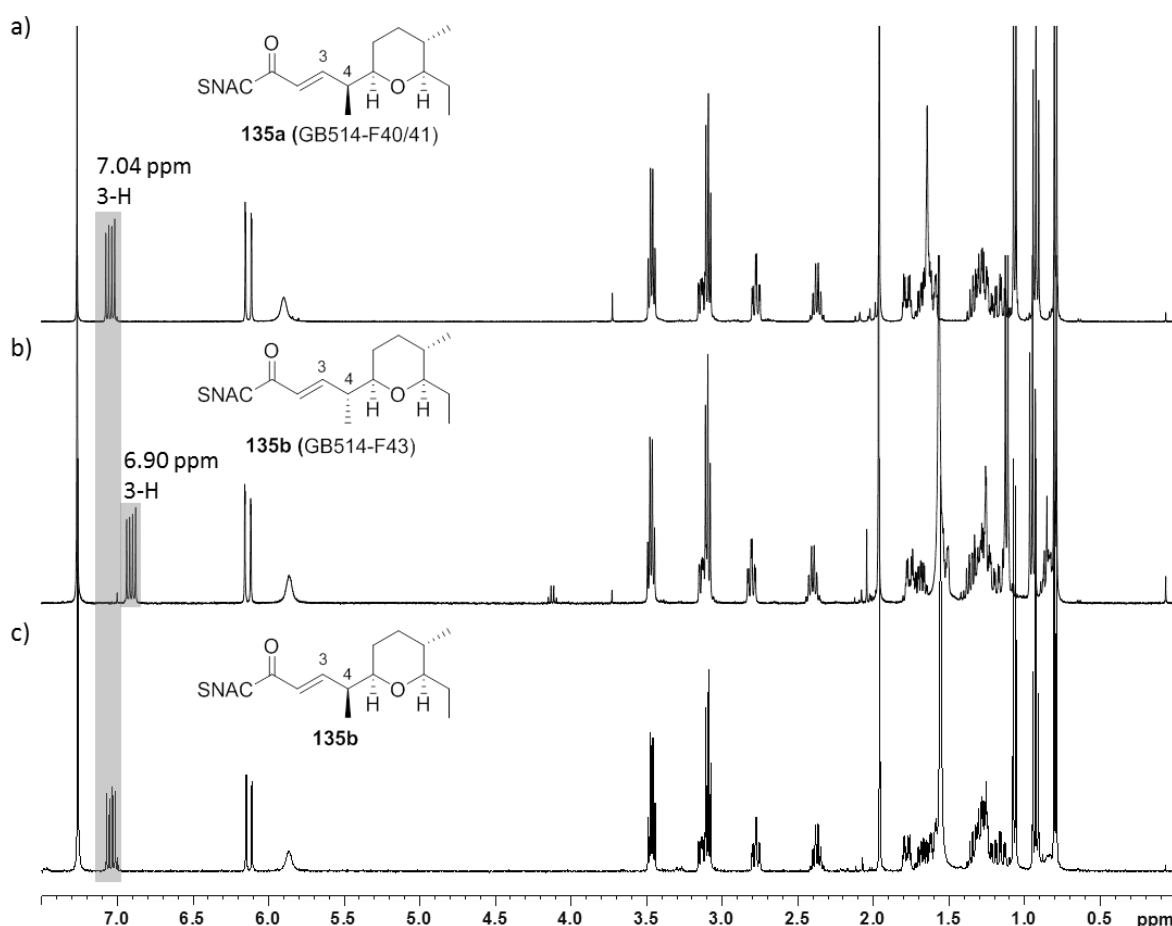


Abbildung 31: Vergleich der ^1H NMR-Spektren der Produkte **135a** und **135b**. a) und b) Synthetische Produkte **135a** und **135b** aus der nicht diastereoselektiven Synthese nach Trennung der Diastereomere mittels Umkehrphasen-HPLC. c) Synthetisches Produkt **135a** aus der stereoselektiven Syntheseroute über Weinrebamid **147**. Alle ^1H NMR-Spektren wurden in CDCl_3 bei 400 MHz aufgenommen.

Die erhaltenen C-4-Epimere **135a** und **135b** aus der nicht diastereoselektiven Syntheseroute (Schema 34) konnten durch Umkehrphasen-HPLC voneinander getrennt werden. In den ^1H NMR-Spektren (Abbildung 31a und b) ist für die beiden Diastereomere ein deutlicher Unterschied bei der Verschiebung im olefinischen Bereich zu erkennen. Das Wasserstoffatom an C-3 von **135a** (GB514-F40/41) (7.04 ppm, dd, $J = 7.8, 16.0$ Hz, 3-H) erfährt im Vergleich zum Wasserstoffatom an C-3 von **135b** (GB514-F43) (6.90 ppm, dd, $J = 8.0, 15.5$ Hz, 3-H) eine leichte Tieffeldverschiebung von 0.14 ppm (Abbildung 31a und b). In Abbildung 31c ist das ^1H NMR-Spektrum der synthetischen Verbindung **135a** aus der diastereoselektiven Syntheseroute über das Weinrebamid **148** gezeigt. Durch die gewählte Ausgangsverbindung **99** ist die C-4-Konfiguration des erhaltenen Produktes **135a** festgelegt (Schema 36). Das erhaltene ^1H NMR-Spektrum der so synthetisierten Verbindung **135a** (Abbildung 31c) ist identisch mit dem in Abbildung 31a gezeigten ^1H NMR-Spektrum, wodurch eindeutig gezeigt wurde, dass es sich hierbei um identische Verbindungen handelt.

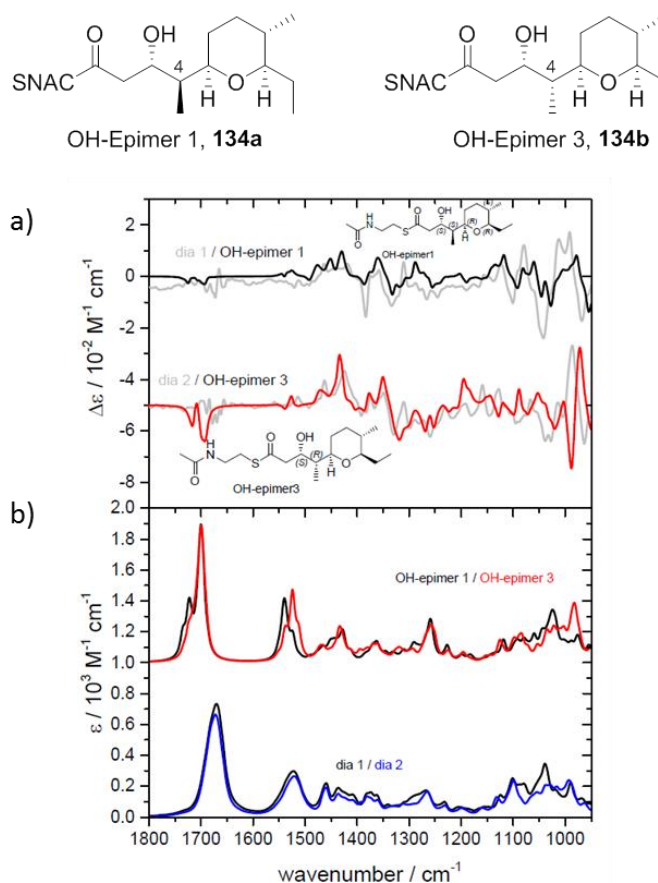
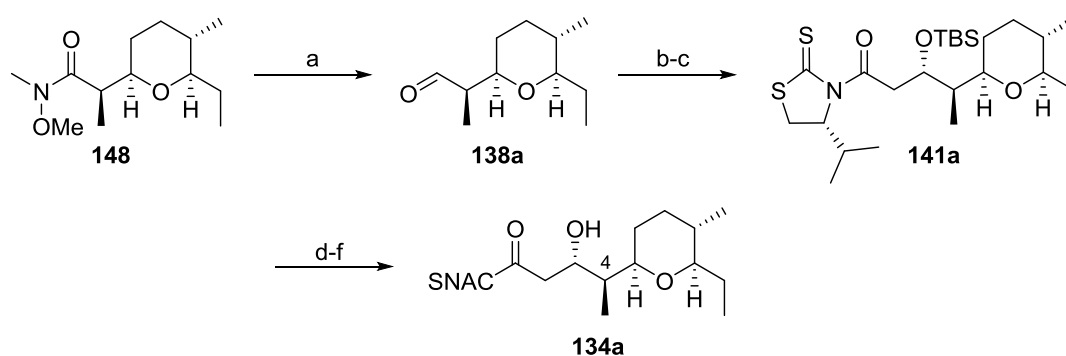


Abbildung 32: Ergebnisse der VCD-Spektroskopie für die Verbindungen **134a** und **134b**. a) Vergleich der simulierten VCD-Spektren mit dem experimentellen VCD-Spektrum von dia 1 (grau) mit OH-Epimer 1 (schwarz) und dia 2 (grau) mit OH-Epimer 3 (rot); b) Experimentelle (dia 1 (grau) und dia 2 (blau)) und simulierte IR-Spektren (OH-Epimer 1 (schwarz) und OH-Epimer 3 (rot)) der Verbindungen **134a** und **134b**. Die Messungen erfolgten in Kooperation mit Dr. CHRISTIAN MERTEN von der Ruhr Universität Bochum.

In Abbildung 32 sind die VCD- und IR-Spektren für die Verbindungen **134a** und **134b** gezeigt. Für die theoretischen Berechnungen wurde davon ausgegangen, dass das OH-Epimer **1** eine (4*D*)-Konfiguration und das OH-Epimer **3** eine (4*L*)-Konfiguration aufweist. Die simulierten VCD- und IR-Spektren sind für das mögliche OH-Epimer **1** in schwarz und für das mögliche OH-Epimer **3** in rot dargestellt. Die experimentellen IR-Spektren sind für die synthetischen Proben mit unbekannter C-4 Konfiguration für dia **1** in schwarz und für dia **2** in blau dargestellt. Die experimentellen VCD-Spektren sind für beide synthetischen Proben in grau dargestellt.

Sowohl die experimentellen als auch die simulierten VCD-Spektren zeigen deutliche Unterschiede im Bereich von $1400\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ und unterhalb von 1100 cm^{-1} für die beiden möglichen Diastereomere. Beim direkten Vergleich der experimentellen und simulierten VCD-Spektren fällt auf, dass das Spektrum der synthetischen Probe dia **1** starke Übereinstimmung mit dem simulierten Spektrum für das mögliche OH-Epimer **1** aufweist. Das experimentelle Spektrum von dia **2** stimmt hingegen sehr gut mit dem simulierten Spektrum des möglichen OH-Epimers **3** überein. Daraus ergibt sich, dass die synthetische Probe dia **1** eine (4*D*)-Konfiguration und die synthetische Probe dia **2** eine (4*L*)-Konfiguration aufweisen muss. Zur Bestätigung der erhaltenen Ergebnisse wurde der β -Hydroxythioester **134a** zusätzlich über die diastereoselektive Syntheseroute ausgehend von **147** synthetisiert.



Schema 38: Diastereoselektive Synthese des β -Hydroxythioesters **134a**. Bedingungen: a) $\text{CH}_3\text{ONHCH}_3\cdot\text{HCl}$, $(\text{CH}_3)_2\text{CHMgCl}$, THF, 2.5 h bei $-30\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h bei $0\text{ }^\circ\text{C}$, 45%; b) **142**, TiCl_4 , DIPEA, CH_2Cl_2 , $-40\text{ }^\circ\text{C}$ auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 30 min; c) 2,6-Lutidin, TBSOTf, CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$ auf RT, 45% über 3 Stufen; d) $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, H_2O_2 , THF: H_2O (3:1), $0\text{ }^\circ\text{C}$ auf RT, über Nacht; e) HSNAC, EDC-HCl, 4-DMAP, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$ auf RT, über Nacht, 45% über zwei Stufen; f) PPTS, MeOH, $50\text{ }^\circ\text{C}$, 24 h, 74%.

Über eine NAGAO-Aldol-Reaktion mit Aldehyd **138a** und anschließender TBS-Schützung konnte diastereoselektiv die β -Hydroxyverbindung **141a** aufgebaut werden. Das NAGAO-Auxiliar wurde durch *in situ* erzeugtes LiOOH abgespalten und die so erhaltene Säure direkt

in den SNAC-Thioester überführt. TBS-Entschützung unter Verwendung von PPTS ergab den β -Hydroxythioester **134a** in guten Ausbeuten (Schema 38).

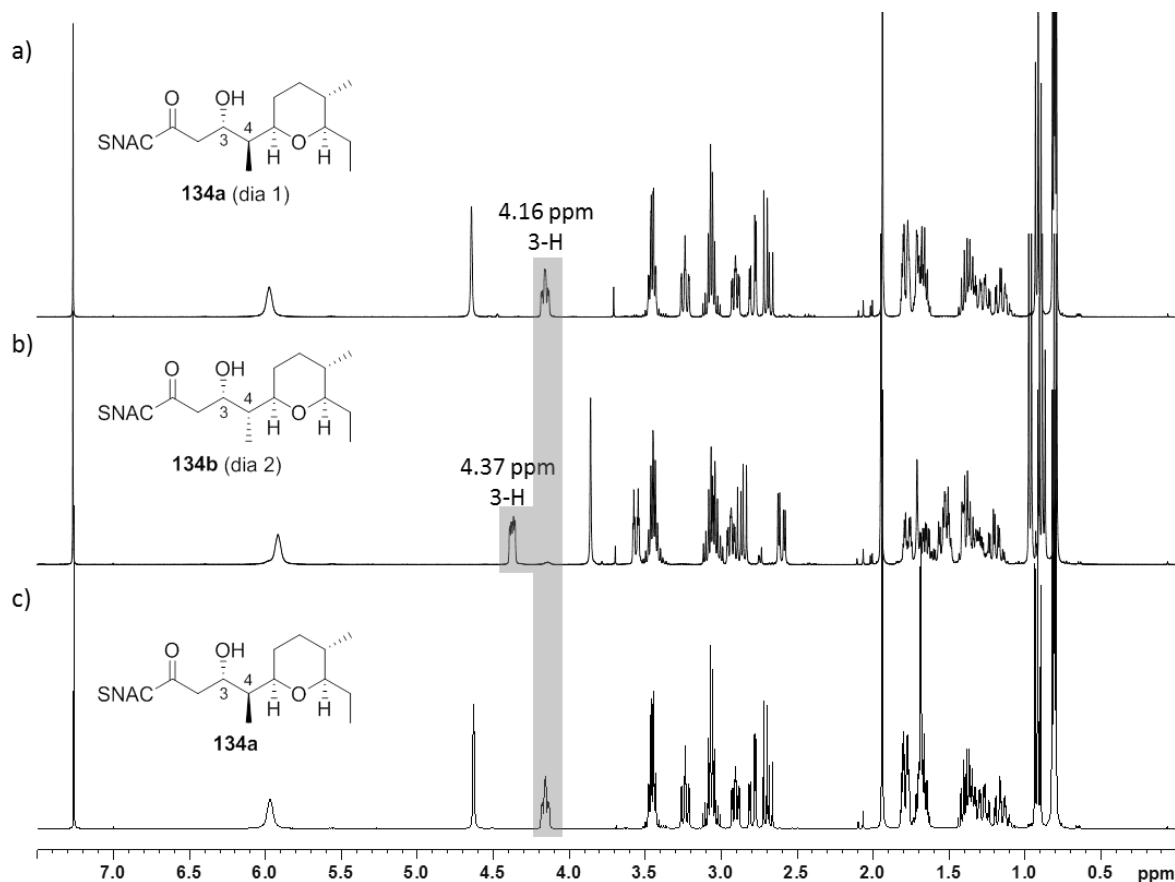


Abbildung 33: Vergleich der ^1H NMR-Spektren der Produkte **134a** und **134b**. a) und b) Synthetische Produkte **134a** und **134b** aus der nicht diastereoselektiven Synthese nach Trennung der Diastereomere mittels Umkehrphasen-HPLC. Die definierte C-4 Konfiguration basiert auf den Ergebnissen der VCD-Spektroskopie; c) Synthetisches Produkt **134a** aus der diastereoselektiven Syntheseroute über das Weinrebamid **148**. Alle ^1H NMR-Spektren wurden in CDCl_3 bei 400 MHz aufgenommen.

Die erhaltenen C-4-Epimere **134a** und **134b** aus der nicht diastereoselektiven Synthese (Schema 32) konnten durch Umkehrphasen-HPLC getrennt werden. Die definierte C-4-Konfiguration von **134a** (dia 1) und **134b** (dia 2) basiert auf den Ergebnissen der VCD-Spektroskopie. In den ^1H NMR-Spektren für die C-4-Epimere **134a** und **134b** (Abbildung 33a und b) sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Das Wasserstoffatom an C-3 von **134a** (dia 1) (4.16 ppm, m, 3-H) erfährt im Vergleich zum Wasserstoffatom an C-3 von **134b** (dia 2) (4.37 ppm, m, 3-H) eine leichte Hochfeldverschiebung von 0.21 ppm. In Abbildung 33c ist das ^1H NMR von **134a** aus der diastereoselektiven Synthese über die Weinrebamid-Stufe **148** gezeigt. Durch die bestätigte Stereoselektivität der chemoenzymatischen Zyklisierung ist die C-4-Konfiguration bekannt. Das erhaltene ^1H NMR-Spektrum ist identisch mit dem ^1H NMR-

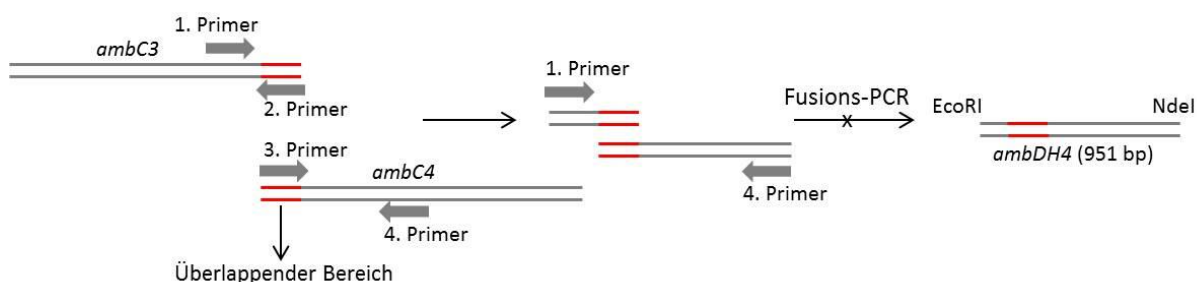
Spektrum von **134a** (dia 1), wodurch die Ergebnisse der VCD-Spektroskopie bestätigt werden können.

Durch die übereinstimmenden Ergebnisse aus der VCD-Spektroskopie und der stereoselektiven Syntheseroute des β -Hydroxythioester **134a** konnte die absolute Konfiguration an C-4 für die Verbindungen **134a** und **134b** definiert werden. In Analogie zu diesen Ergebnissen wurde mit Hilfe der etablierten stereoselektiven Syntheseroute ebenfalls die C-4-Konfiguration für die α,β -ungesättigten Thioester **135a** und **135b** ermittelt.

3.2.2 Molekularbiologische und enzymologische Arbeiten

3.2.2.1 Dehydratase-Domäne AmbDH4

Die Grenzen der Dehydratase-Domäne AmbDH4 wurden durch Alignments mit gut charakterisierten Dehydratase-Domänen aus dem Borrelidin- und dem Ambruticin-Biosyntheseweg festgelegt. Die erhaltene Basensequenz von *ambDH4* lag aufgeteilt auf den kommerziell erworbenen synthetischen Genen *ambC3* und *ambC4* vor und sollte durch eine Fusions-PCR amplifiziert werden. Im ersten Schritt wurden zur Generierung einer ausreichenden Menge an Plasmid-DNA chemisch kompetente *E. coli* One Shot® Top10 Zellen mit den erworbenen synthetischen Genen transformiert und unter Selektionsdruck kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte durch alkalische Lyse.



Schema 39: Generelles Schema für die durchzuführende Fusions-PCR ausgehend von den synthetischen Genen pUC19_ambC3 und pUC19_ambC4.

Im ersten Schritt wurden ausgehend von den beiden synthetischen Genen *ambC3* und *ambC4* die für *ambDH4* codierenden Basensequenzfragmente amplifiziert. Die so erhaltenen Fragmente aus *ambC3* (Fragment 1, 102 bp) und *ambC4* (Fragment 2, 894 bp) wurden als DNA-Template für die nachfolgende Fusions-PCR eingesetzt. Durch die komplementäre Basensequenz bestehend aus 45 bp (in rot hervorgehoben) fungieren die eingesetzten

Oligonukleotide gleichzeitig als DNA-Templates füreinander. Die Amplifizierung der gewünschten Basensequenz erfolgte unter Verwendung des ursprünglichen *ambC3* Vorwärtsprimers (1. Primer) und des *ambC4* Rückwärtsprimers (2. Primer) in Kombination mit der Phusion® *High-Fidelity*-DNA-Polymerase (Schema 39).

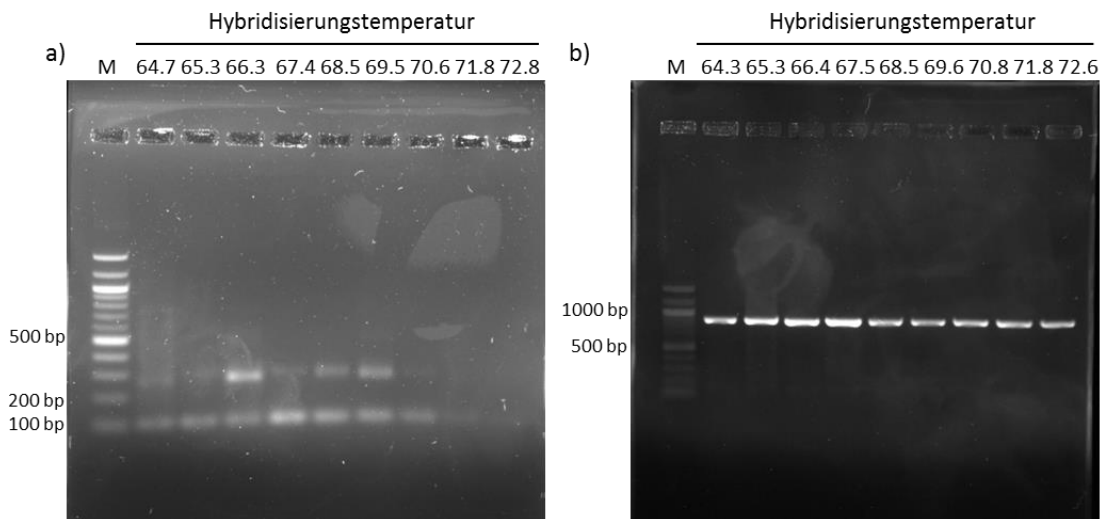


Abbildung 34: Agarosegele unter UV-Licht nach Amplifizierung der einzelnen Fragmente für die Fusions-PCR, angefärbt mit Roti®-GelStain, für Oligonukleotiddetails s. Tabelle 5; **M** = Marker (100 bp DNA ladder NEB); a) Amplifizierung des Fragments 1 (102 bp) ausgehend vom synthetischen Gen pUC19_ambC3 mit den Oligonukleotiden P3 und P4, 2%iges Agarosegel; b) Amplifizierung des Fragments 2 (894 bp) ausgehend vom synthetischen Gen pUC19_ambC4 mit den Oligonukleotiden P5 und P6, 1%iges Agarosegel. Die Hybridisierungstemperatur ist in °C angegeben.

Für Fragment 1, ausgehend von Plasmid pUC19_ambC3, wurde eine optimale Hybridisierungstemperatur von 67.4 °C beobachtet (Abbildung 34a, Bahn 4). Andere getestete Hybridisierungstemperaturen zwischen 64.7 °C und 70.6 °C führten zu einem weniger zufriedenstellenden Ergebnis. Neben der erwarteten Bande bei 102 bp ist noch ein zweites unspezifisches Amplifikat von ca. 300 bp bei Hybridisierungstemperaturen zwischen 64.7 °C und 70.6 °C zu beobachten. Für die Amplifizierung von Fragment 2 ausgehend vom Plasmid pUC19_ambC4 lieferten alle getesteten Hybridisierungstemperaturen zwischen 64.3 °C und 72.6 °C ein zufriedenstellendes Ergebnis (Abbildung 34b, Bahn 1-9, Fragment 2: 894 bp). Nach Auftrennung über Agarosegelelektrophorese wurden die gewünschten Banden ausgeschnitten, gereinigt und direkt als Templat-DNA in der anschließenden Fusions-PCR eingesetzt.

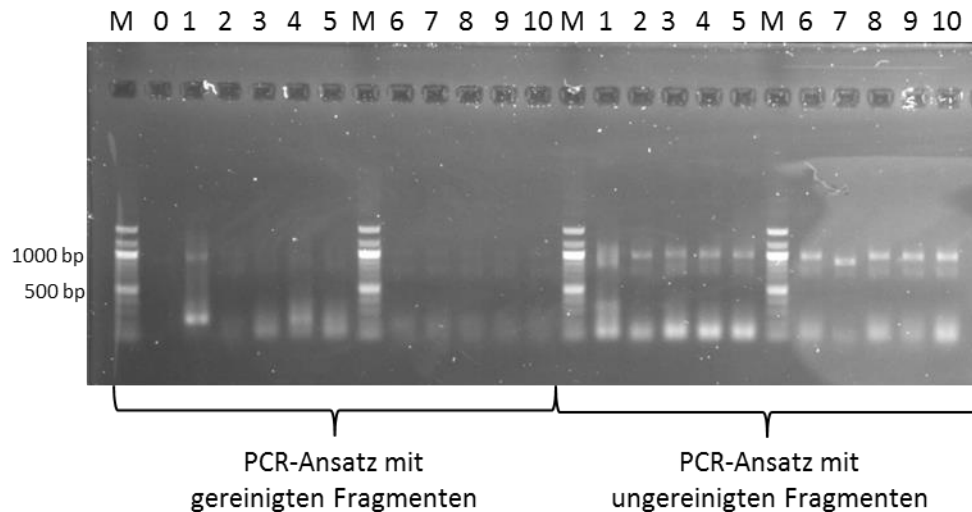
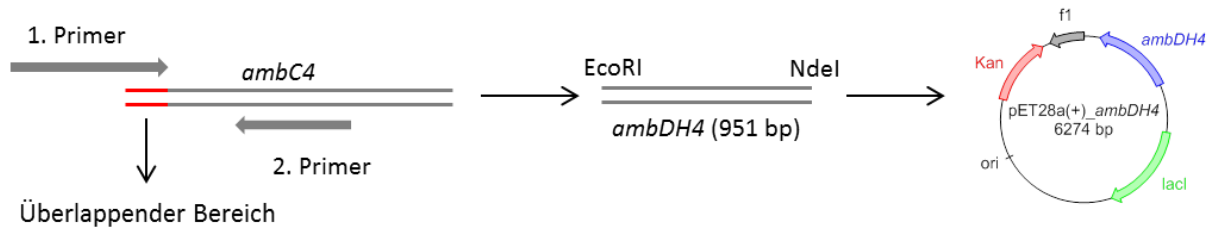


Abbildung 35: Agarosegel (1%ig) unter UV-Licht nach Fusions-PCR mit den Fragmenten 1 und 2 aus der vorausgegangenen PCR zur Amplifizierung, angefärbt mit Roti®-GelStain, verwendete Oligonukleotide: P3 und P6 für Oligonukleotiddetails s. Tabelle 5. Die Fusions-PCR wurde sowohl mit gereinigten als auch mit ungereinigten Fragmenten durchgeführt. **M** = Marker (100 bp DNA ladder *NEB*), T_H = Hybridisierungstemperatur; **0**: Vergleichsprobe, **1**: $T_H = 63.7\text{ °C}$, **2**: $T_H = 64.3\text{ °C}$, **3**: $T_H = 65.3\text{ °C}$, **4**: $T_H = 66.4\text{ °C}$, **5**: $T_H = 67.5\text{ °C}$, **6**: $T_H = 68.5\text{ °C}$, **7**: $T_H = 69.6\text{ °C}$, **8**: $T_H = 70.8\text{ °C}$, **9**: $T_H = 71.8\text{ °C}$, **10**: $T_H = 72.6\text{ °C}$.

Zur Amplifizierung von *ambDH4* wurde die Fusions-PCR mit den gereinigten DNA-Fragmenten bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen zwischen 63.7 °C bis 72.6 °C durchgeführt. Keine der gewählten Bedingungen führte zum gewünschten Amplifikat von 951 bp (Abbildung 35). Durch die vorausgegangenen Reinigungsschritte ist es möglich, dass die Templat-DNA beider Fragmente bedingt durch hohe Ausbeuteverluste zu gering konzentriert war, so dass es nicht zur Fusion kommen konnte. Ein weiterer Fusions-PCR-Ansatz wurde mit ungereinigten Fragmenten bei gleichbleibendem Hybridisierungstemperaturgradienten durchgeführt. Die vermeintlich erfolgreiche Amplifizierung von *ambDH4* konnte bei Hybridisierungstemperaturen zwischen 64.3 °C und 72.6 °C , mit Ausnahme der Hybridisierungstemperatur von 69.6 °C , beobachtet werden (Abbildung 35). Die erfolgreichen Ansätze wurden vereinigt, über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die spezifischen Banden ausgeschnitten, gereinigt, enzymatisch verdaut (mit *NdeI* und *EcoRI*) und in den linearisierten pET28a(+)-Vektor ligiert. Eine erfolgreiche Fusion und Ligation von *ambDH4* in den Expressionsvektor konnte nicht durch Sequenzierung bestätigt werden.



Schema 40: Allgemeines Schema zur Amplifizierung von *ambDH4* ausgehend vom synthetischen Gen pUC19_ambC4.

Daher wurde in einem alternativen Ansatz *ambDH4* ausgehend vom synthetischen Gen *ambC4* direkt über eine PCR amplifiziert (Schema 40). Hierbei wurden die fehlenden Basenpaare (57 bp) über den vergrößerten Vorwärtsprimer (1. Primer) eingeführt.

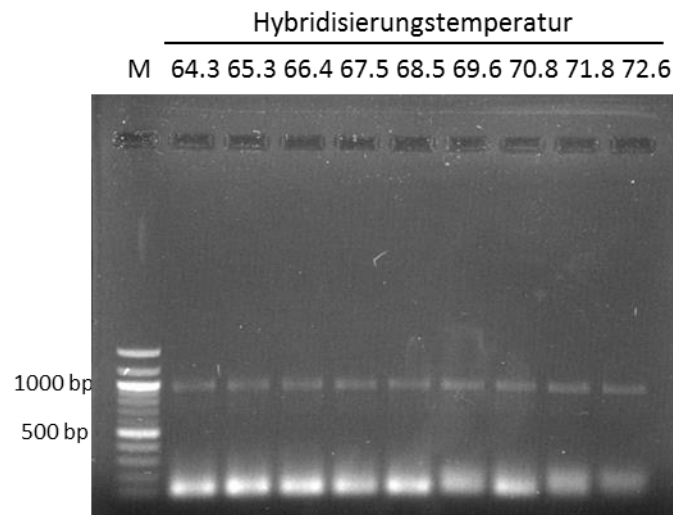


Abbildung 36: Agarosegel (1%ig) unter UV-Licht nach Amplifizierung von *ambDH4* (951 bp), angefärbt mit Roti®-GelStain, verwendete Oligonukleotide: P6 und P7 für Oligonukleotiddetails s. Tabelle 5, **M** = Marker (100 bp DNA ladder *NEB*). Die Hybridisierungstemperatur ist in °C angegeben.

Die Amplifizierung von *ambDH4* (951 bp) war bei allen getesteten Hybridisierungstemperaturen zwischen 64.3 °C und 72.6 °C erfolgreich (Abbildung 36, Bahnen 1-9). Die erfolgreichen Ansätze wurden vereinigt, über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die spezifischen Banden ausgeschnitten, gereinigt und in den pJET-Vektor ligiert. Um ausreichende Mengen Plasmid-DNA zu erhalten, wurden chemisch kompetente *E. coli* One Shot® Top10 Zellen mit pJET_ambDH4 transformiert und durch alkalische Lyse gereinigt. Zur Ligation in den linearisierten pET28a(+)-Vektor wurde pJET_ambDH4 enzymatisch verdaut (mit NdeI und EcoRI). Die erfolgreiche Amplifizierung von *ambDH4* und Ligation in den pET28a(+)-Vektor konnte durch Sequenzierung (*Eurofins Scientific SE*) bestätigt werden.

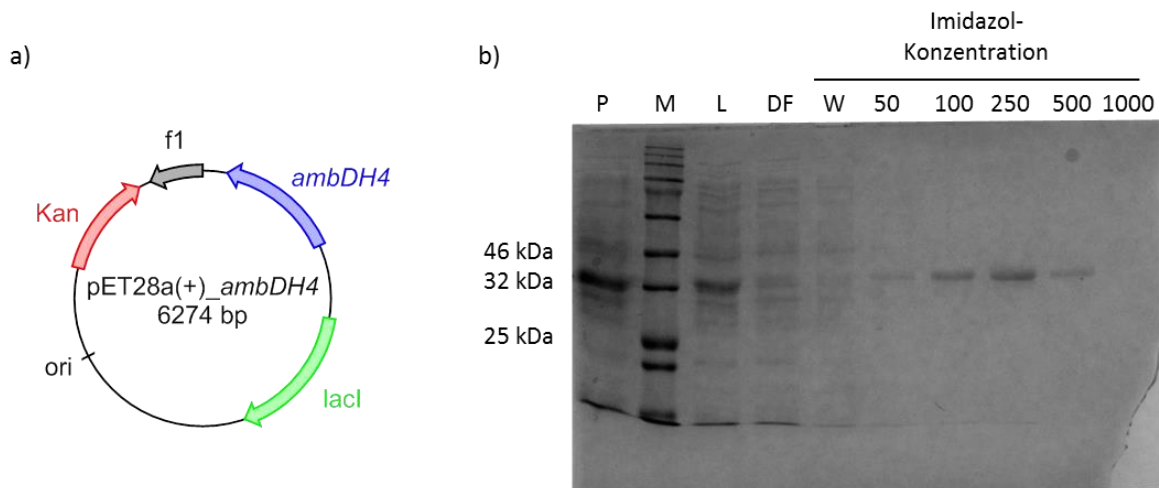


Abbildung 37: a) Schematische Darstellung des Expressionskonstrukts pET28a(+)_ambDH4; b) SDS-PAGE (15%iges Trenngel) der Expression von His₆-AmbDH4 nach Zellaufschluss und Ni-NTA; erwartete Proteingröße: ca. 37 kDa; **P:** Pellet, **M:** Marker (*Color Prestained Standard, Broad Range (11-245 kDa), NEB*), **L:** Lysat, **DF:** Durchfluss, **W:** Waschen, **50-1:** ansteigende Imidazolkonzentration (50 – 1000 mM).

Die heterologe Genexpression von His₆-AmbDH4 erfolgte ausgehend vom Plasmid pET28a(+)_ambDH4 in *E. coli* BL21(DE3) Zellen. Es wurden die gleichen Expressionsbedingungen gewählt, die bereits für die heterologe Genexpression der Dehydratase-Domäne AmbDH3 erfolgreich etabliert wurden (0.1 mM IPTG, 25 °C, 22 h, 180 Upm). Unter den genannten Bedingungen konnte lösliches Protein (37 kDa) mittels SDS-PAGE im Zelllysat (Abbildung 37b, Bahn L) beobachtet werden. Das erhaltene His₆-Fusionsprotein wurde durch Ni-NTA mit ansteigender Imidazolkonzentration (Abbildung 37b, Bahnen 50-1) isoliert. Das so erhaltene Protein wurde nach Entsalzung direkt in die Enzymaktivitätstests eingesetzt.

3.2.2.2 C-Methyltransferase AmbM

Bei der C-Methyltransferase AmbM handelt es sich um ein einzelständiges, SAM-abhängiges Enzym aus dem Ambruticin-Biosyntheseweg, welches vermeintlich verantwortlich für die Methylierung der C-15-Position in den Ambruticinen (Nummerierung bezogen auf Ambruticin, Ambruticin-Struktur s. Schema 18) ist.

Die Klonierung vom synthetischen Gen *ambM* in die Expressionsvektoren pET28a(+), pET32a(+) und pGEX-6P-1 wurde erfolgreich in vorausgegangenen Arbeiten durchgeführt.^{107,117} Der Expressionsvektor pET32a(+) besitzt neben dem N-terminalen His-Tag einen zusätzlichen N-terminalen Trx-Tag (Thioredoxin Tag) und der pGEX-6P-1 einen N-terminalen GST-Tag (Glutathion-S-Transferase-Tag). Diese beiden Tags können zur

Verbesserung der Löslichkeit beitragen und der GST-Tag kann für alternative Reinigungsmethoden (z. B. Glutathion-Affinitätschromatographie) genutzt werden.¹¹⁸ Beide Tags müssen aufgrund ihrer Größe nach erfolgter Reinigung abgespalten werden.

Erste Expressionsstudien in vorausgegangenen Arbeiten für die heterologe Genexpression von His₆-AmbM in *E. coli* BL21(DE3) Zellen ausgehend von Plasmid pET28a(+)_ambM unter Zusatz von Glucose (0.4 %vol) führten zur Expression eines löslichen Proteins der gewünschten Größe (46 KDa), welches jedoch nicht durch gravimetrische Ni-NTA gereinigt werden konnte. Die Zugabe von Glucose führt zu einem schnelleren Zellwachstum, bei gleichzeitiger Verlangsamung der Genexpression (Katabolitrepression). Um das Reinigungsproblem zu umgehen und eine erhöhte Menge an löslichem Protein zu erhalten, wurde die heterologe Genexpression in *E. coli* BL21(DE3) mit den Plasmiden pET32a(+)_ambM und pGEX-6P-1_ambM unter den gleichen Expressionsbedingungen ohne Glucosezusatz (0.1 mM IPTG, 25 °C, 18 h) wiederholt, jedoch konnte kein lösliches Protein erhalten werden.^{107,117}

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, die Expressionsbedingungen für die Gewinnung von AmbM zu optimieren und eine Reinigungsmethode zu etablieren. Die zuvor etablierten Expressionsbedingungen ausgehend von dem Plasmid pET28a(+)_ambM unter Zusatz von Glucose konnten nicht reproduziert werden. Es wurde nur unlösliches Protein erhalten. Die Absenkung der Expressionstemperatur von 25 °C auf 15 °C mit und ohne Glucosezusatz, führte ebenfalls nicht zu einem löslichen Protein. Die heterologe Genexpression von Fremdproteinen in *E. coli* stellt sich häufig als problematisch dar, da es zu Proteinfehlfaltungen kommen kann und häufig die Aggregatbildung unlöslicher Protein zu beobachten ist.¹¹⁹ Chaperone können als Faltungshelfer fungieren und verhindern, dass es zur Aggregatbildung kommt.

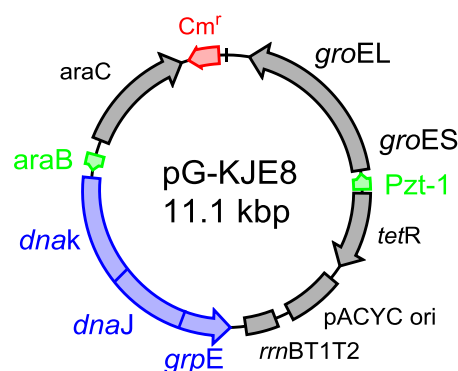


Abbildung 38: Schematische Darstellung des Chaperon tragenden Plasmids pG-KJE8.

Um AmbM in löslicher Form zu erhalten, wurden *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit dem Plasmid pET28a(+)_ambM und dem TaKaRa Chaperonset pG-KJE8 (Abbildung 38) transformiert. Die Induktion der Expression der beinhalteten Chaperongene *dnaK*, *dnaJ* und *grpE* erfolgt durch Zugabe von Arabinose und von *groES* und *groEL* durch Zugabe von Tetracyclin.¹²⁰

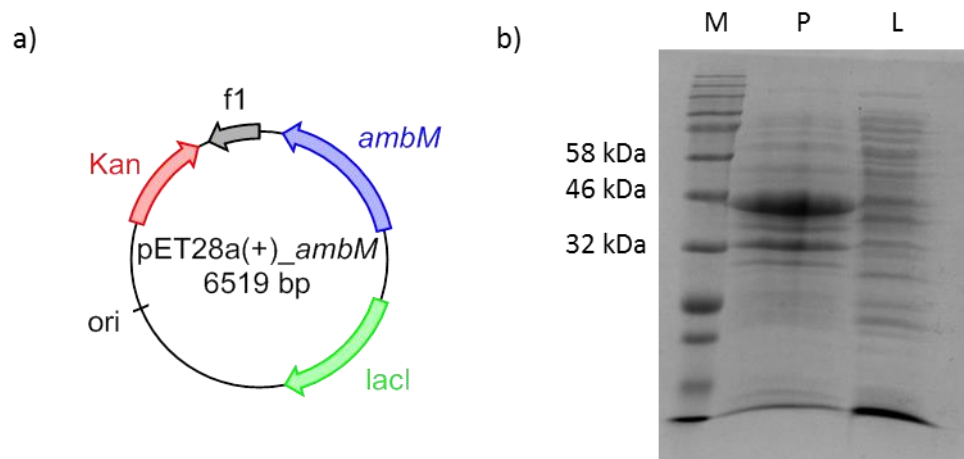


Abbildung 39: a) Schematische Darstellung des Expressionskonstrukts pET28a(+)_ambM; b) SDS-PAGE (15%iges Trenngel) der Expression von His₆-AmbM, erwartete Proteingröße ca. 46 kDa; **M:** Marker (*Color Prestained Standard, Broad Range* (11-245 kDa), *NEB*), **P:** Pellet, **L:** Lysat.

Für die Co-Expression von His₆-AmbM in *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit dem TaKaRa Chaperonset pG-KJE8 wurden die Zellen direkt mit Tetracyclin (1 ng/mL) induziert, bis zu einer OD₆₀₀ = 0.6 kultiviert und die Induktion der Expression von *ambM* erfolgte durch Zugabe von 0.1 mM IPTG. Durch die mit Tetracyclin induzierte Co-Expression konnte eine verbesserte Löslichkeit des Zielproteins (Abbildung 39b, Bahn L) erreicht werden, jedoch lag immer noch der größte Teil des überexprimierten Proteins unlöslich im Zellpellet vor (Abbildung 39b, Bahn P). Die Reinigung durch Ni-NTA führte weder gravimetrisch noch durch FPLC zu einem isolierten Zielprotein, da wahrscheinlich kein Protein-Chelat-Komplex ausgebildet wurde. Größenausschlusschromatographie führte ebenfalls nicht zum gereinigten Zielprotein. Weitere Studien zur Reinigung des Proteins wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Die Enzymaktivitätstests erfolgten mit dem erhaltenen Zellysate nach Zellaufschluss durch Ultraschall.

3.2.3 Enzymaktivitätstests

Die Charakterisierung der Domäne AmbDH4 erfolgte in *in vitro* Aktivitätstests mit dem gereinigtem His₆-AmbDH4-Fusionsprotein und den synthetischen Testverbindungen **134a/b**, **135a/b** und **136a/b** in HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.5) bei 37 °C über Nacht. Nach extraktiver Aufarbeitung mit EtOAc wurden die Enzymaktivitätstests mittels HPLC-MS und ¹H NMR-Spektroskopie analysiert. Zum Ausschluss von spontanen Reaktionen und für die Untersuchung der Substratstabilität wurden alle Testverbindungen über Nacht bei 37 °C in reinem HEPES-Puffer inkubiert, extraktiv aufgearbeitet und NMR spektroskopisch analysiert. Die zugehörigen ¹H NMR-Spektren sind im Anhang zu finden (s. Anhang 7.3).

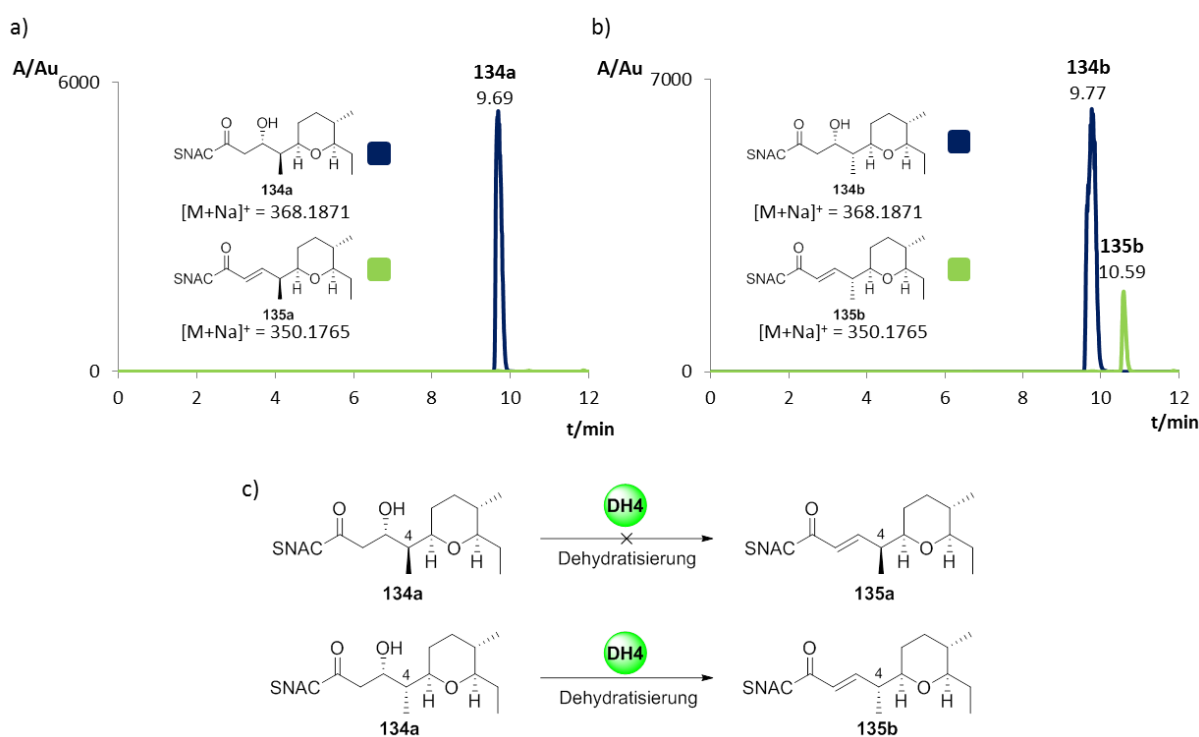
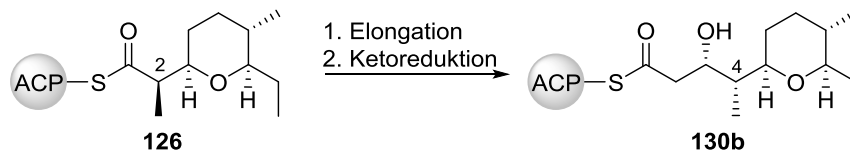


Abbildung 40: HPLC-MS Analyse der Umsetzung von a) **134a** mit His₆-AmbDH4 und b) **134b** mit His₆-AmbDH4 nach extraktiver Aufarbeitung mit EtOAc. Für unprozessierte HPLC-MS-Spektren s. Anhang 7.3. Enzymaktivitätstestbedingungen: HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.5), 37 °C, 300 Upm, 16 h, Proteinkonzentration: 1.5-2.0 mg/mL, Substratkonzentration: 5 mM.

In Abbildung 40 sind die Chromatogramme der enzymatischen Umsetzung der C-4-Epimere **134a** und **134b** mit His₆-AmbDH4 nach extraktiver Aufarbeitung gezeigt. Für die Inkubation von **134a** konnte ausschließlich das Eduktsignal mit einer Retentionszeit von 9.69 min detektiert werden (Abbildung 40a). Bei der Inkubation von **134b** war neben dem Eduktsignal bei einer Retentionszeit von 9.77 min eines neues Signal geringerer Intensität bei 10.59 min mit einem der Masse eines dehydratisierten Produktes entsprechenden Masse-Ladungs-

Verhältnis, detektierbar (Abbildung 40b). Hieraus resultiert, dass AmbDH4 die klassische Stereoselektivität eine Dehydratase-Domäne und eine ungewöhnlich hohe Substratspezifität bezüglich der C-4-Konfiguration aufweist (Abbildung 40c).



Schema 41: Hypothetischer Ablauf zur Invertierung der Konfiguration an C-4.

Aus den Studien zur *in vitro* Charakterisierung von AmbDH3 ist eindeutig bekannt, dass das Produkt von Modul 3 **129** eine (2D)-Konfiguration aufweist (s. Kapitel 3.1.3). Nach Elongation mit Malonyl-CoA sollte den klassischen Polyketidbiosyntheseregeln folgend die im vorausgegangenen Modul etablierte Stereochemie (nach Verlängerung um eine Acetat-Einheit: C-4) erhalten bleiben. Von der AmbDH4 Domäne wird jedoch nur die (4L)-konfigurierte Verbindung **134a** akzeptiert und umgesetzt wird. Deshalb muss während der Prozessierung durch AmbAT4, AmbKS4 und AmbKR4 eine Invertierung der C-4-Konfiguration erfolgen (Schema 41).

Das erwartete Dehydratisierungsprodukt und das Produkt nach erfolgter Doppelbindungsisomerisierung weisen nicht nur die gleiche molare Masse sondern auch sehr ähnliche HPLC-Retentionszeiten auf. Bedingt dadurch wurde die durch AmbDH4 katalysierte Dehydratisierung sowohl mittels HPLC-MS als auch mittels NMR-Spektroskopie analysiert. Die NMR-Spektroskopie ermöglicht es die Position und die Konfiguration der gebildeten Doppelbindung eindeutig zu bestimmen. Für die NMR-spektroskopische Untersuchung wurden die Enzymaktivitätstests im semi-präparativen Maßstab (3 mg Substrat) wiederholt und nach extraktiver Aufarbeitung mit EtOAc analysiert. Alle Enzymaktivitätstests zur Untersuchung der Doppelbindungsisomerisierung wurden im semi-präparativen Maßstab durchgeführt.

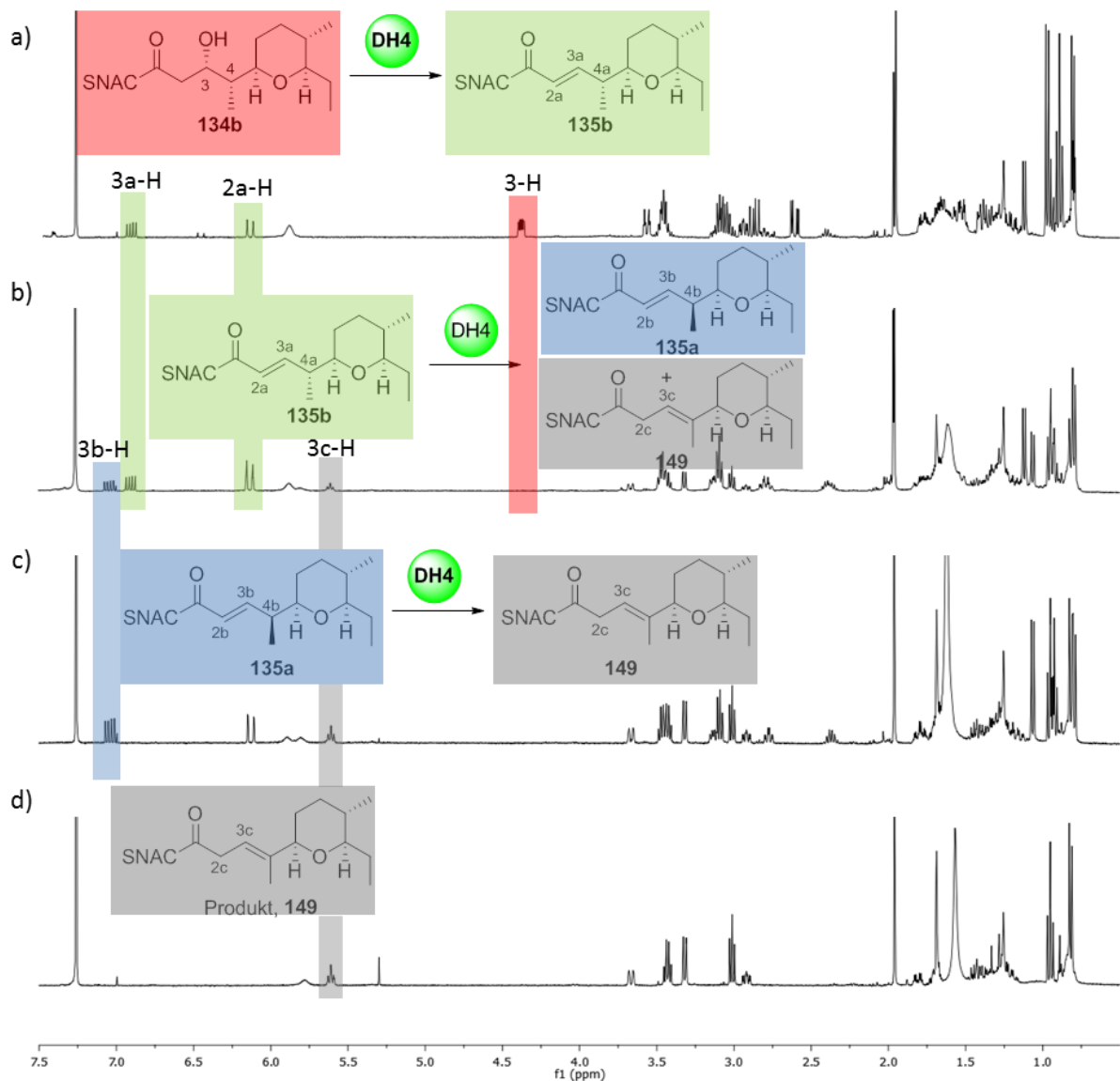


Abbildung 41: ^1H NMR spektroskopische Analyse der Umsetzung mit His₆-AmbDH4 im semi-präparativen Maßstab. a) Über Nacht Inkubation von **134b** mit His₆-AmbDH4; b) Über Nacht Inkubation von **135b** mit His₆-AmbDH4; c) Über Nacht Inkubation von **135a** mit His₆-AmbDH4; d) Referenzspektrum der aus enzymatischer Umsetzung erhaltenen Verbindung **149** nach Reinigung mittels Umkehrphasen-HPLC. Die charakteristischen Signale sind in grau hervorgehoben. Alle Spektren wurden in CDCl_3 bei 400 MHz aufgenommen. Enzymaktivitätstestbedingungen: HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.5), 37 °C, 175 Upm, 16 h, Proteinkonzentration: 1.5-2.0 mg/mL, Substratkonzentration: 2-3 mM.

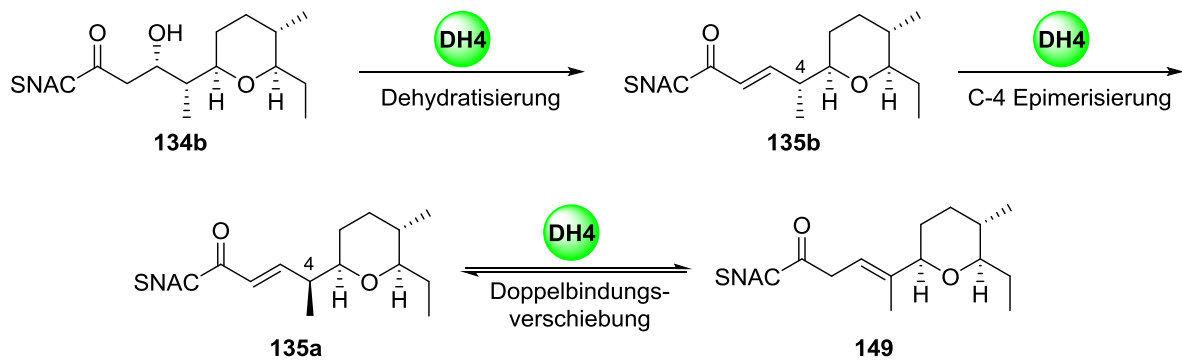
Im semi-präparativen Maßstab konnte bestätigt werden, dass ausschließlich **134b** von AmbDH4 akzeptiert und dehydratisiert wird. In Abbildung 41a ist das ^1H NMR-Spektrum nach der enzymatischen Umsetzung von **134b** mit His₆-AmbDH4 und extraktiver Aufarbeitung gezeigt. Charakteristisch für eine erfolgreich ablaufende Dehydratisierung sind die Signale bei 6.90 ppm (dd, $J = 7.0, 15.5$ Hz, 3a-H) und 6.13 ppm (dd, $J = 1.0, 15.7$ Hz, 2a-H). Die große Kopplungskonstante von ca. 15.6 Hz ist charakteristisch für eine vicinale 3J -Kopplung an (*E*-konfigurierten Olefinen. Die 4J -Allylkopplung von 1.0 Hz kann nur auftreten wenn es sich beim Produkt um die α,β -ungesättigte Verbindung **135b** handelt, da im Fall des β,γ -

ungesättigten Produkts **149** aufgrund des veränderten Substitutionsmusters der Doppelbindung keine Allylkopplung möglich ist. Weiterhin lag für das erhaltene Produkt **135b** aus der enzymatischen Umsetzung eine synthetische Referenzverbindung vor, so dass bestätigt werden konnte, dass AmbDH4 selektiv die α,β -Dehydratisierung katalysiert. Anhand des ^1H NMR-Spektrums wurde ein Umsatz von 29% nach 16 h Reaktionszeit kalkuliert.

In Abbildung 41b ist das ^1H NMR-Spektrum nach der enzymatischen Umsetzung von **135b** mit His₆-AmbDH4 gezeigt. Das ^1H NMR-Spektrum weist die Signalsätze für drei verschiedene Verbindungen auf. Das Signal bei 6.90 ppm ist charakteristisch für die nicht vollständig umgesetzte Ausgangsverbindung **135b**. Das neu hinzugekommene Dublett von Dubletts bei 7.04 ppm (dd, $J = 7.7, 15.9$ Hz, 3b-H) ist charakteristisch für das C-4-Epimer der eingesetzten Verbindung **135a** (32% Umsatz kalkuliert anhand des ^1H NMR-Spektrums). Das zusätzliche hochfeldverschobene Multipllett im olefinischen Bereich zwischen 5.67-5.61 ppm (3c-H) weist daraufhin, dass eine Doppelbindungsisomerisierung von der α,β - in die β,γ -Position stattgefunden haben muss (26% Umsatz ausgehend von **135b**, kalkuliert anhand des ^1H NMR-Spektrums). Anhand des ^1H NMR-Spektrums ergibt sich ein Verhältnis von **135b:135a:149** von 2.0:1.4:1.2. Eine Rückreaktion zur hydratisierten Verbindung konnte nicht beobachtet werden, so dass davon auszugehen ist, dass das Gleichgewicht dieser Reaktion stark auf der Seite der dehydratisierten Verbindung liegt.

Für die direkte Inkubation von **135a** mit His₆-AmbDH4 über Nacht konnte ausschließlich die Bildung des β,γ -ungesättigten Produkts **149** mit einem Umsatz von 45% (kalkuliert anhand des ^1H NMR-Spektrums) und keine Rückreaktion zum C-4-Epimer **135b** beobachtet werden (Abbildung 41c). Dieses Ergebnis zeigt, dass es sich bei dem erhaltenen epimerisierten Intermediat **135a** nicht um ein Nebenprodukt handelt.

Bei der Doppelbindungsisomerisierung handelt es sich um eine reversible Reaktion. Bei Inkubation der β,γ -ungesättigten Verbindung **149** mit His₆-AmbDH4 über Nacht konnte die Isomerisierung der Doppelbindung zurück in die thermodynamisch günstigeren α,β -Position mit 47% Umsatz (kalkuliert anhand des ^1H NMR-Spektrums, für ^1H NMR-Spektrum s. Anhang 7.3) beobachtet werden.



Schema 42: Durch AmbDH4 katalysierter Schritte zur Verschiebung der Doppelbindung von der α,β - in die β,γ -Position.

Anhand der durchgeführten Enzymaktivitätstests resultiert, dass es sich bei der Dehydratase-Domäne AmbDH4 um ein multikatalytisches Enzym handelt und die in Schema 42 dargestellte Reaktionsreihenfolge durchlaufen wird. Neben der α,β -Dehydratisierung wird im nachfolgenden Schritt eine C-4-Epimerisierung katalysiert, gefolgt von der Doppelbindungsverschiebung von der thermodynamisch günstigen α,β -Position in die thermodynamisch ungünstigere β,γ -Position (Schema 42).

Für die Charakterisierung der SAM-abhängigen C-Methyltransferase AmbM wurde lösliches His₆-AmbM-Fusionsprotein aus der heterologen Genexpression ausgehend vom Plasmid pET28a(+)_ambM in *E. coli* BL21(DE3) verwendet. Da eine Isolierung der C-Methyltransferase nicht erfolgreich war, wurden die *in vitro* Aktivitätstests mit dem Totallysat direkt nach Zellaufschluss durch Ultraschall und den Verbindungen **135a** und **149** über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Als Methyl donor wurde S-Adenosyl-L-Methionin in Form des Tosylat-Salzes verwendet. Durch die Verwendung des Totallysats war es notwendig eine Reihe von Kontrollexperimenten durchzuführen, um die katalytische Aktivität von AmbM zu bestätigen und Nebenreaktionen auszuschließen. Nach extraktiver Aufarbeitung mit EtOAc erfolgte die Analyse der Extrakte mittels HPLC-MS.

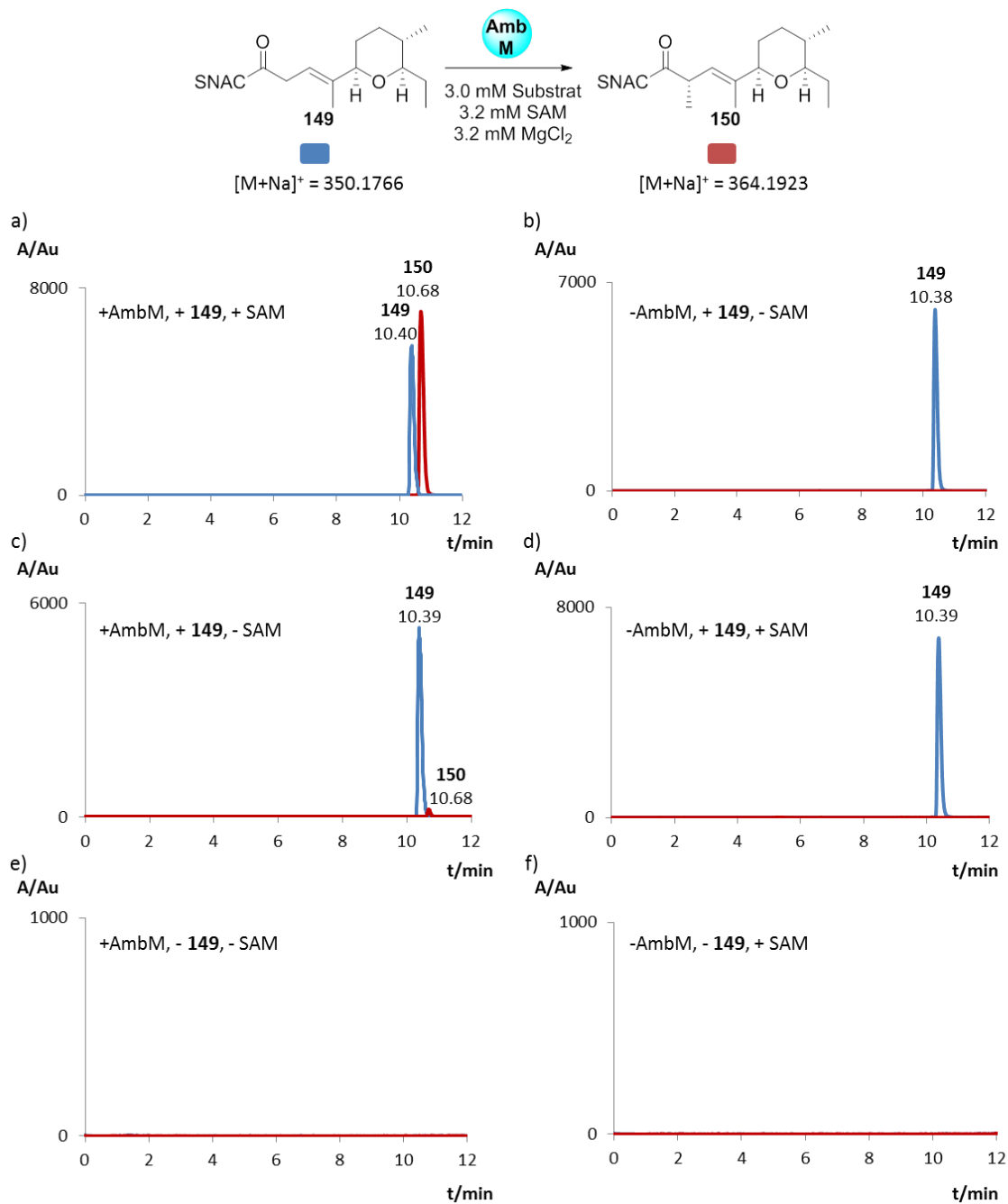


Abbildung 42: HPLC-MS Analyse der *in vitro* Enzymaktivitätstests der C-Methyltransferase AmbM mit **149** und der zugehörigen Kontrollexperimente nach extraktiver Aufarbeitung mit EtOAc. a) Über Nacht Inkubation von **149** mit His₆-AmbM und SAM als Kofaktor; b) Über Nacht Inkubation von **149**; c) Über Nacht Inkubation von **149** mit His₆-AmbM ohne SAM; d) Über Nacht Inkubation von **149** mit SAM ohne His₆-AmbM; e) Über Nacht Inkubation von His₆-AmbM; f) Über Nacht Inkubation von SAM. Für unprozessierte HPLC-MS-Spektren s. Anhang 7.3. Die Enzymaktivitätstests und die zugehörigen Kontrollexperimente wurden in HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.5) mit MgCl₂-Zusatz (3.2 mM) in einem Totalvolumen von 200 µL bei 37 °C über Nacht durchgeführt. Substratkonzentration: 3.0 mM; SAM-Konzentration: 3.2 mM.

In Abbildung 42a ist das Chromatogramm der enzymatischen Umsetzung von **149** mit His₆-AmbM unter Zusatz von SAM als Kofaktor gezeigt. Neben dem Eduktsignal bei einer Retentionszeit von 10.40 min und einem Masse-Ladungs-Verhältnis von $[M+Na]^+ = 350$ ist

ein zweites Signal bei 10.68 min höherer Intensität mit einem Masse-Ladungs-Verhältnis von $[M+Na]^+ = 364$ zu erkennen, was der Masse des α -methylierten Produktes **150** entspricht.

Zur Überprüfung ob **149** unter den gewählten Bedingungen stabil ist, wurde **149** über Nacht in HEPES-Puffer bei 37 °C inkubiert. Nach extraktiver Aufarbeitung konnte mittels HPLC-MS ausschließlich das Edukt mit einer Retentionszeit von 10.38 min nachgewiesen werden (Abbildung 42b), wodurch spontane durch den Puffer katalysierte Reaktionen ausgeschlossen werden können.

In Abbildung 42c ist das Chromatogramm der enzymatischen Umsetzung von **149** mit His₆-AmbM ohne Zusatz von SAM gezeigt. Neben dem Eduktsignal bei einer Retentionszeit von 10.39 min ist ebenfalls das Signal des vermeintlichen Produktes bei 10.68 min mit deutlich geringerer Intensität zu erkennen. Dass ohne Zusatz von SAM trotzdem in geringeren Mengen die α -Methylierung zu beobachten war, ist darauf zurückzuführen, dass in *E. coli* die Adenosylmethionsynthase die Synthese von SAM aus ATP und Methionin katalysiert. Durch die Verwendung des Totallysats sind somit immer Spuren von SAM vorhanden, die als Kofaktor für AmbM fungieren und die Methylierung in geringen Mengen katalysieren können.¹²¹

Aus Abbildung 42d geht hervor, dass **149** keine spontanen, unspezifischen Reaktionen mit dem Methyl donor SAM eingeht.

Zum Ausschluss von Hintergrundsignalen aus der komplexen Reaktionslösung im untersuchten Massenbereich wurde reines Totallysat (Abbildung 42e) und SAM in HEPES-Puffer (Abbildung 42f) unter den Standardenzymaktivitätstestbedingungen inkubiert, extraktiv aufgearbeitet und analysiert.

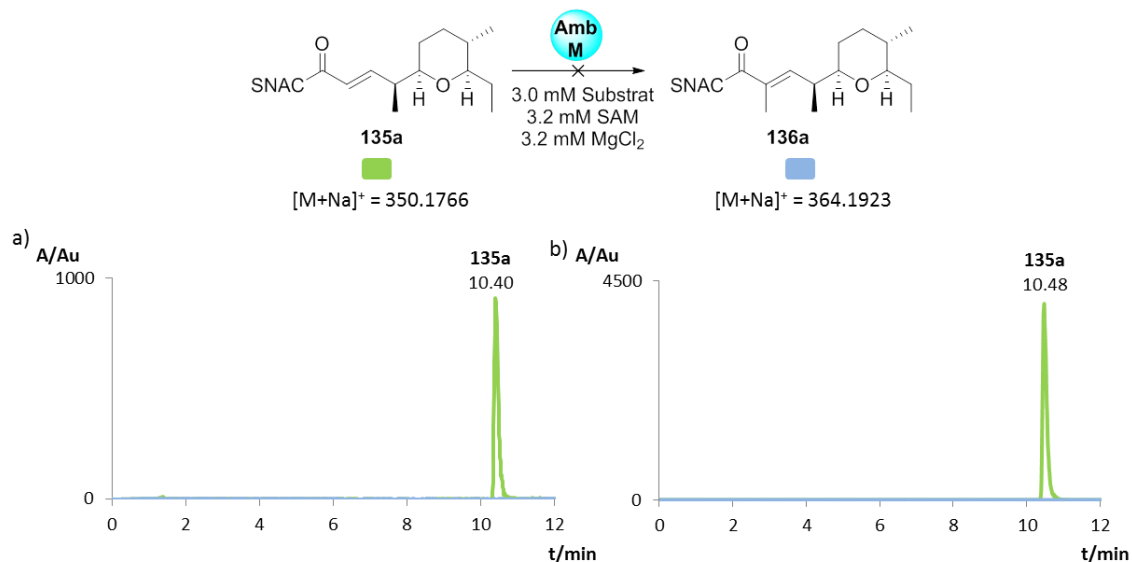


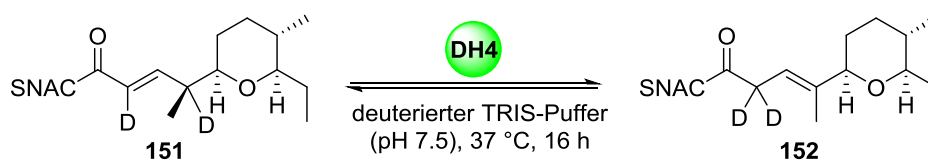
Abbildung 43: HPLC-MS Analyse der *in vitro* Enzymaktivitätstests der C-Methyltransferase AmbM mit **135a**. a) Über Nacht Inkubation von **135a** mit His₆-AmbM und SAM als Kofaktor; b) Über Nacht Inkubation von **135a**. Die Enzymaktivitätstests und die zugehörigen Kontrolleexperimente wurden in HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.5) mit MgCl₂-Zusatz (3.2 mM) in einem Totalvolumen von 200 µL bei 37 °C über Nacht durchgeführt. Substratkonzentration: 3.0 mM; SAM-Konzentration: 3.2 mM.

Zur Untersuchung der Substratspezifität von AmbM und zur Verifizierung der zeitlichen Abfolge von Doppelbindungsisomerisierung und α-Methylierung wurden *in vitro* Untersuchungen mit AmbM und der α,β-ungesättigten Verbindung **135a** unter identischen Bedingungen durchgeführt.

In Abbildung 43a ist das Chromatogramm der enzymatischen Umsetzung von **135a** mit His₆-AmbM und SAM als Kofaktor gezeigt. Es konnte ausschließlich das Eduktsignal bei einer Retentionszeit von 10.40 min mit einem Masse-Ladungs-Verhältnis von [M+Na]⁺=350 detektiert werden. Zur Überprüfung der Substratstabilität unter den gewählten Bedingungen wurde **135a** über Nacht in HEPES-Puffer inkubiert. Nach extraktiver Aufarbeitung war ebenfalls nur das zu erwartende Eduktsignal bei einer Retentionszeit von 10.48 min detektierbar (Abbildung 43b). Weitere Kontrolleexperiment zum Ausschluss von spontanen oder unspezifischen Reaktionen und Hintergrundsignal-Artefakten zeigten keine unerwarteten Ergebnisse. Die zugehörigen Chromatogramme sind im Anhang zu finden (s. Anhang 7.3).

Basierend auf den Ergebnissen ist davon auszugehen, dass in der Ambruticin-Biosynthese zunächst die Doppelbindungsisomerisierung von der α,β- in die β,γ-Position erfolgen muss, bevor es zur Methylierung der α-Position kommt.

Zur Aufklärung der Funktion von AmbM wurden von REEVES *et al.* Gendeletionsexperimente durchgeführt. Die Kultivierung der $\Delta ambM$ -Mutante führte zur Produktion von 15-Desmethylverbindungen aller Wildtyp-Ambruticine, allerdings in geringeren Ausbeuten wahrscheinlich bedingt durch die Substratspezifität einiger *post*-PKS Enzyme. In den Studien zur Ambruticin-Produktion konnten keine Derivate ohne nicht-konjugiertes Diensystem nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich, dass die Ketosynthase von Modul 5 (KS5) nur β,γ -ungesättigte Substrate akzeptiert, aber Desmethylintermediate weiter prozessieren kann. Dies kommt jedoch nur bei der $\Delta ambM$ -Deletionsmutante zum Tragen, da unter Wildtypbedingungen scheinbar AmbM eine höhere spezifische katalytische Effizienz für das Desmethylintermediat aufweist.³¹



Schema 43: Enzymatische Umsetzung von **135a** mit AmbDH4 in deuteriertem TRIS-Puffer für die Untersuchung des Mechanismus der Doppelbindungsverschiebung.

Zur Aufklärung des Mechanismus der Doppelbindungsverschiebung wurde die AmbDH4 katalysierte Umsetzung von **135a** zu **149** in Anlehnung an die Studien von SCHÄBERLE *et al.*⁶⁰ und KEATINGE-CLAY *et al.*⁵⁹ in deuteriertem TRIS-Puffer (40 mM TRIS, pH 7.5) im semi-präparativen Maßstab unter gleich bleibenden Bedingungen wiederholt (Schema 43). Ein Enzymaktivitätsverlust bedingt durch den Pufferwechsel von HEPES- zu TRIS-Puffer konnte ausgeschlossen werden. Der Austausch von Wasserstoff (H) gegen Deuterium (D) kann NMR-spektroskopisch sehr gut verfolgt werden, da durch eine teilweise oder vollständige Deuterierung eine veränderte Signalintensität des betrachteten Protons und ein verändertes Aufspaltungsmuster benachbarter Protonen resultiert.

Der H/D-Austausch kann enzymatisch katalysiert erfolgen, vermutlich durch das katalytisch aktive Histidin (H51). Wie bereits durch die beschriebenen *in vitro* Studien gezeigt, handelt es sich bei der Doppelbindungsisomerisierung um eine reversible Reaktion. Bedingt dadurch, können die inkorporierten Deuterium-Atome zwischen der α - und γ -Position hin und her verschoben werden. Somit müsste für **135a** eine Deuterierung der α - und γ -Position und für **149** eine einfache oder zweifache Deuterierung der α -Position resultieren (Schema 43). Bei Beteiligung des katalytisch aktiven Histidins an der Doppelbindungsisomerisierung muss es in den Deuterierungsexperimenten zunächst zum Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium

am Histidin kommen. Erst im Anschluss ist ein enzymatisch bedingter Einbau von Deuterium am Substrat möglich.

Nach der Umsetzung von **135a** zu **149** mit AmbDH4 in deuteriertem TRIS-Puffer und Extraktion mit EtOAc erfolgte die Analyse mittels ^1H NMR-Spektroskopie. Für eine bessere Auswertung der erhaltenen Ergebnisse aus den Deuterierungsexperimenten wurden Edukt und Produkt durch Umkehrphasen-HPLC getrennt und anschließend NMR spektroskopisch analysiert. Als Kontrollexperimente und um auszuschließen, dass es sich bei den erhaltenen Ergebnissen um Lösungsmittel-Artefakte handelt, wurden **135a** und **149** einzeln in deuteriertem TRIS-Puffer ohne His₆-AmbDH4 bei 37 °C über Nacht inkubiert, extraktiv aufgearbeitet und NMR spektroskopisch vermessen.

Durch das Kontrollexperiment, bestehend aus **149** in deuteriertem TRIS-Puffer, konnte ein spontaner H/D-Austausch ohne enzymatischen Einfluss NMR-spektroskopisch ausgeschlossen werden.

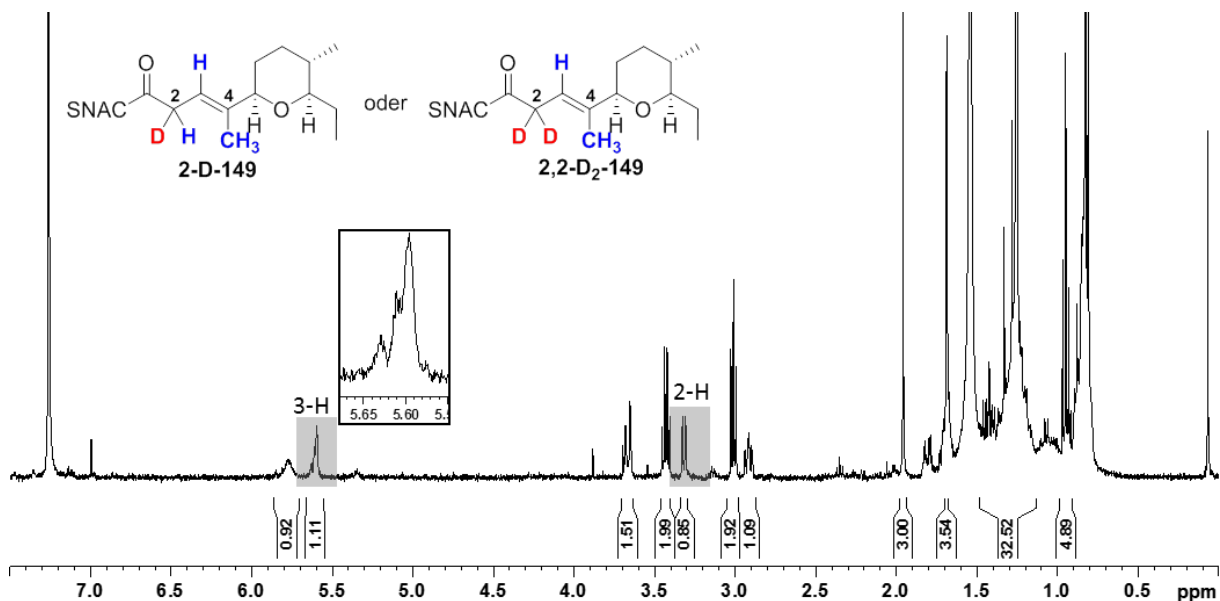


Abbildung 44: ^1H NMR-Spektrum des Kontrollperiments zur Untersuchung der spontanen Deuterium Inkorporation bei Inkubation von **149** in deuteriertem TRIS-Puffer.

Das Kontrollexperiment mit **149** zeigte bereits in deuteriertem TRIS-Puffer ohne AmbDH4-Zusatz einen spontanen H/D-Austausch an C-2 (Abbildung 44). Das Signal bei 5.61 ppm (3-H) zeigt bei gleich bleibender Signalintensität ein verändertes Aufspaltungsmuster, welches nur durch einen H/D-Austausch an C-2 verursacht werden kann. Eine zweifache Deuterierung in der α -Position würde zu einem Singulett für 3-H führen. Die einfache Deuterierung dieser Position resultiert in einem Dublett. Weiterhin ist im Kontrollexperiment eine Verringerung der Signalintensität des ursprünglichen Dubletts bei 3.32 ppm (2-H) von 2 auf 0.85 zu

beobachten, so dass davon ausgegangen werden kann, dass eines der beiden Wasserstoffatome an C-2 gegen Deuterium ausgetauscht wurde.

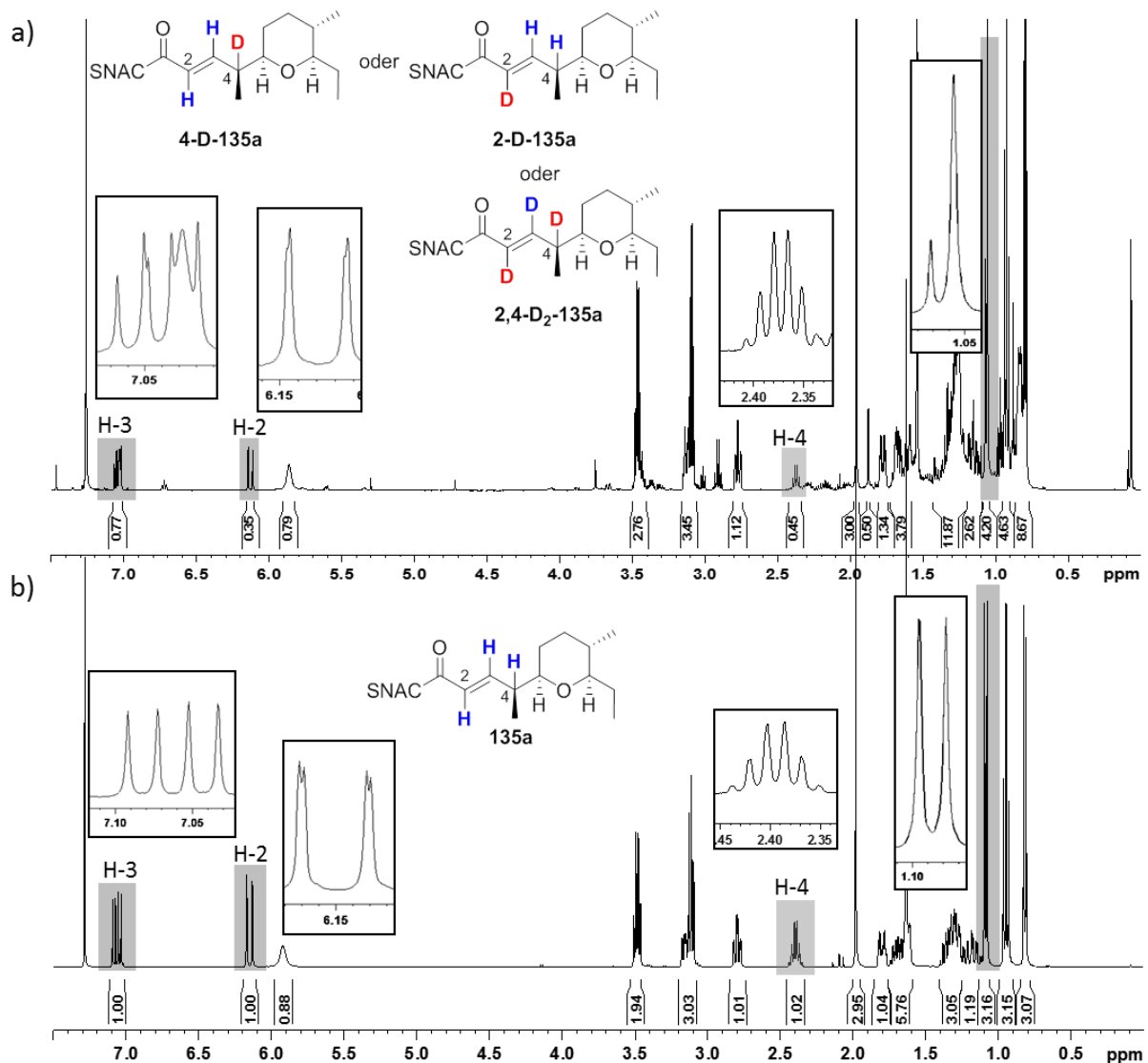


Abbildung 45: a) ^1H NMR-Spektrum von **135a** nach Umsetzung mit His₆-AmbDH4 in deuteriertem TRIS-Puffer und Reinigung durch Umkehrphasen-HPLC; b) Referenzspektrum der nicht deuterierten Verbindung **135a**. Die charakteristischen Signale sind als vergrößerte Ausschnitte hervorgehoben. Alle ^1H NMR-Spektren wurden bei 400 MHz in CDCl_3 aufgenommen.

In Abbildung 45a ist das ^1H NMR-Spektrum der Ausgangsverbindung **135a** nach enzymatischer Umsetzung mit His₆-AmbDH4 in deuteriertem TRIS-Puffer und Reinigung durch Umkehrphasen-HPLC gezeigt. Beim direkten Vergleich mit dem ^1H NMR-Spektrum der nicht-deuterierten Referenzverbindung (Abbildung 45b) fällt die veränderte Signalintensität und das veränderte Aufspaltungsmuster im olefinischen Bereich auf. Für die nicht-deuterierte Verbindung **135a** ergibt sich für 3-H ein Dublett von Dubletts bei 7,06 ppm. Nach der Inkubation von **135a** in deuteriertem TRIS-Puffer resultiert ein leicht verschobenes Signal bei 7,04 ppm, welches das ursprüngliche Dublett von Dubletts beinhaltet. Dies ist auf die im

Gemisch vorliegende nicht-deuterierte Ausgangsverbindung **135a** zurückzuführen. Zusätzlich liegt im betrachteten Signalbereich der ^{13}C -Satellit des Chloroformsignals. Über die H-D-Kupplungen kann keine genaue Aussage gemacht werden, da diese in der Regel sehr klein (zwischen 1-2 Hz) und in dem Signal nicht erkennbar sind. Dieses veränderte Aufspaltungsmusters ist bedingt durch einen teilweisen H/D-Austausch sowohl an der α - als auch an der γ -Position. Durch die Substitution an der α -Position entfällt die vinicale ^3J -Kopplung und an der γ -Position die geminale Kopplung mit dem Wasserstoffatom an C-3. Die veränderte Signalintensität von 1H auf 0.8H kann nicht auf den vermeintlich enzymatisch katalysierten H/D-Austausch zurückgeführt werden, da die β -Position nicht in den Doppelbindungsisomerisierungsmechanismus involviert ist. Das ursprüngliche Dublett von Dubletts bei 6.12 ppm (2-H) erfährt ebenfalls eine Veränderung der Signalintensität und des Aufspaltungsmusters. Die ^4J -Allylkopplung ist nur noch in Ansätzen zu erkennen, was durch den H/D-Austausch an der γ -Position resultiert. Der Einbau von Deuterium an C-4 wird ebenfalls durch das veränderte Aufspaltungsmuster und die veränderte Intensität des Signals der Methylgruppe an C-4 bei 1.06 ppm bestätigt.

Anhand der verringerten Signalintensität kann ein Restprotonengehalt sowohl an der α -Position als auch an der γ -Position (H-4) von 45% kalkuliert werden.

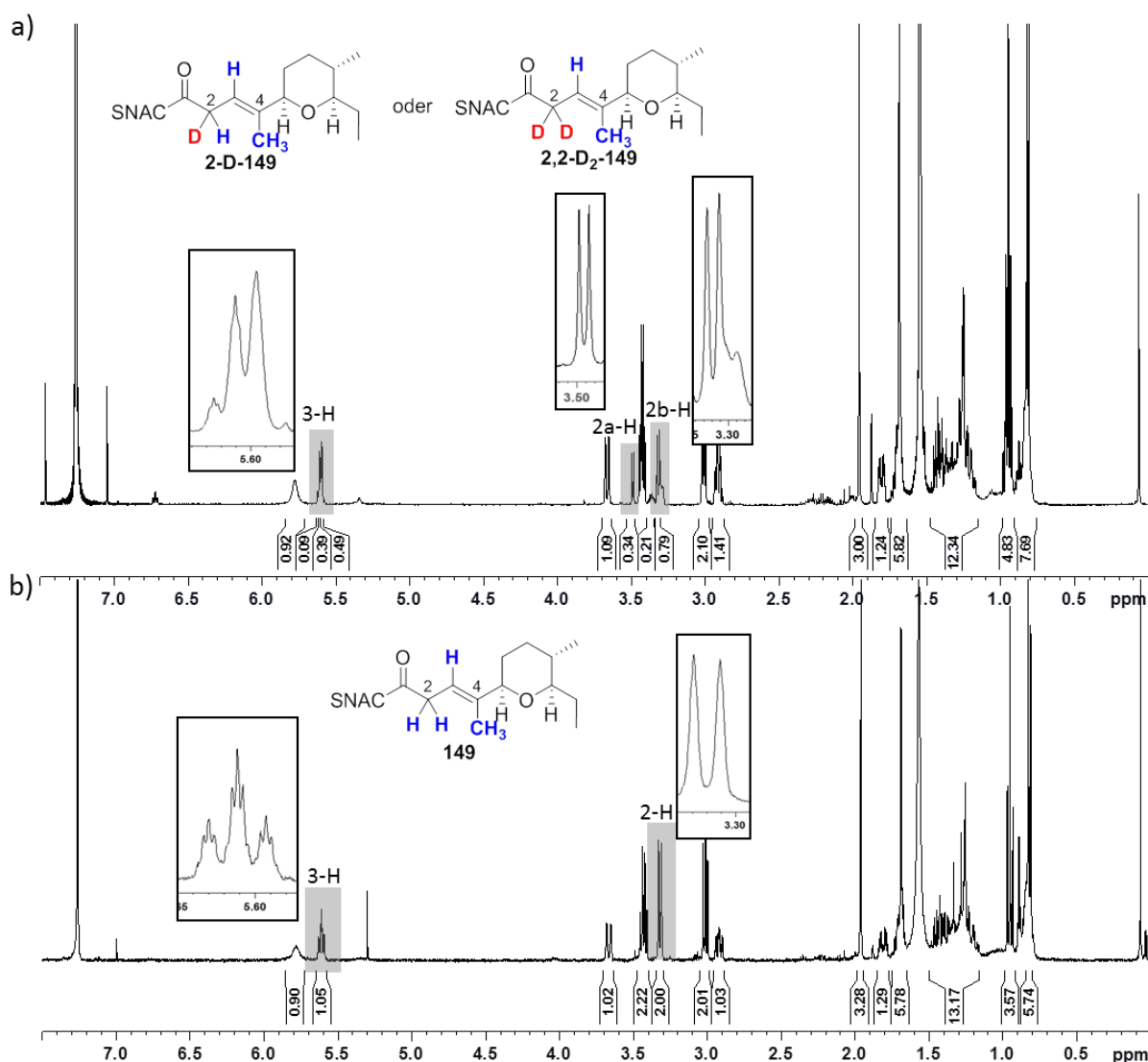
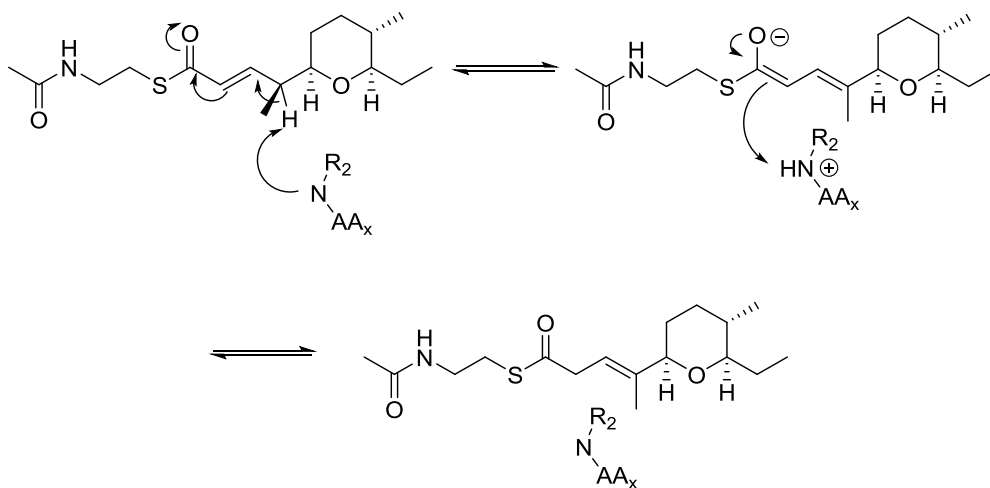


Abbildung 46: a) ¹H NMR-Spektrum von **149** nach Umsetzung mit His₆-AmbDH4 in deuteriertem TRIS-Puffer und Reinigung durch Umkehrphasen-HPLC; b) Referenzspektrum der nicht deuterierten Verbindung **149**. Die charakteristischen Signale sind als vergrößerte Ausschnitte hervorgehoben. Alle ¹H NMR-Spektren wurden bei 400 MHz in CDCl₃ aufgenommen.

In Abbildung 46a ist das ¹H NMR-Spektrum des Produkts **149** nach enzymatischer Umsetzung von **135a** mit His₆-AmbDH4 in deuteriertem TRIS-Puffer und Reinigung durch Umkehrphasen-HPLC gezeigt. Der Vergleich mit dem ¹H NMR-Spektrum der nicht deuterierten Verbindung **149** (Abbildung 46b) zeigt eine deutliche Veränderung des Aufspaltungsmusters bei gleich bleibender Intensität des Signals bei 5.61 ppm (3-H). Das veränderte Aufspaltungsmuster kann nur durch eine einfache oder zweifache Deuterierung der α-Position hervorgerufen werden. Im betrachteten Signalbereich ist wie auch bei der Ausgangsverbindung **149** (Abbildung 46b, 3-H) immer noch teilweise die erhaltene gebliebene Allylkopplung zu erkennen. Die zweifache Deuterierung der α-Position resultiert in einem Singulett, welches auch im betrachteten Signalbereich zu erkennen ist. Durch eine

Monodeuterierung der α -Position würde das 3-H Signal ein Dublett resultieren, was im betrachteten Signalbereich auch zu erkennen ist. Das zusätzlich neue Dublett bei einer chemischen Verschiebung von 3.49 ppm (2a-H) und die Verringerung der Signalintensität des Dubletts bei 3.32 ppm von 2 auf 0.8 stützen die Theorie der Monodeuterierung in der α -Position. Die 3J -Kopplung zwischen 3-H und 2-H beträgt in beiden Fällen 7.2 Hz. Die Einführung eines Deuteriumatoms in der α -Position würde zu zwei diastereomeren Verbindungen führen. Die beiden erhaltenen monodeuterierten Verbindungen müssten für das Signal des verbliebenden Wasserstoffatoms an C-2 unterschiedliche chemische Verschiebungen im ^1H NMR Spektrum aufweisen. Für eine eindeutige Zuordnung des neu entstanden Signals bei 3.49 ppm müssten 2D-NMR spektroskopische Messungen (COSY, HSQC) durchgeführt werden, was jedoch bedingt durch die Instabilität von Verbindung **2-D-149/2,2-D₂-149** über einen längeren Zeitraum nicht möglich war.



Schema 44: Postulierter Mechanismus der Doppelbindungsisomerisierung katalysiert durch eine basische Aminosäure (AAx) basierend auf den Ergebnissen aus den Deuterierungsexperimenten und den Studien von SCHÄBERLE *et al.* und KEATINGE-CLAY *et al.*.^{59,60}

SCHÄBERLE *et al.* konnten in ihren Studien zur Enoylisomerase (EI)-Domäne aus der Corallopyronin A-Biosynthese und durch die Generierung einer Punktmutante des katalytisch aktiven Histidins in Kombination mit Deuterierungsexperimenten zeigen, dass dieses als Protonendonator und -akzeptor fungiert und somit an Hin- und Rückreaktion beteiligt ist. Weiterhin wurde postuliert, dass eine zweite unbekannte Aminosäure die Abstraktion des γ -Protons katalysieren muss.⁶⁰ Basierend auf der Strukturaufklärung der EI-Domäne aus dem Bacillaen-Biosyntheseweg postulierten KEATINGE-CLAY *et al.* einen modifizierten Mechanismus in dem das katalytisch aktive Histidin nicht nur die Abstraktion

eines Protons an der γ -Position katalysiert, sondern auch die Verschiebung des Protons zwischen α - und γ -Position.⁵⁹

Im Fall der in dieser Arbeit untersuchten AmbDH4-Domäne können anhand der erhaltenen Ergebnisse erste mechanistische Rückschlüsse gezogen werden. Aus den durchgeführten Inkubationsexperimenten in deuteriertem TRIS-Puffer mit oder ohne AmbDH4-Zusatz kann geschlussfolgert werden, dass AmbDH4 nicht aktiv an der Deuterium-Inkorporation beteiligt ist. Daraus resultiert, dass vermutlich weder ein D_2O -Molekül aus dem Puffer noch eine zunächst deuterierte Aminosäure am katalytischen Prozess beteiligt ist. Es ist höchstwahrscheinlich, dass erst eine spontane Deuterium-Inkorporation an der C-2 Position von **149** erfolgt. Ein basische, bis jetzt unbekannte Aminosäure im aktiven Zentrum von AmbDH4 katalysiert vermutlich anschließend die Verschiebung des Deuterium-Atoms zwischen der α - und γ -Position (Schema 44).

Zur Verifizierung ob das katalytisch aktive Histidin (H51) von AmbDH4 nicht nur in die Dehydratisierung, sondern ebenfalls in die Doppelbindungsisomerisierung involviert ist, müssten spezifische Punktmutanten von Aminosäuren im und am aktiven Zentrum erzeugt und getestet werden. Weiterhin könnte durch den selektiven Einsatz der beiden möglichen Diastereomere der α -monodeuterierten β,γ -ungesättigten Verbindungen aufgeklärt werden, welches Proton von der α - in die γ -Position verschoben wird.

3.3 Etablierung der Dehydratase-Domäne AmbDH3 als chemoenzymatisches Werkzeug

Essentielle Eigenschaften von synthetisch angewandten Enzymen sind Substrattoleranz, die Möglichkeit Reaktionen mit diesen im (semi-)präparativen Maßstab durchführen zu können sowie eine leichte Zugänglichkeit und Handhabbarkeit. Im Rahmen dieser Arbeit sollten diesbezüglich initiale Untersuchungen durchgeführt werden.

3.3.1 Untersuchung des Substratspektrums von AmbDH3 – Synthetische Arbeiten

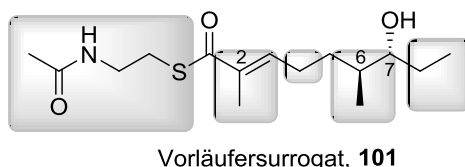


Abbildung 47: Vorläufersurrogat **101** der Dehydratase-Domäne AmbDH3. Die in grau hervorgehobenen Strukturelemente sollten für die Untersuchung der Substrattoleranz modifiziert werden.

Zur Untersuchung des Substratspektrums der Domäne AmbDH3 sollten verschiedene Modifizierungen am Vorläufersurrogat **101** (Abbildung 47) vorgenommen werden. Die Stereochemie an C-6 und C-7 sollte verändert, die Ethylseitenkette an C-7 durch verschiedene Substituenten ersetzt und die 2- und 6-Desmethylverbindung synthetisiert werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Variation des SNAC-Thioesters zu verschiedenen Thio- bzw. Carbonsäureestern von AmbDH3 toleriert wird und ob andere Ringgrößen zugänglich sind.

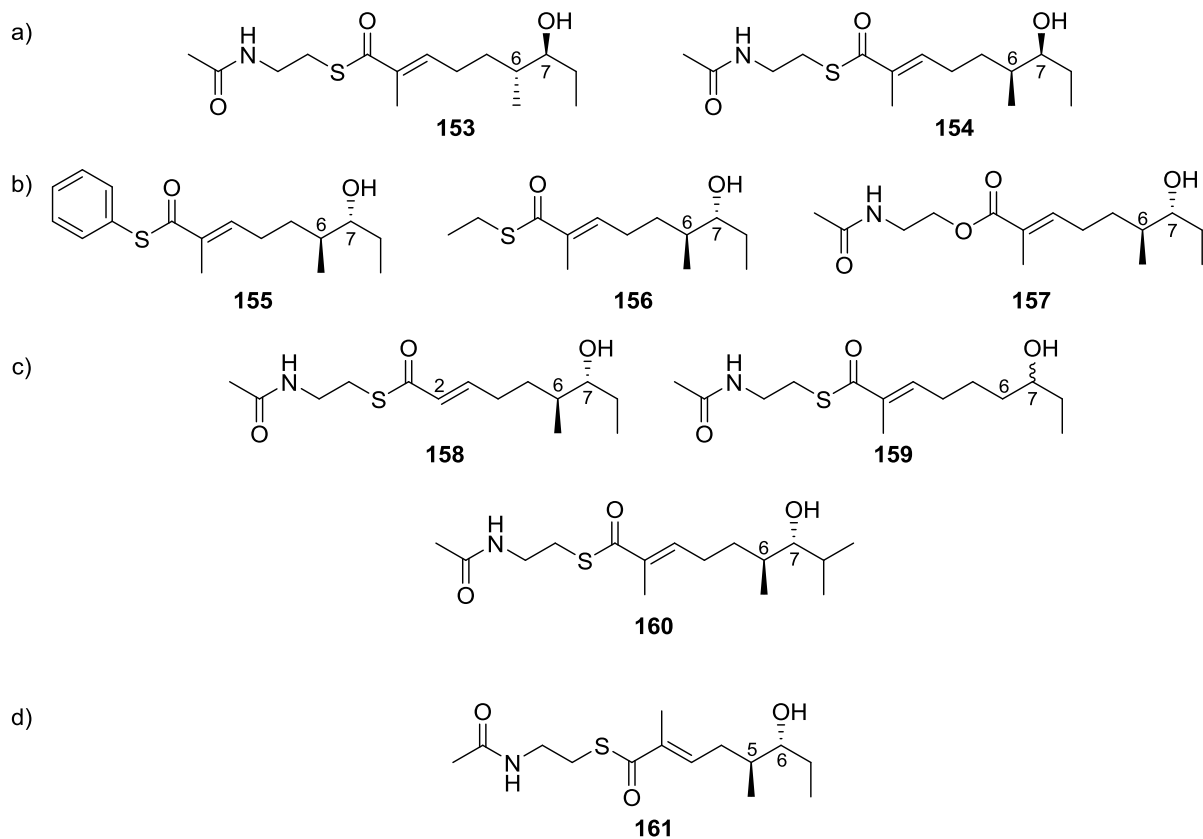
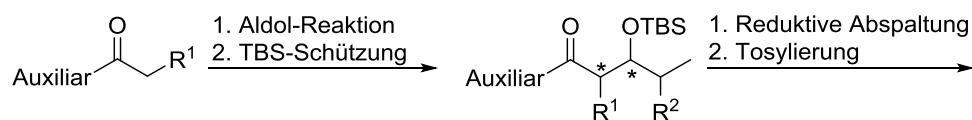


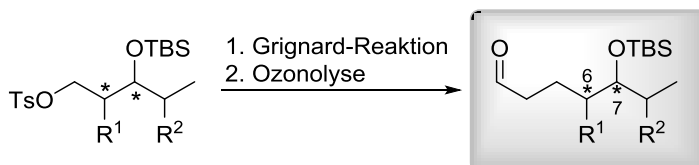
Abbildung 48: Übersicht der synthetisierten Substrate zur Untersuchung der Substratspezifität der Domäne AmbDH3. a) Substrate mit veränderter Stereochemie an C-6 und C-7; b) Substrate mit veränderter Esterfunktion; c) Substrate mit verändertem Substitutionsmuster an C-2, C-6 oder C-7; d) Substrat verkürzt um eine C-1 Einheit.

In Abbildung 48 sind alle in dieser Arbeit synthetisierten Substrate für die Untersuchung der Substratspezifität von AmbDH3 zusammengefasst. Die Synthesestrategie für alle Substrate basiert auf der bereits in Kapitel 3.1.1 vorgestellten Route zu den Testverbindungen für die biochemische Charakterisierung von AmbDH3. Im Folgenden werden die Syntheserouten verallgemeinert dargestellt. Für die mechanistischen Details siehe Kapitel 3.1.1 und 3.2.1.



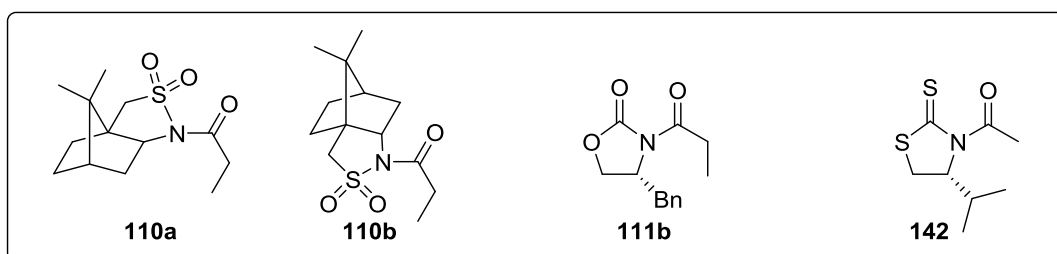
Auxiliar = **110a**, **110b**, **111b** oder **142**
 $R^1 = \text{CH}_3$ oder H

Auxiliar = **110a**, **110b**, **111b** oder **142**
 $R^1 = \text{CH}_3$ oder H
 $R^2 = \text{CH}_3$ oder H



$R^1 = \text{CH}_3$ oder H
 $R^2 = \text{CH}_3$ oder H

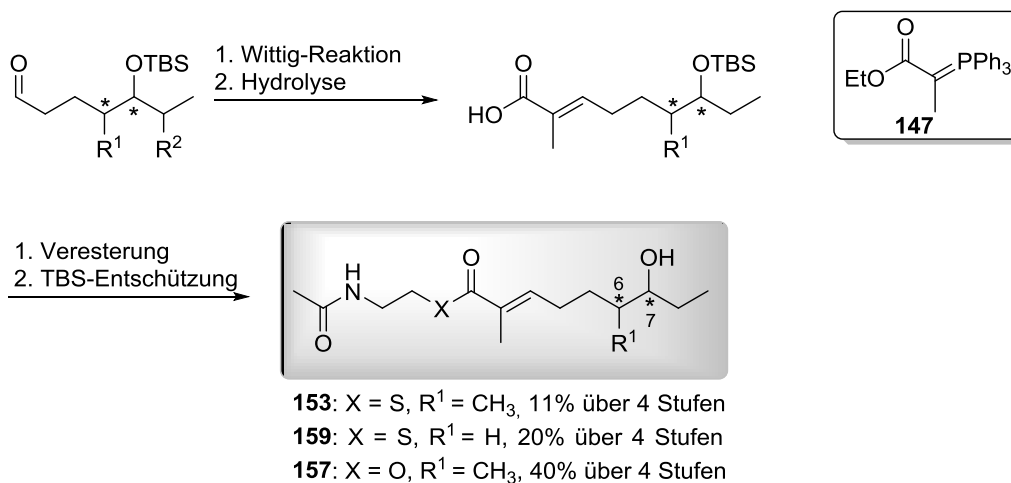
162: $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$, 33% über 6 Stufen (6D,7D)
163: $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$, 22% über 6 Stufen (6L,7L)
164: $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$, 28% über 6 Stufen (6D,7L)
165: $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{CH}_3$, 29% über 6 Stufen (6D,7D)
166: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{H}$, 23% über 6 Stufen (Enantiomergemisch)



Schema 45: Allgemeines Syntheschema für die Synthese der Vorläuferaldehyde **162**, **163**, **164**, **165** und **166**. Bei mit Sternchen markierten Zentren handelt es sich um definierte Stereozentren, welche der Übersicht halber nicht spezifiziert wurden. Bedingungen: *anti*-selektive MUKAIYAMA-Aldol-Reaktion: **110a** oder **110b**, TMSOTf, Et₃N, TiCl₄, C₃H₆O oder C₄H₈O, CH₂Cl₂, -78 °C, 1.5 h; *syn*-selektive EVANS-Aldol-Reaktion: **111b**, *n*BU₂BOTf, DIPEA, C₃H₆O, CH₂Cl₂, 0 °C auf -78 °C, 3 h; NAGAO-Acetat-Aldol-Reaktion: **142**, TiCl₄, DIPEA, C₃H₆O, CH₂Cl₂, -40 °C auf -78 °C, 30 min; TBS-Schätzung: 2,6-Lutidin, TBSOTf, CH₂Cl₂, -78 °C auf RT, über Nacht; Reduktive Abspaltung: LiBH₄, Et₂O:MeOH (20:1), 0 °C, über Nacht; Tosylierung: TsCl, Pyridin, CH₂Cl₂, 0 °C auf RT, 96 h; Substitution: C₃H₅BrMg, Et₂O, 45 °C, 3 h; Ozonolyse: PPh₃, CH₂Cl₂, -78 °C, 10 min. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome ist bezogen auf die finalen Produkte. In Klammern ist die C-6- und C-7-Konfiguration des jeweiligen erhaltenen Aldehyds angegeben.

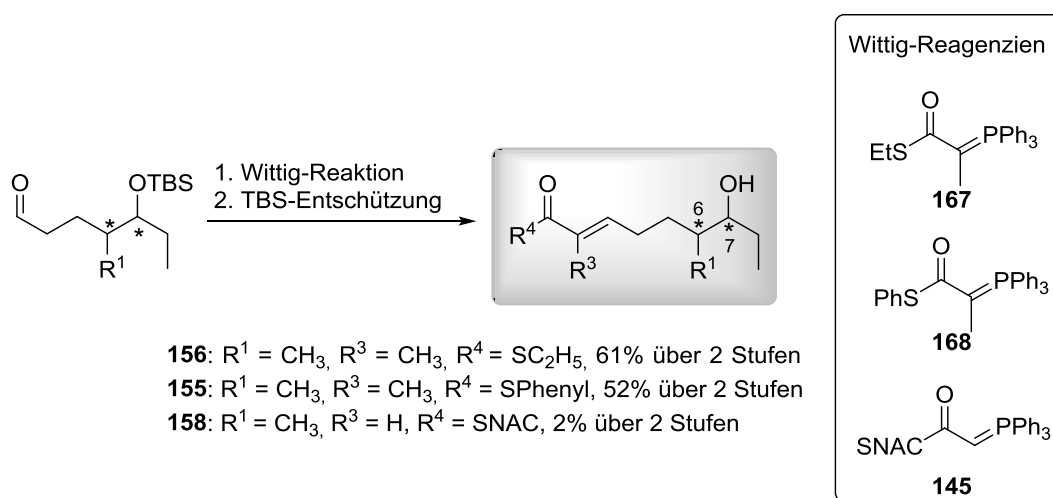
In Schema 45 ist die allgemeine Syntheseroute zur Generierung der Vorläuferaldehyde **162**, **163**, **164**, **165** und **166** gezeigt. Bereits in der ersten Stufe wurde die gewünschte Stereochemie an C-6 und C-7, Nummerierung bezogen auf die finalen Produkte, durch eine selektive Aldol-Reaktion eingeführt. Durch eine *anti*-selektive MUKAIYAMA-Aldol-Reaktion mit dem Auxiliar **110a** oder **110b** konnte die (6L,7L)-Konfiguration bzw. (6D,7D)-Konfiguration aufgebaut werden. Über eine *syn*-selektive EVANS-Aldol-Reaktion wurde die (6D,7L)-Konfiguration etabliert. Für die Synthese der 6-Desmethylverbindung **159** wurde in der ersten Stufe eine NAGAO-Acetat-Aldol-Reaktion durchgeführt. Alle erhaltenen Aldol-Produkte wurden direkt TBS-geschützt. Die Abspaltung des jeweiligen Auxiliars zum primären Alkohol erfolgte unter Verwendung von LiBH₄. Der primäre Alkohol wurde direkt in das

korrespondierende Tosylat überführt. Durch eine anschließende Substitutionsreaktion mit Allylmagnesiumbromid, gefolgt von einer Ozonolyse wurde der jeweilige Vorläufer-Aldehyd **162**, **163**, **164**, **165** oder **166** erhalten.



Schema 46: Allgemeines Syntheschema für Testverbindungen **153**, **159** und **157**. Bei mit Sternchen markierten Zentren handelt es sich um definierte Stereozentren, welche der Übersicht halber nicht spezifiziert wurden. Bedingungen: WITTIG-Reaktion: **147**, CH₂Cl₂, RT, über Nacht; Hydrolyse: LiOH·H₂O, MeOH:H₂O (3:1), 0 °C auf RT, über Nacht; Veresterung: *N*-Acetylcysteamin oder *N*-Acetylethanolamin, EDC·HCl, 4-DMAP, CH₂Cl₂, 0 °C auf RT, über Nacht; TBS-Entschützung: PPTS, MeOH, 50 °C, über Nacht.

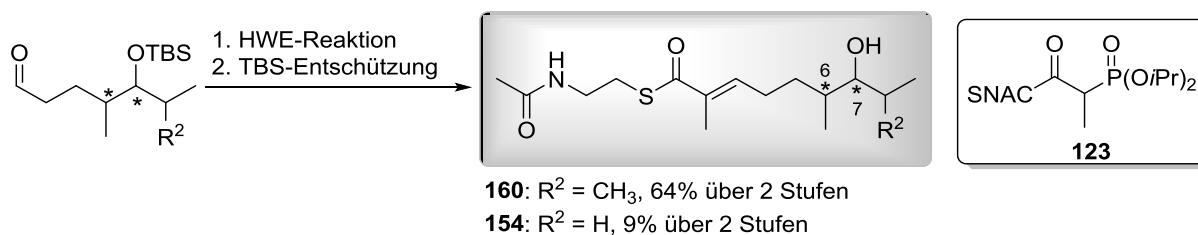
Ausgehend von Aldehyd **162**, **163** oder **166** wurde über eine (*E*)-selektive WITTIG-Reaktion mit dem Phosporan **147** und anschließender Hydrolyse die korrespondierenden TBS-geschützte Carbonsäure erhalten. Eine nachfolgende Veresterung mit *N*-Acetylcysteamin oder *N*-Acetylethanolamin, gefolgt von einer TBS-Entschützung ergab die Testverbindungen **153**, **159** und **157** (Schema 46).



Schema 47: Allgemeines Syntheschema für die Synthese der Testverbindungen **156**, **155** und **158**. Bei mit Sternchen markierten Zentren handelt es sich um definierte Stereozentren, welche der Übersicht halber nicht

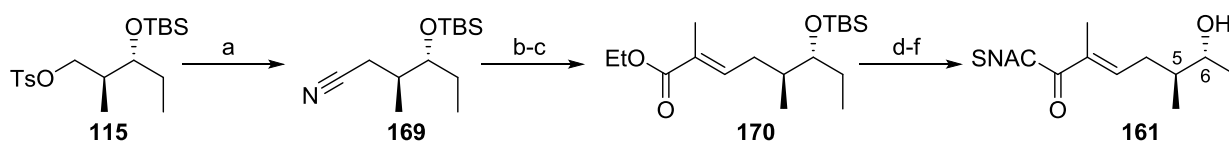
spezifiziert wurden. Bedingungen: WITTIG-Reaktion: **167**, **168** oder **145** CH₂Cl₂, RT, über Nacht; TBS-Entschützung: PPTS, MeOH, 50 °C, über Nacht.

Für die Testverbindungen **156**, **155** und **158** konnte die gewünschte Esterfunktion direkt durch Reaktion des korrespondierenden Aldehyds mit dem entsprechenden Phosphoran **167**, **168** oder **145** eingeführt werden. Nach TBS-Entschützung wurden die Testverbindungen **156**, **155** und **158** erhalten (Schema 47).



Schema 48: Allgemeines Syntheschema für die Synthese der Testverbindungen **160** und **154**. Bei mit Sternchen markierten Zentren handelt es sich um definierte Stereozentren, welche der Übersicht halber nicht spezifiziert wurden. Bedingungen: HWE-Reaktion: **123**, DBU, THF, 0 °C auf RT, über Nacht; TBS-Entschützung: PPTS, MeOH, 50 °C, über Nacht.

Über eine (*E*)-selektive HWE-Reaktion mit **123** und nachfolgender TBS-Entschützung konnte sowohl die Testverbindung mit Isopropylsubstitution an C-7 **160** als auch die (6*D*,7*L*)-konfigurierte Verbindung **154** synthetisiert werden (Schema 48).



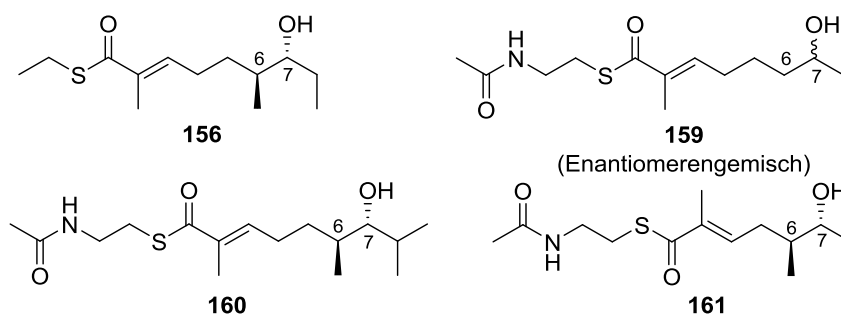
Schema 49: Synthese des Furanvorläufers **161**. Bedingungen: a) NaCN, DMSO, 3.5 h, 60 °C, 84%; b) DIBAL-H, CH₂Cl₂, -78 °C auf RT, 30 min; c) **147**, CH₂Cl₂, RT, über Nacht, 45% über 2 Stufen; d) LiOH·H₂O, MeOH:H₂O (3:1), 0 °C auf RT, über Nacht; e) HSNAC, EDC-HCl, 4-DMAP, CH₂Cl₂, 0 °C auf RT, über Nacht, 46% über 2 Stufen; f) PPTS, MeOH, 50 °C, über Nacht, 52%.

Zur Untersuchung, ob AmbDH3 bei Reaktion mit entsprechenden Vorläufermolekülen neben der Zyklisierung zu Hydropyranen auch die Bildung von Hydrofuranen katalysiert, sollte die Testverbindung **161** synthetisiert werden. Hierfür wurde wie in Schema 49 gezeigt Tosylat **115** in einer Substitutionsreaktion mit NaCN in das Nitril **169** in 84% Ausbeute überführt. Die anschließende Reduktion zum Aldehyd, gefolgt von einer (*E*)-selektiven WITTIG-Reaktion ergab **170** in moderaten Ausbeuten von 45% über zwei Stufen. Der Ethylester wurde hydrolysiert, zum SNAC-Thioester umgesetzt und nach TBS-Entschützung Testverbindung **161** erhalten.

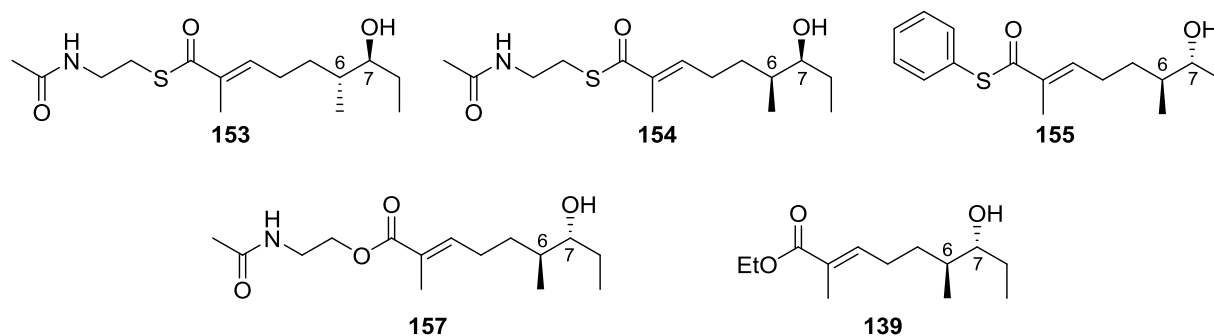
3.3.2 Untersuchung des Substratspektrums von AmbDH3 – Enzymaktivitätstests

Für die Untersuchung des Substratspektrums der Domäne AmbDH3 wurden *in vitro* Enzymaktivitätstests im semi-präparativen Maßstab bestehend aus dem jeweiligen synthetischen Substrat (Substratkonzentration: 2.5-3.0 mM) und dem durch Affinitätschromatographie und Entsalzung gereinigten His₆-AmbDH3 (Proteinkonzentration: 3.0-4.5 mg/ml) in HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.8) in einem Totalvolumen von 4 mL über Nacht bei 37 °C durchgeführt. Es handelt sich bei den gewählten Parametern um nicht optimierte Reaktionsbedingungen. Nach extraktiver Aufarbeitung mit EtOAc wurden die erhaltenen Extrakte NMR-spektroskopisch analysiert. Zum Ausschluss von Hintergrundreaktionen und zur Überprüfung der Substratstabilität wurden Kontrollexperimente mit dem jeweiligen Substrat in HEPES-Puffer in Abwesenheit von AmbDH3 unter identischen Bedingungen durchgeführt, extraktiv aufgearbeitet und NMR-spektroskopisch analysiert. Die zugehörigen ¹H NMR-Spektren finden sich in Anhang 7.4.

Akzeptierte Substrate



Nicht akzeptierte Substrate



Teilweise spontan reagierendes Substrat

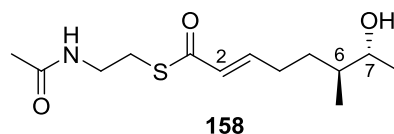


Abbildung 49: Übersicht der Substrate zur Untersuchung der Substrattoleranz der Dehydratase-Domäne AmbDH3 sortiert nach akzeptierten und nicht akzeptierten Substraten.

In Abbildung 49 findet sich eine Übersicht der von AmbDH3 akzeptierten und nicht akzeptierten Substrate. Im Folgenden wird genauer auf die erhaltenen Ergebnisse eingegangen.

Bei der Inkubation von **153** und **154** mit His₆-AmbDH3 über Nacht bei 37 °C konnte bei beiden Verbindungen keine Umsetzung zum zyklisierten Produkt beobachtet werden. In vorausgegangenen Studien zur biochemischen Charakterisierung von AmbDH3 konnte gezeigt werden, dass die Invertierung der Konfiguration an C-6 toleriert wird, aber zu schlechteren Umsätzen führt (siehe Kapitel 3.1.3). Die Konfiguration der Hydroxy-Funktion an C-7 scheint hingegen nicht variabel zu sein und nur Substrate mit (7*D*)-Konfiguration werden von AmbDH3 akzeptiert. Ein Grund hierfür könnte sein, dass bei der Invertierung des Stereozentrums an C-7 bei gleicher Stereoselektivität der AmbDH3-Reaktion der

Ethylsubstituent an C-7 im Übergangszustand in die axiale Position gezwungen wird. Diese konfigurielle Änderung an C-7 wirkt sich scheinbar deutlich stärker aus als im Fall der konfiguriellen Änderung an C-6, wo die Bindungstasche anscheinend flexibler ist.

Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchung von **153** und **154** mit His₆-AmbDH3 bekräftigen, dass die Vorhersage der Konfiguration der Hydroxy-Funktion an C-7 anhand der Aminosäuresequenz von AmbKR3 unter Zuhilfenahme der Studien von CAFFREY⁹⁹ und REID¹⁰⁰ eine verlässliche Methode darstellt (siehe Kapitel 3.1.1).

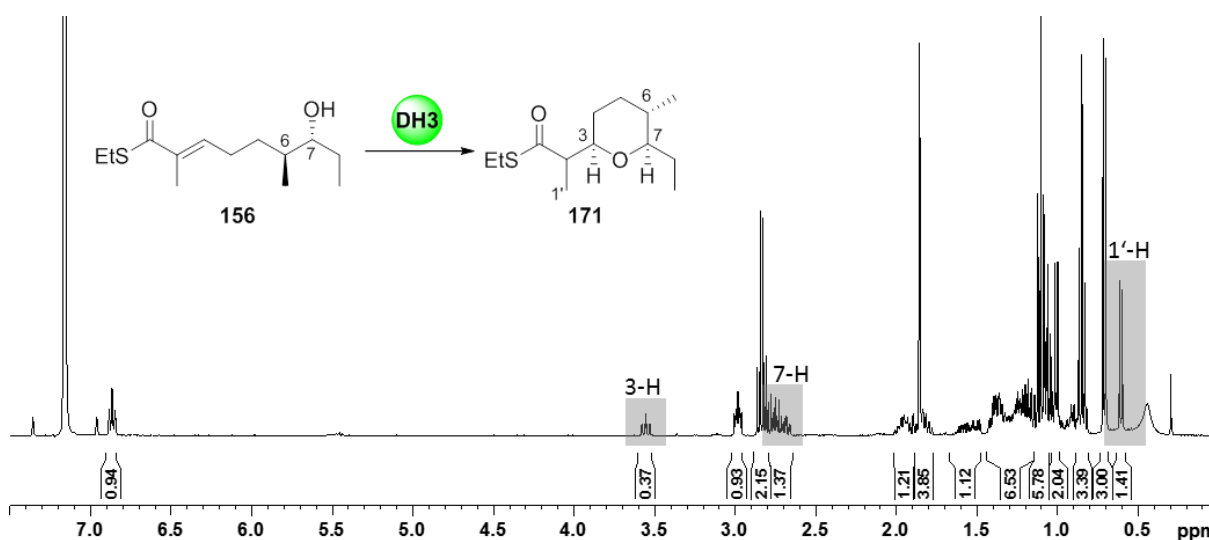


Abbildung 50: ¹H NMR spektroskopische Analyse der enzymatischen Umsetzung von **156** mit His₆-AmbDH3. Das ¹H NMR-Spektrum wurde in C₆D₆ bei 400 MHz aufgenommen.

Für die Untersuchung, ob andere Ester als *N*-Acetylcysteamin-Thioester von AmbDH3 akzeptiert und umgesetzt werden, wurden die vier Testverbindungen **155**, **156**, **157** und **139** jeweils einzeln unter den Standardbedingungen (37 °C, 150 Upm, über Nacht) mit His₆-AmbDH3 inkubiert. Bei der Inkubation der Carbonsäureester **157** und **139** und dem Thiophenolester **155** mit His₆-AmbDH3 konnte jeweils kein Umsatz beobachtet werden.

Verbindung **157** ist strukturell gesehen dem natürlichen Vorläufer am ähnlichsten, da nur in der *N*-Acetylcysteamin-Einheit der Schwefel gegen einen Sauerstoff ausgetauscht wurde. Allerdings führt dieser Austausch zu einer stark veränderten Elektronendichteverteilung. Bei Thioestern ist der partielle Doppelbindungscharakter aufgrund der unterschiedlichen Größe der 2p-Orbitale des Kohlenstoffs und der 3p-Orbitale des Schwefels und der daraus resultierenden schlechteren Überlappung der Orbitale deutlich weniger ausgeprägt als bei Carbonsäureestern bei denen es zur Überlappung zweier ähnlich großer 2p-Orbitale kommt. Durch die schlechtere Überlappung der p-Orbitale ist die Delokalisierung der nichtbindenden Elektronen im Thioester weniger stark ausgeprägt. Bei den Carbonsäureestern

hingegen kommt es durch den starken partiellen Doppelbindungscharakter zur Delokalisierung der Elektronen. Bedingt durch die größeren 3p-Orbitale des Schwefels können sich die bevorzugt am Schwefel befindlichen Elektronen über einen größeren Raum verteilen, woraus eine größere Elektronenwolke resultiert.

Die bessere Orbitalüberlappung bei Carbonsäureestern im Vergleich zu Thioestern führt zu einer elektronenreicheren Doppelbindung und somit zu einem weniger reaktiven MICHAEL-System. Dadurch ist es möglich, dass bei der Umsetzung von Carbonsäureester **157** mit AmbDH3 keine THP-Ringbildung katalysiert wird. Weiterhin ist es möglich, dass der Thioester ein notwendiges Strukturelement zur Erkennung durch das Enzym darstellt.

Thiophenolester **155** wurde ebenfalls nicht von AmbDH3 umgesetzt, was vermutlich auf den sterisch anspruchsvollen Phenylsubstituenten zurückzuführen ist. Bedingt durch die Größe des Substituenten ist es möglich, dass das Substrat nicht mehr in die aktive Tasche des Enzyms passt und es dadurch zu keiner Umsetzung kommen kann.

Bei den Substraten mit veränderter Esterfunktion konnte ausschließlich bei der enzymatischen Umsetzung von **156** mit His₆-AmbDH3 die gewünschte Zyklisierung zum Pyranring mit einem Umsatz von 32% (kalkuliert anhand des ¹H NMR-Spektrums, Abbildung 50) beobachtet werden. Charakteristisch für den gebildeten Pyranring sind die Signale bei einer chemischen Verschiebung von 3.59-3.52 ppm (m, 1H, 3-H), 2.80-2.65 ppm (m, 2H, 7-H und 2-H) und 1.01 ppm (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, 1'-H). Die erhaltene Verbindung konnte jedoch weder über Normalphasen-Säulenchromatographie noch über Umkehrphasen-HPLC vollständig gereinigt werden. Somit handelt es sich bei der eingezeichneten Stereochemie an C-3 und C-7 um eine Annahme, basierend auf den Ergebnissen von der stereoselektiven Umsetzung des Vorläufersurrogats **101** mit AmbDH3 (s. Kapitel 3.1.3).

Aus den Ergebnissen resultiert, dass für die Erkennung des Substrates durch die Domäne AmbDH3 nicht die vollständige *N*-Acetylcysteamin-Estereinheit notwendig ist, sondern eine kürzere Einheit bestehend aus dem Thioester mit Ethylsubstitution ausreicht. Sowohl beim SNAC-Thioester als auch beim Ethanthiolester spielen die bereits beschriebenen elektronischen Effekt des Schwefels auf die Doppelbindung wahrscheinlich eine wichtige Rolle, denn es resultiert ein reaktiveres MICHAEL-System als beim entsprechenden Sauerstoff-Analogon. Die Möglichkeit neben SNAC-Thioestern ebenfalls Ethanthiolester für die AmbDH3 katalysierte Reaktion verwenden zu können, bietet einen flexibleren Zugang zu Substraten für die chemoenzymatische Synthese, da diese leichter synthetisch zugänglich sind.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der möglichen Substitution des ursprünglichen SNAC-Thioesters durch andere Estereinheiten zeigen zusammenfassend, dass sowohl elektronische als auch sterische Effekte die enzymatisch katalysierte Reaktion stark beeinflussen können.

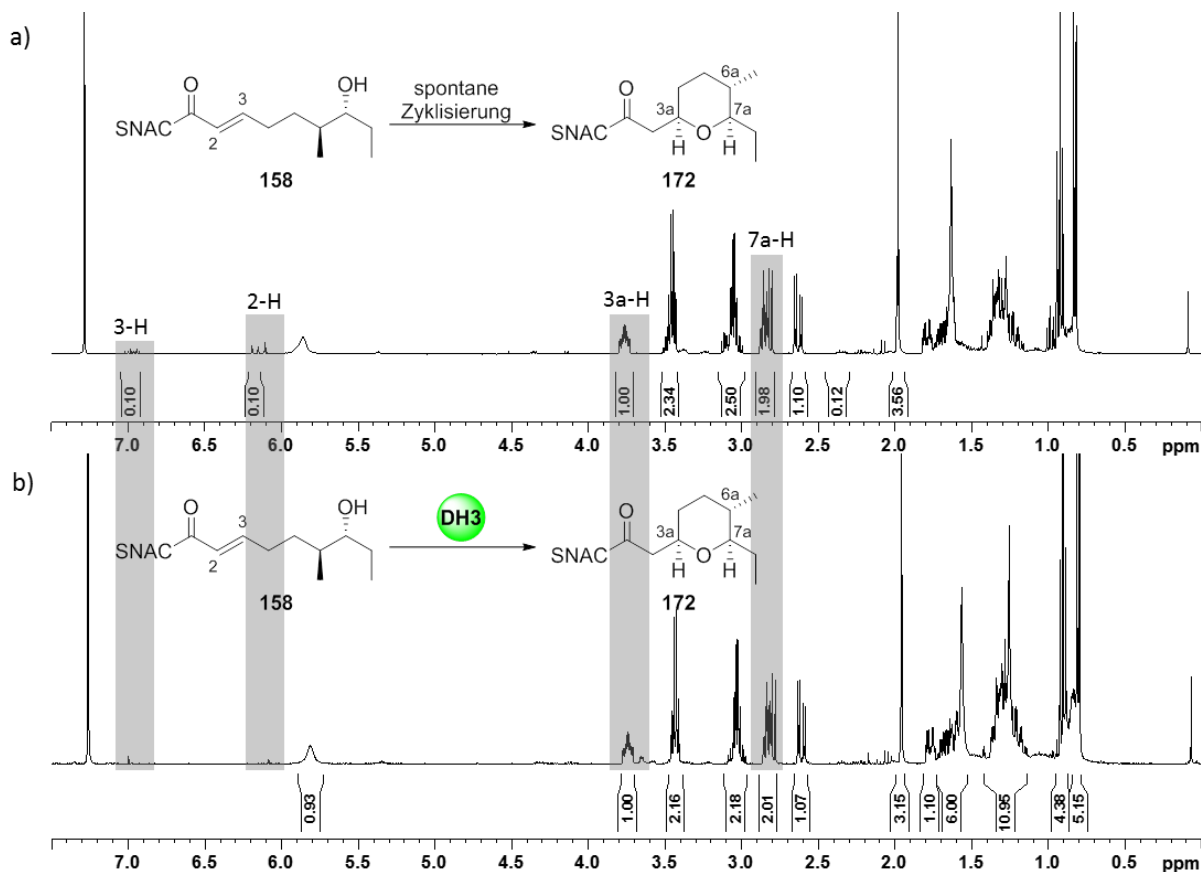


Abbildung 51: a) ¹H NMR spektroskopische Analyse der Inkubation von **158** in HEPES-Puffer ohne AmbDH3; b) ¹H NMR spektroskopische Analyse der enzymatischen Umsetzung von **158** mit AmbDH3. Alle ¹H NMR-Spektren wurden in CDCl₃ bei 400 MHz aufgenommen.

Um die Akzeptanz der Domäne AmbDH3 bezüglich Veränderungen am Substitutionsmuster des Vorläufersurrogats **101** zu untersuchen, wurde zunächst die 2-Desmethylverbindung **158** mit His₆-AmbDH3 über Nacht inkubiert. Bereits bei der Inkubation von **158** in reinem HEPES-Puffer ohne AmbDH3-Zusatz konnte eine spontane, zu 90% ablaufende Zyklisierung zu **172** beobachtet werden. Dies ist auf die erhöhte Reaktivität des MICHAEL-Akzeptors bedingt durch den fehlenden elektronschiebenden Substituenten in α-Position zurückzuführen (Abbildung 51a). Bei der Umsetzung von **158** mit dem Fusionsprotein His₆-AmbDH3 konnte der Umsatz auf 100% erhöht werden (Abbildung 51b). Diese Vervollständigung des Umsatzes könnte auf den Zusatz von AmbDH3 zurückzuführen sein. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Reaktion auch ohne AmbDH3 quantitativ ablaufen würde, da **158** in Vorversuchen auch bereits in reinem CDCl₃ zyklisierte. Charakteristisch für die THP-

Ringbildung sind die Signale bei 3.79-3.70 ppm (m, 1H, 3a-H) und 2.87-2.77 ppm (m, 2H, 7a-H und 2a-H).

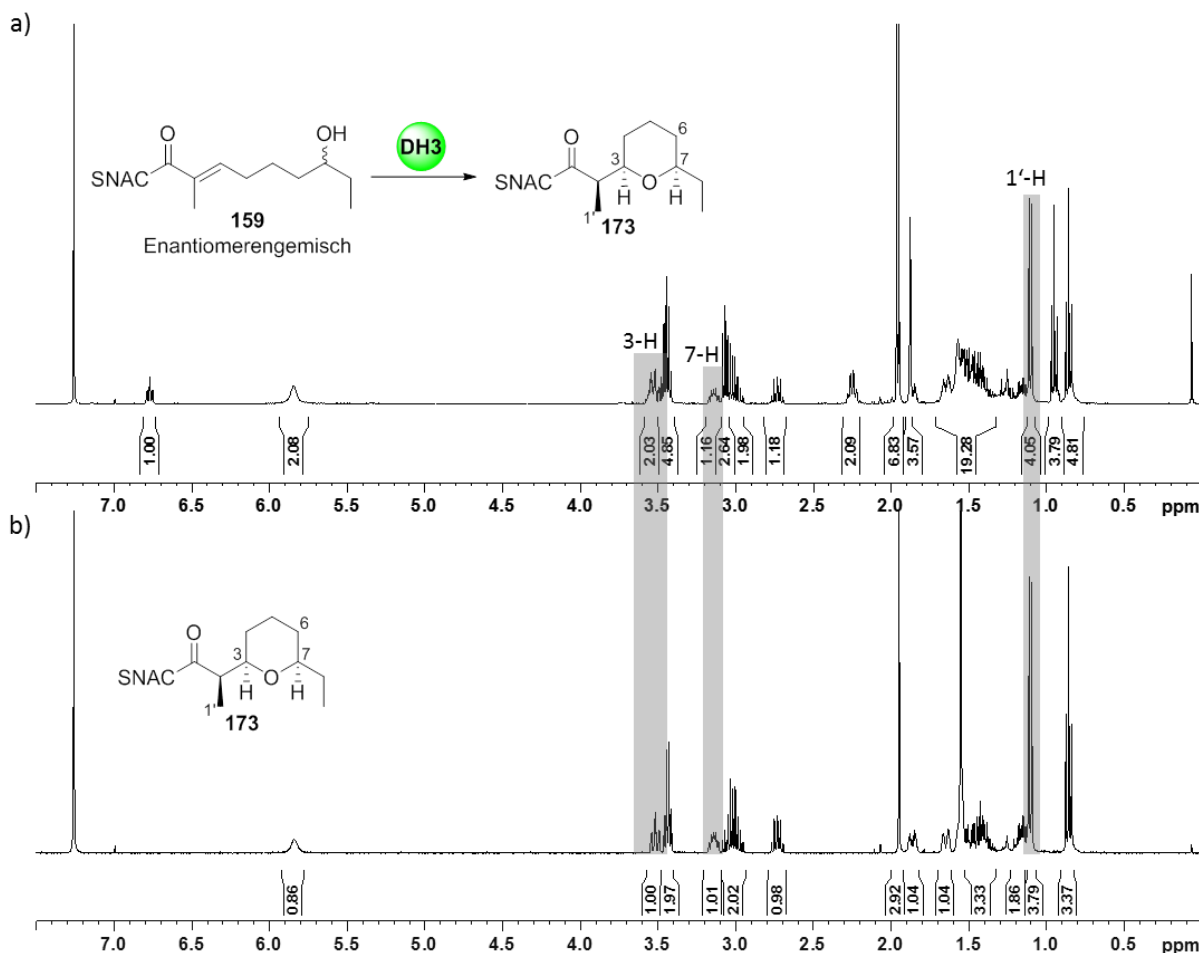


Abbildung 52: a) ¹H NMR spektroskopische Analyse der enzymatischen Umsetzung von **159** mit His₆-AmbDH3; b) ¹H NMR spektroskopische Analyse des Produkts **173** aus der enzymatischen Umsetzung nach Reinigung mittels Umkehrphasen-HPLC. Alle ¹H NMR-Spektren wurden in CDCl₃ bei 400 MHz aufgenommen.

Im ¹H NMR-Spektrum für die Umsetzung der 6-Desmethylverbindung **159** ist die Bildung des Pyranrings mit einer Umsetzung von 54% (Abbildung 52a) zu erkennen. Bei dem eingesetzten Edukt handelt es sich um ein Enantiomergemisch, bei dem kein vollständiger Umsatz zu erwarten ist, da vorausgegangene Untersuchungen vermuten lassen, dass nur Substrate mit (7D)-Konfiguration von AmbDH3 akzeptiert werden. Das erhaltene Edukt-Produkt-Gemisch wurde mittels Umkehrphasen-HPLC getrennt und NMR spektroskopisch analysiert. Das cyclisierte Produkt **173** wurde als diastereomerenreine Verbindung erhalten. Charakteristisch für einen erfolgreichen Umsatz sind die Signale bei 3.56-3.49 (m, 1H, 3-H), 3.19-3.10 ppm (m, 1H, 7-H) und 1.10 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, 1'-H) (Abbildung 52b).

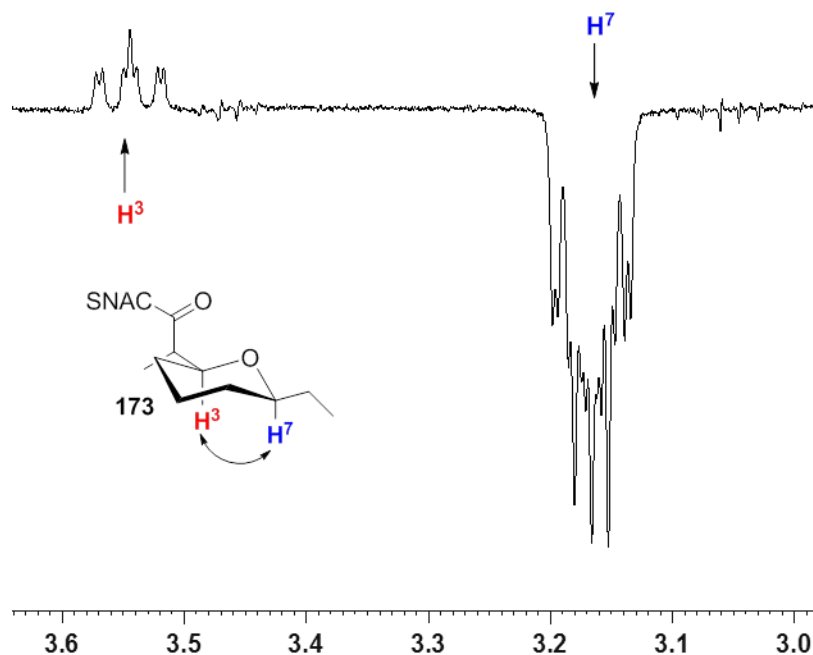


Abbildung 53: Ausschnitt aus dem 1D-NOE-Spektrum der Verbindung **173** mit Sättigung bei 3.17 ppm. Das NOE-Spektrum wurde in CDCl₃ bei 400 MHz aufgenommen.

Der Ausschnitt aus dem 1D-NOE-Spektrum der Verbindung **173** zeigt, dass bei einer Sättigung des Signals bei 3.17 ppm (Proton an C-7) eine Wechselwirkung mit dem Proton an C-3 bei 3.55 ppm resultiert (Abbildung 53). Daraus ergibt sich eine *syn*-Konfiguration für die Protonen an C-3 und C-7. Basierend auf der Annahme, dass nur Substrate mit (7D)-Konfiguration von AmbDH3 akzeptiert werden, ergibt sich anhand des 1D-NOE-Spektrums eine (3D)-Konfiguration. Die Konfiguration an C-2 kann anhand des ¹H NMR-Spektrums und der daraus abgeleiteten Kopplungskonstante ermittelt werden. Die Kopplung zwischen den Protonen an C-2 und C-3 beträgt 8.9 Hz, wodurch für C-2 eine (2D)-Konfiguration resultiert.

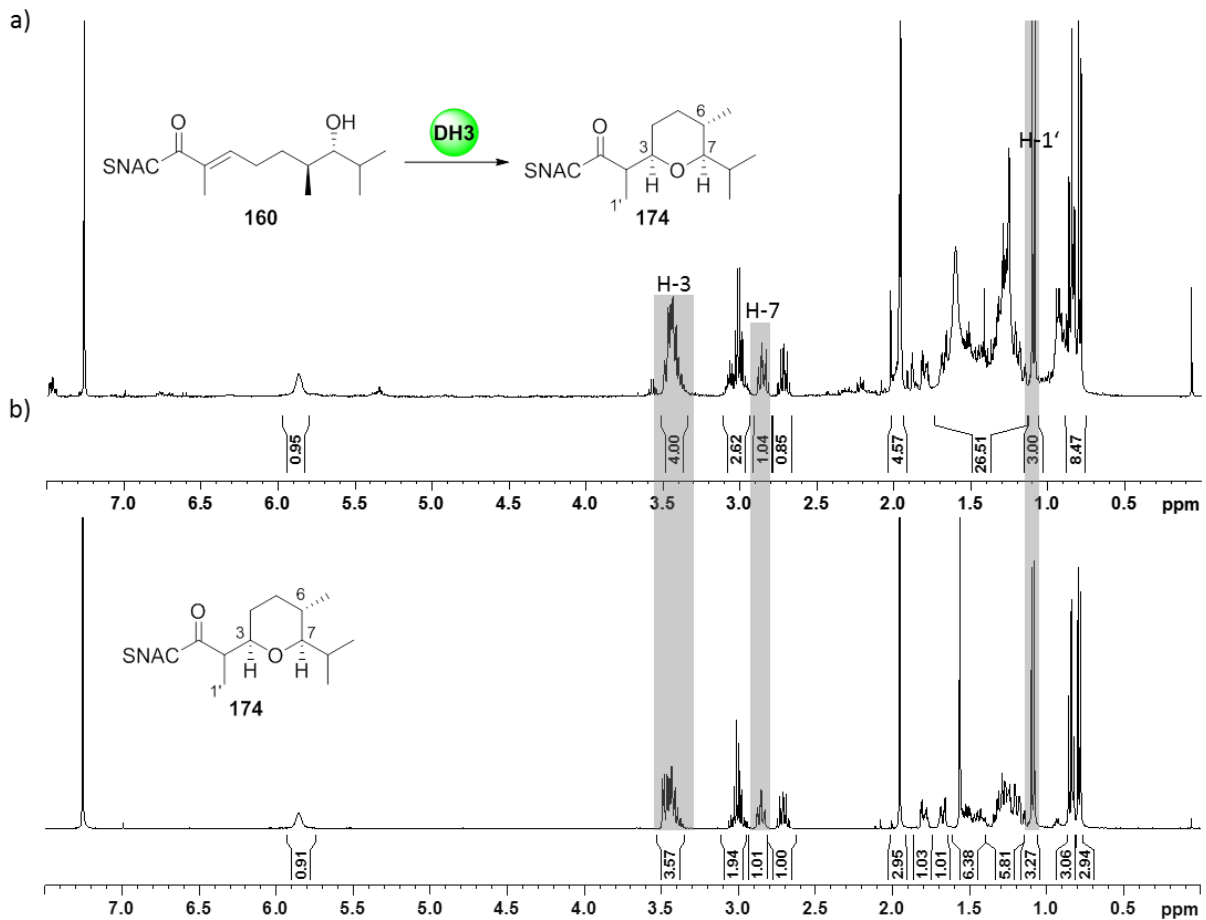


Abbildung 54: a) ^1H NMR spektroskopische Analyse der enzymatischen Umsetzung von **160** mit His₆-AmbDH3; b) ^1H NMR spektroskopische Analyse des Produkts **174** aus der enzymatischen Umsetzung nach Reinigung mittels Umkehrphasen-HPLC. Alle ^1H NMR-Spektren wurden in CDCl_3 bei 400 MHz aufgenommen.

In Abbildung 54a ist das ^1H NMR-Spektrum für die enzymatische Umsetzung von **160** mit His₆-AmbDH3 gezeigt. Im NMR-Spektrum sind keine Spuren des Startmaterials mehr zu erkennen, so dass von einem quantitativen Umsatz ausgegangen werden kann. Zur Charakterisierung wurde das aus dem *in vitro* Aktivitätstest erhaltene Produkt mittels Umkehrphasen-HPLC gereinigt und NMR-spektroskopisch analysiert. Für die Bildung des Pyranrings sind die Signale bei 3.51-3.35 ppm (m, 3H, 3-H und 2'-H), 2.89-2.81 (m, 1H, 7-H) und 1.09 ppm (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, 1'-H) charakteristisch.

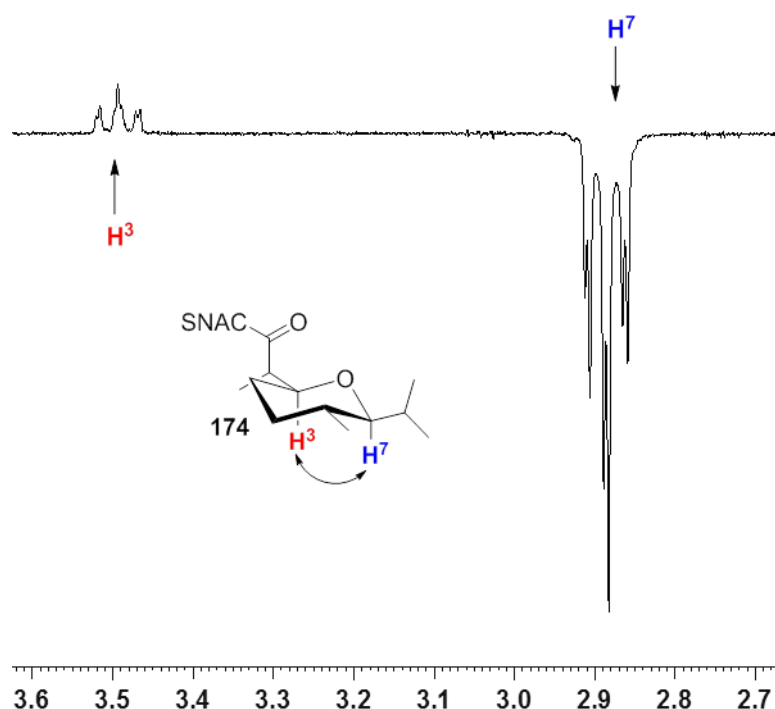


Abbildung 55: Ausschnitt aus dem 1D-NOE-Spektrum der Verbindung **174** mit Sättigung bei 2.89 ppm. Das NOE-Spektrum wurde in CDCl₃ bei 400 MHz aufgenommen.

Anhand des in Abbildung 55 gezeigten Ausschnitts aus dem 1D-NOE-Spektrum von **174** ist zu erkennen, dass bei Sättigung des Signals bei 2.89 ppm (Protonen an C-7) eine Wechselwirkung mit dem Proton an C-7 bei 3.50 ppm resultiert. Die Konfiguration an C-7 ist durch die zu Beginn der Syntheseroute gewählte MUKAIYAMA-Aldol-Reaktion definiert, so dass sich basierend darauf in Kombination mit den 1D-NOE-Messungen eine (3*D*)-Konfiguration ergibt. Über die C-2-Konfiguration konnte jedoch anhand der Kopplungskonstanten aus dem ¹H NMR-Spektrum und den 1D-NOE-Spektren keine Aussage gemacht werden, hierfür wäre eine Röntgenstrukturanalyse notwendig (s. Kapitel 3.1.1).

Nach Substitution der Ethylseitenketten durch die Isopropylseitenketten an C-7 zeigte die so erhaltene Verbindung in den Enzymaktivitätstests vergleichbare Ergebnisse wie sie mit dem natürlichen Vorläufer erhalten wurden. Der sehr gute Umsatz lässt vermuten, dass auch andere Alkylsubstituenten an C-7 von AmbDH3 akzeptiert werden könnten. Interessant hierbei wäre, sterisch deutlich anspruchsvollere Substituenten, wie z.B. eine Phenylgruppe, einzuführen und die Toleranz von AmbDH3 bezüglich solcher Veränderungen zu untersuchen.

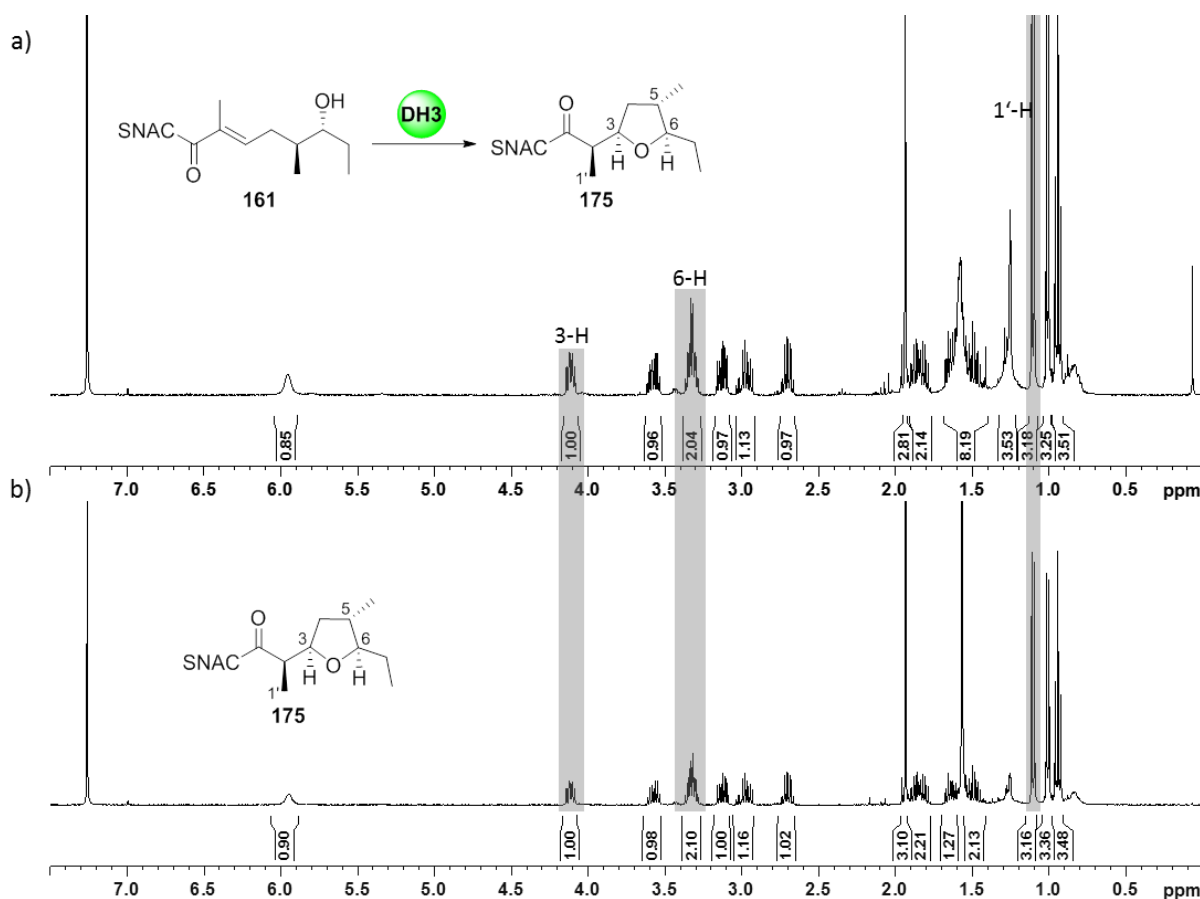


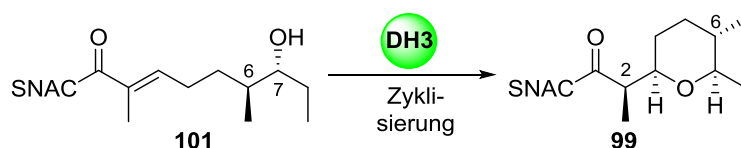
Abbildung 56: a) ¹H NMR spektroskopische Analyse der enzymatischen Umsetzung von **161** mit His₆-AmbDH3; b) ¹H NMR spektroskopische Analyse des Produkts **175** aus der enzymatischen Umsetzung nach Reinigung mittels Umkehrphasen-HPLC. Alle ¹H NMR-Spektren wurden in CDCl₃ bei 400 MHz aufgenommen.

Um zu untersuchen, ob die Dehydratase-Domäne AmbDH3 ebenfalls die Bildung von Heterozyklen unterschiedlicher Größe katalysiert, wurde **161**, welches eine C-1 Einheit kürzer ist als das natürliche Substrat, unter Standardbedingungen (37 °C, 150 Upm, über Nacht) mit His₆-AmbDH3 inkubiert und anschließend NMR spektroskopisch analysiert. In Abbildung 56a ist das ¹H NMR-Spektrum nach enzymatischer Umsetzung gezeigt. Bei dem theoretischen Produkt würde es sich um ein Furan handeln, welches nach den BALDWIN-Regeln einer begünstigten 5-exo-trig Zyklisierung entsprechen würde. Es ist zu erkennen, dass es sich beim erhaltenen Produkt um eine einzelne Verbindung handelt und keine Spuren von Startmaterial detektierbar sind, woraus sich ein quantitativer Umsatz ergibt. Für die vollständige spektroskopische Analyse wurde das erhaltene Produkt durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt. Charakteristisch für die somit erfolgreich durchgeführte Bildung des Furans sind die Signale bei 4.15-4.08 ppm (m, 1H, H-3), 3.38-3.27 ppm (m, 2H, H-6 und 1x NHCH₂) und 1.10 ppm (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H-1'). Zur Bestimmung der Konfiguration der Protonen an C-3 und C-6 am Furanring wurden 1D-NOE-Spektren aufgenommen. Die Rotationsbarriere zwischen der Briefumschlag- und der Twistkonformation von

Tetrahydrofuranen liegt sehr niedrig, so dass die Konformere bereits bei Raumtemperatur schnell äquilibrieren.¹²² Aufgrund des schnellen Konformationswechsels konnte anhand der 1D-NOE-Spektren keine eindeutige Aussage über die C-3-Konfiguration getroffen werden. Basierend auf den Ergebnissen zur THP-Bildung ist es jedoch naheliegend, dass die Protonen an C-3 und C-7 eine *syn*-Konfiguration aufweisen. Anhand der aus dem ¹H NMR-Spektrum abgeleiteten Kopplungskonstante von 8.7 Hz ergibt sich ebenfalls eine *syn*-Konfiguration zwischen den Protonen an C-2 und C-3.

3.3.3 Optimierung der AmbDH3-Reaktionsbedingungen für Umsetzungen im präparativen Maßstab

Für detaillierte Studien bezüglich der Eignung von AmbDH3 für die chemoenzymatische Synthese von Naturstofffragmenten ist zusätzlich zur Untersuchung des Substratspektrums die Vergrößerung des Reaktionsmaßstabs in den Multimilligrammbereich und die Vereinfachung der Handhabung von entscheidender Bedeutung. Die *in vitro* Enzymaktivitätstests zur biochemischen Charakterisierung von AmbDH3 wurden maximal im semi-präparativen Maßstab (Substratmenge <8 mg) durchgeführt.



Schema 50: Die durch AmbDH3 katalysierte stereoselektive Zyklisierung des Vorläufersurrogats **101** zu **99** sollte für die Maßstabsvergrößerung in den Multimilligrammbereich optimiert werden.

Bei der zu optimierenden Reaktion handelt es sich um die durch AmbDH3 katalysierte stereoselektive Umsetzung des Vorläufersurrogats **101** zu **99** (Schema 50). Bevor die Reaktionsansätze vergrößert werden, sollte zunächst untersucht werden, ob die Schritte nach der heterologen Genexpression bis hin zur Anwendung des Enzyms in den Enzymaktivitätstests vereinfacht werden können und so ein schneller Zugang zum Enzym möglich ist.

Als erstes wurde untersucht, ob anstelle des gereinigten AmbDH3 das Totallysat nach Zellaufschluss und Pufferwechsel in den HEPES-Puffer verwendet werden kann. Die Enzymaktivitätstest wurden im semi-präparativen Maßstab parallel mit gereinigtem His₆-AmbDH3 oder mit Totallysat 16 h bei 37 °C durchgeführt, anschließend mit EtOAc extrahiert und NMR spektroskopisch analysiert. Sowohl mit dem gereinigten His₆-AmbDH3 als auch mit

dem Totallysate wurde ein quantitativer Umsatz erreicht (kalkuliert anhand der ^1H NMR-Spektren). Zur weiteren Vereinfachung wurde der Zellaufschluss nach der heterologen Genexpression nicht in Bindepuffer (40 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 8.0) sondern direkt im Reaktionspuffer (HEPES-Puffer: 25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.8) durchgeführt, wodurch der Pufferaustausch entfällt. Anhand der ^1H NMR spektroskopischen Analyse konnte unter diesen Bedingungen ebenfalls ein quantitativer Umsatz beobachtet werden.

Tabelle 2: Untersuchung des Einflusses vom Lösungsmittelzusatz auf den Umsatz der durch AmbDH3 katalysierten stereoselektiven Zyklisierung.

Eintrag	m_{Pellet} [g]	c_{Substrat} [mM]	Lösungsmittel	t [h]	T [°C]	Umsatz
1	0.8	8.5	CH_2Cl_2	16	37	Kein Umsatz
2	0.8	8.5	Isopropanol	16	37	Kein Umsatz
3	0.8	8.5	THF	16	37	32%
4	0.8	8.5	Toluol	16	37	Quant.

Die Enzymaktivitätstests wurden im semi-präparativen Maßstab (10 mg Substrat) in 4 mL HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.8) durchgeführt. Von allen untersuchten Lösungsmitteln wurden 10 %vol verwendet bezogen auf das Gesamtreaktionsvolumen. Die Aufarbeitung erfolgte extraktiv mit EtOAc. Die erhaltenen Extrakte wurden NMR spektroskopisch analysiert und der Umsatz anhand des ^1H NMR-Spektrums kalkuliert.

Ein Problem das mit der Vergrößerung der Enzymaktivitätstests einhergeht, ist die stärker ins Gewicht fallende, schlechte Wasserlöslichkeit des Substrats. Um die Substratlöslichkeit zu erhöhen wurden unterschiedliche organische Lösungsmittel als Zusatz in der Reaktion verwendet (Tabelle 2). Im Allgemeinen gilt, dass Enzyme nur polare wässrige Milieus als Reaktionsmedien akzeptieren und nur der Zusatz von geringen Mengen an protischen Lösungsmitteln wie Ethanol oder aprotisch-polaren Lösungsmitteln wie Aceton toleriert wird.¹²³ Der Zusatz des aprotisch-unpolaren Lösungsmittels CH_2Cl_2 (10 %vol) oder des protischen Lösungsmittels Isopropanol (10 %vol) führte zur direkten Denaturierung des Proteins. Dadurch kam es zum vollständigen Aktivitätsverlust des Enzyms. Nach extraktiver Aufarbeitung konnte somit im ^1H NMR-Spektrum kein Umsatz verzeichnet und lediglich Startmaterial zurückgewonnen werden. Bei Zusatz von THF (10 %vol) blieb die Enzymaktivität erhalten, allerdings verbunden mit einem deutlichen Umsatzeinbruch (32% kalkuliert anhand des ^1H NMR-Spektrums). Interessanterweise wurde entgegen der Erwartungen durch den Zusatz von Toluol (10 %vol) kein Enzymaktivitätsverlust beobachtet und ein gleich bleibender quantitativer Umsatz (kalkuliert anhand des ^1H NMR-Spektrums) erhalten.

Für die Studien zur Maßstabsvergrößerung der enzymatischen Reaktion wurde das Substrat in Toluol gelöst, das Totallysate nach Zellaufschluss mittels Ultraschall (2.0 g Zellpellet pro 50 mg Substrat) hinzugegeben, mit HEPES-Puffer bis zum gewünschten Volumen aufgefüllt und 16 h bei der gewünschten Temperatur inkubiert. Nach extraktiver Aufarbeitung wurde das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt und das erhaltene Produkt NMR spektroskopisch analysiert.

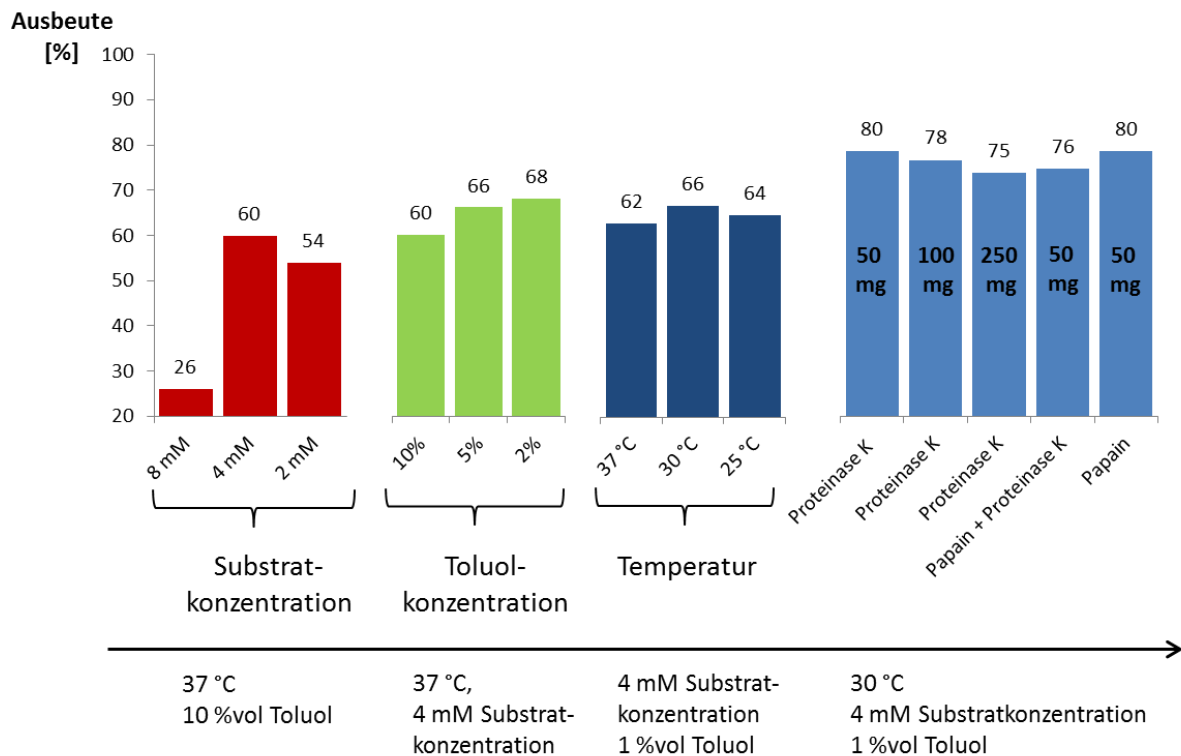


Abbildung 57: Graphische Darstellung der Ergebnisse der Optimierungsversuche bezüglich des Einflusses der Substratkonzentration, der Toluolkonzentration, der Reaktionstemperatur und der Aufarbeitungsmethode auf die Ausbeute. Die Optimierungsversuche bezüglich der Substrat- und Toluolkonzentration erfolgten im 50 mg Maßstab und für die Reaktionstemperatur im 100 mg Maßstab. Bei den Angaben unter dem Pfeil handelt es sich um die jeweiligen konstant gehaltenen Parameter in den unterschiedlichen Reaktionsblöcken basierend auf den vorausgegangenen Optimierungsstudien.

Als Ausgangsbedingungen für die Optimierungsstudien wurden die gut etablierten Bedingungen aus dem semi-präparativen Maßstab übertragen (8 mM Substratkonzentration, 10 %vol Toluol, 16 h, 37 °C, 100 Upm) und die ersten Versuche mit 50 mg Substrat durchgeführt. Bei der direkten Übertragung der Reaktionsbedingungen konnte nur eine Ausbeute von 26% erreicht werden. Sehr hohe Substratkonzentrationen können eine Enzymhemmung bewirken.¹²⁴

SEWALD *et al.* konnten im Rahmen einer ähnlichen, erfolgreichen Optimierungsstudie zeigen, dass bei enzymatischen Reaktionen im großen Maßstab die Erniedrigung der

Substratkonzentration zu einem besseren Umsatz führt.⁸⁹ Basierend darauf wurde zunächst der Einfluss der Substratkonzentration auf die Ausbeute untersucht. Die Halbierung der Substratkonzentration von 8 mM auf 4 mM führte in etwa zu einer Verdopplung der Ausbeute von 26% auf 60%. Die weitere Verdünnung auf 2 mM führte wiederum zu Ausbeuteverlusten von 6% (Ausbeute 54%, Abbildung 57 rote Balken). Alle nachfolgenden Optimierungsversuche wurden daher mit 4 mM Substratkonzentration durchgeführt.

Neben dem Einfluss der Substratkonzentration sollte wiederum Einfluss der Toluolkonzentration auf die Ausbeute untersucht werden. Bei den initialen Untersuchungen zur Toluolkonzentration zeigte sich, dass große Mengen an Toluol zu einer teilweisen Enzympräzipitation und somit zu Aktivitätsverlusten führten. Für ein effektives Katalysesystem muss der Toluolanteil jedoch so hoch bleiben, dass das Substrat **101** vollständig in Lösung vorliegt, aber der Einfluss auf die Enzymaktivität gleichzeitig möglichst gering bleibt. Bei der Verringerung der Toluolkonzentration von 10 %vol auf 2 %vol ist ein deutlicher Trend bezüglich steigender Ausbeuten zu erkennen. So konnte die Ausbeute von 60% auf 68% bei Zusatz von nur 2 %vol Toluol gesteigert werden (Abbildung 57 grüne Balken).

Die nachfolgenden Optimierungsstudien zum Temperatureinfluss wurden mit 4 mM Substratkonzentration und 1 %vol Toluolzusatz durchgeführt, da sich bei Löslichkeitsversuchen gezeigt hat, dass 1 %vol für eine vollständige Löslichkeit von **101** ausreichend ist. Im Allgemeinen ist bekannt, dass enzymatisch katalysierte Reaktionen über einen breiteren Temperaturbereich ablaufen, aber ein Temperaturoptimum besitzen an dem die maximale Aktivität erreicht ist. Mit steigender Temperatur bricht die Kettenkonformation des Enzyms zusammen, was eine sinkende Aktivität zur Folge hat.¹²⁴ Angelehnt an die *in vitro* Untersuchungen zu den Dehydratase-Domänen BorDH2 und BorDH3^{106,108}, wurden die Enzymaktivitätstest zur biochemischen Charakterisierung von AmbDH3 bei 37 °C durchgeführt, obwohl nicht bekannt ist ob es sich hierbei um das Temperaturoptimum handelt. Zur Untersuchung des Temperatureinfluss auf die Ausbeute wurde die Reaktionstemperatur von 37 °C auf 30 °C und auf 25 °C gesenkt, wobei die Verringerung auf 30 °C zur besten Ausbeute von 66% führte. Die Temperatursenkung führt zur Verringerung von Proteaseaktivitäten, wodurch die Aktivität des Enzyms über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt und höhere Umsätze erzielt werden können. Der Ausbeuteverlust um 2% beim direkten Vergleich mit der Ausbeute (68%) die bei 37 °C und

2 %vol Toluol erreicht wurde, ist vermutlich auf die Maßstabsvergrößerung von 50 mg auf 100 mg bei den Studien zum Temperatureinfluss zurückzuführen (Abbildung 57 dunkelblaue Balken).

Bei Wiederholung der enzymatischen Reaktion unter denen als optimal ermittelten Bedingungen (4 mM Substratkonzentration, 1 %vol Toluol, 30 °C) wurde nach extraktiver Aufarbeitung mit EtOAc ohne weitere Reinigung der Umsatz anhand des ^1H NMR-Spektrums kalkuliert. Unter den gewählten Bedingungen wurde ein quantitativer Umsatz erreicht, allerdings konnte nach säulenchromatographischer Reinigung nur eine maximal Ausbeute von 66% erreicht werden. Da es bei dieser enzymatisch katalysierten Reaktion zu keiner Bildung von isolierbaren Nebenprodukten kommt und kein Edukt mehr detektierbar war, liegt es nahe, dass ein großer Teil des erhaltenen Produkts bei der extraktiven Aufarbeitung verloren gegangen ist. Die Maßstabsvergrößerung führte bedingt durch die größeren Mengen an Protein bzw. denaturierten Protein zur Bildung von Einschlussverbindungen, die sich weder mit Wasser noch mit organischen Lösungsmitteln auflösen ließen. Für eine bessere Extraktion wurde nach der abgeschlossenen enzymatischen Reaktion entweder Proteinase K oder Papain zum Proteinabbau hinzugegeben.

Proteinase K gehört zur Gruppe der Serin-Proteasen und wird in Kombination mit einer Ca^{2+} -Quelle verwendet, da dieses zur erhöhten Stabilität des Enzyms beiträgt. Vorzugsweise kommt es durch Proteinase K zur Proteinspaltung in der Nähe von hydrophoben Aminosäuren. Proteinase K ist über einen breiten pH-Bereich (pH-Optimum 7.5-12.0) stabil und hat ein Aktivitätsoptimum bei 37 °C.¹²⁵ Papain gehört zur Gruppe der Cystein-Proteasen und spaltet Proteine ebenfalls bevorzugt in der Nähe hydrophober Aminosäuren, allerdings liegt das Temperaturoptimum zwischen 60-70 °C und das pH-Optimum zwischen 6.0-7.0. Sowohl bei der Verwendung von Proteinase K als auch beim Zusatz von Papain konnte im 50 mg Maßstab nach extraktiver Aufarbeitung und säulenchromatographischer Reinigung eine Ausbeute von 80% erreicht werden. Die Kombination von Proteinase K mit Papain führte zu keinem besseren Ergebnis (76% Ausbeute, Abbildung 57 hellblaue Balken).

Die Durchführung der Reaktion im präparativen Maßstab konnte unter den optimierten Bedingungen mit anschließendem Proteinverdau durch Proteinase K erfolgreich für 100 mg (78% Ausbeute)- und 250 mg (75% Ausbeute)-Ansätze etabliert werden. Die Ergebnisse zeigen vielversprechende Tendenzen für die Vergrößerung der enzymatisch katalysierten

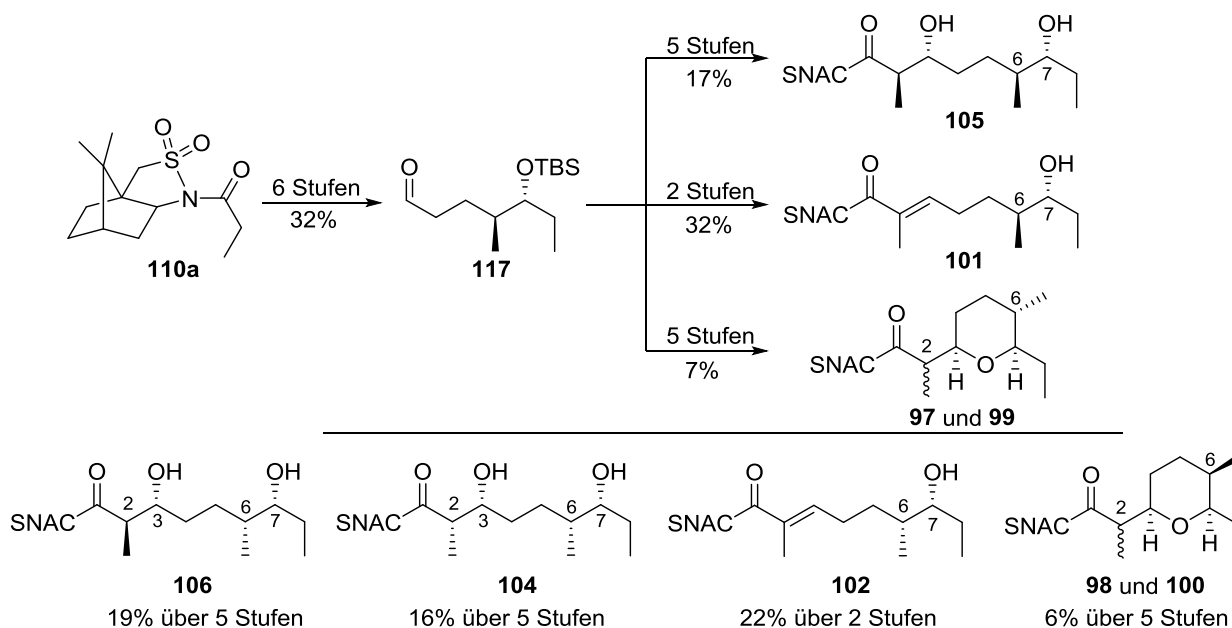
Reaktion in den Grammbereich und für die Verwendbarkeit von AmbDH3 für die chemoenzymatische Synthese zum stereoselektiven Aufbau von THP-Ringen.

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Aufklärung der biosynthetischen Bildung des Ambruticin-Ostfragments

4.1.1 Studien zur biosynthetischen Rolle der Dehydratase-Domäne AmbDH3

Zur Herstellung der benötigten Substratsurrogate und Referenzverbindungen wurde eine flexible, divergente Syntheseroute entwickelt.

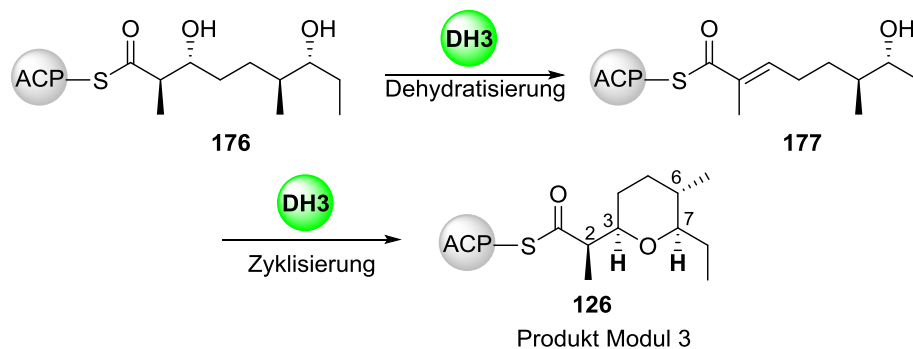


Schema 51: Synthese der Testverbindungen **101**, **105**, **97** und **99** ausgehend von Aldehyd **117**. Die Synthesen sind hier exemplarisch für die Verbindungen mit *anti*-Konfiguration bezüglich C-6 und C-7 gezeigt. Für die Verbindungen mit *syn*-Konfiguration erfolgt die Synthese analog. Die Ausbeuten für die *syn*-konfigurierten Substrate sind ausgehend vom Aldehyd **116** angegeben, welcher in 6 Stufen ausgehend vom propionierten (4*S*)-EVANS-Auxiliar (**111a**) in 34% Ausbeute synthetisiert wurde.

Die Etablierung der C-6- und C-7-Konfiguration aller Zielverbindungen **97-106** erfolgte über eine *anti*-selektive MUKAIYAMA- oder eine *syn*-selektive EVANS-Aldol-Reaktion. Ausgehend von den gemeinsamen Vorläufer-Aldehyden **116** bzw. **117** wurden über selektive Aldol-Reaktionen die β -Hydroxythioester **104**, **105** und **106**, über eine HWE-Reaktion die α,β -ungesättigten Testverbindungen **101** und **102** und über eine baseninduzierte Oxa-MICHAEL-Addition die Referenzverbindungen **97-100** erhalten (Schema 51). Durch Kombination von 1D-NOE-Experimenten und Einkristall-Röntgenstrukturanalyse wurde die absolute Stereochemie der Referenzverbindungen aufgeklärt.

In vorausgegangenen Arbeiten konnte das synthetische Gen *ambDH3* erfolgreich in den pET28a(+)-Expressionsvektor ligiert und die optimalen Expressions- und Isolierungsbedingungen des Enzyms etabliert werden.¹⁰⁷ Im Rahmen dieser Arbeit wurde für Referenzexperimente ausgehend vom Plasmid pET28a(+)-*ambDH3* über PCR eine Punktmutante (H51A) generiert, heterolog in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und anschließend isoliert.

Die enzymatische Umsetzung von den synthetisch gewonnenen Substratsurrogaten **101-106** mit AmbDH3 und AmbDH3_H51A im analytischen und semi-präparativen Maßstab zeigte, dass entgegen der Annahme von REEVES *et al.* die THP-Bildung bereits in Modul 3 der Ambruticin-Biosynthese erfolgt.³¹



Schema 52: Ausschnitt aus Modul 3 der Ambruticin-Biosynthese.

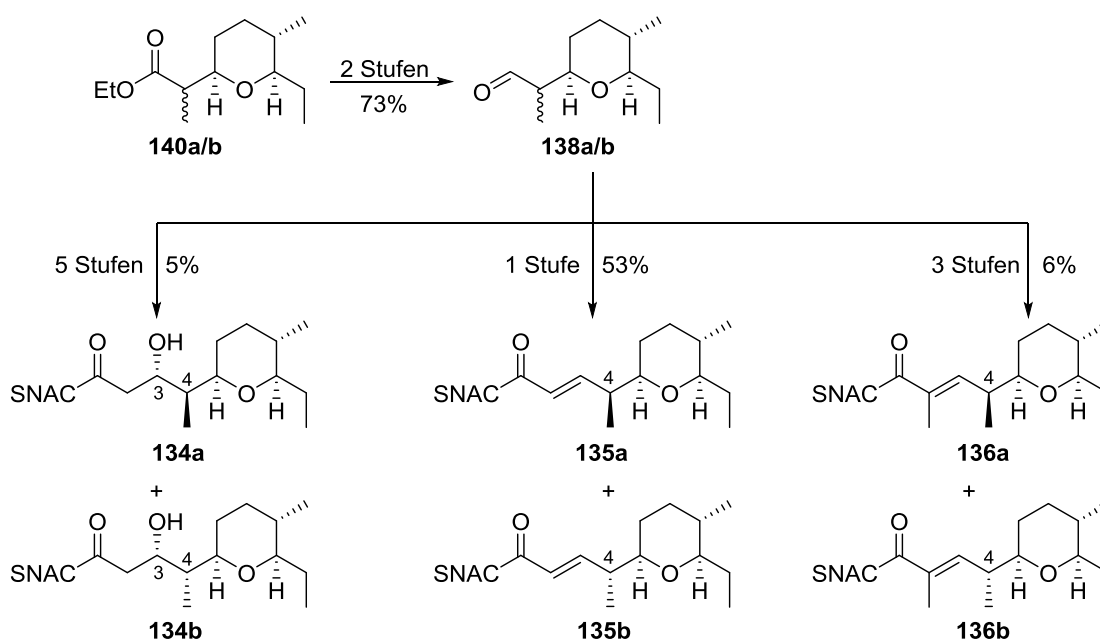
Die AmbDH3-Domäne katalysiert zunächst die Dehydratisierung zum (*E*)-konfigurierten Intermediat **177** gefolgt von der stereoselektiven Oxa-MICHAEL-Addition zur Generierung des THP-Rings (Schema 52). Anhand der verschiedenen Substratsurrogate wurde gezeigt, dass AmbDH3 dabei eine hohe Stereoselektivität bezüglich der C-2 und C-3 Konfiguration aufweist. Bedingt durch die anfangs unbekannte Konfiguration der Methylgruppe an C-6 wurden beide Epimere synthetisiert. Die Umsetzung dieser zeigte, dass beide C-6-Epimere von AmbDH3 akzeptiert werden, jedoch mit einer deutlichen Präferenz für die (6*D*)-konfigurierten Substratsurrogate. Daraus ergibt sich, dass es sich bei **176** und **177** höchstwahrscheinlich um die natürlichen Biosyntheseintermediate handelt.

Bei AmbDH3 handelt es sich somit um eine Dehydratase-Domäne mit zusätzlicher Zyklaseaktivität. Im Rahmen einer laufenden Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. WULF BLANKENFELDT vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung werden derzeit Struktur-geleitete Mutagenesestudien zur Verbesserung der Stabilität von AmbDH3

durchgeführt. Im Zuge dessen sollen anhand der ermittelten AmbDH3-Kristallstruktur die vermutlich an der THP-Ringbildung beteiligten Aminosäuren identifiziert werden.

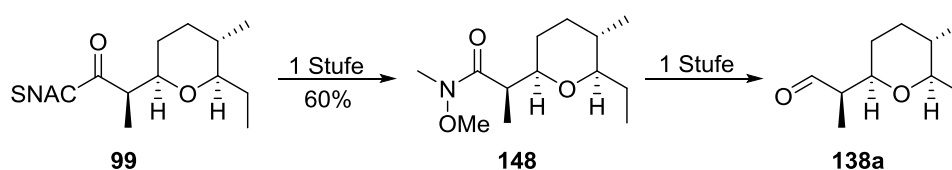
4.1.2 Studien zur biosynthetischen Rolle der multifunktionalen Dehydratase-Domäne AmbDH4 und zur C-Methyltransferase AmbM

Die benötigten Testverbindungen für die *in vitro* Untersuchung der Dehydratase-Domäne AmbDH4 und der C-Methyltransferase AmbM wurden über eine flexible, divergente Syntheseroute generiert.



Schema 53: Nicht-diastereoselektive Syntheseroute für die Darstellung der Testverbindungen **134a/b**, **135a/b** und **136a/b**.

Als Startpunkt wurde das aus der vorangegangenen Surrogatsynthese erhaltene untrennbare Diastereomeregemisch von **140a/b** verwendet, welches durch eine Reduktions-Oxidations-Kaskade in ein Gemisch von Aldehyd **138a/b** überführt wurde. Ausgehend von **138a/b** konnten über eine NAGAO-Acetat-Aldol-Reaktion die β -Hydroxythioester **134a** und **134b** und über (*E*)-selektive WITTIG-Reaktionen die α,β -ungesättigten Thioester **135a**, **135b**, **136a** und **136b** synthetisiert werden (Schema 53). Die erhaltenen Diastereomeregemische wurden über Umkehrphasen-HPLC getrennt.



Schema 54: Diastereoselektive Synthese des Vorläuferaldehyds **138a**.

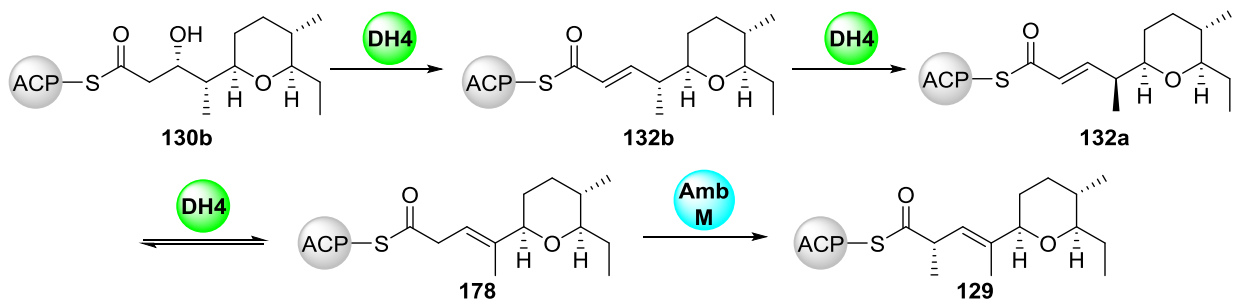
Mit der für AmbDH3 etablierten enzymatischen Methodik wurde SNAC-Thioester **99** in semi-präparativen Mengen stereoselektiv erhalten. Dies ermöglichte durch die Umsetzung zu Weinrebamid **148** und folgende Reduktion Aldehyd **138a** auch diastereomerenrein darzustellen. Die vollständig stereoselektive Synthese der Testverbindungen erfolgte dann analog zur dargestellten Syntheseroute in Schema 53. Die C-4 Konfiguration von **134a** und **134b** konnte zusätzlich durch VCD-Spektroskopie in einer Kooperation mit CHRISTIAN MERTEN von der Universität Bochum bestätigt werden.

Die für *ambDH4* codierende DNA-Sequenz wurde durch PCR amplifiziert und anschließend in den Expressionsvektor pET28a(+) ligiert. Die heterologe Genexpression erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) und lieferte ein lösliches Fusionsprotein, welches durch Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt wurde.

Die Plasmide pET28a(+)_*ambM*, pET32a(+)_*ambM* und pGEX6P-1_*ambM* lagen bereits aus vorausgegangenen Arbeiten vor, so dass für AmbM die geeigneten Expressionsbedingungen etabliert werden sollten.^{107,117} Geringe Mengen an löslichem Fusionsprotein wurden nur bei der Co-Expression von pET28a(+)_*ambM* mit dem Chaperonset pG-KJE8 in *E. coli* BL21(DE3) erhalten. Dieses konnte weder mittels Nickel-Affinitätschromatographie noch durch Größenausschlusschromatographie isoliert werden, so dass die Enzymaktivitätstests mit Totallysat durchgeführt wurden.

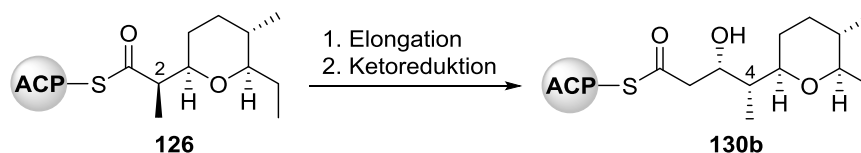
Zur Steigerung der Menge an löslichem Protein könnte beispielsweise ein pMAL-Expressionssystem verwendet werden, welches das Maltose-Bindeprotein trägt. Dieses hat einen positiven Einfluss auf die Löslichkeit des Proteins und kann gleichzeitig zur Reinigung über Maltose- oder Amylose-Resin verwendet werden. Alternativen zur Verbesserung der Löslichkeit bietet die Verwendung von anderen *E. coli* Wirtsstämmen (z.B. RosettaTM(DE3)pLysS).

Durch die enzymatische Umsetzung der Substratsurrogate **134-136** mit AmbDH4 und AmbM im analytischen und semi-präparativen Maßstab konnte gezeigt werden, dass die Doppelbindungsisomerisierung von der α,β - in die β,γ -Position in Modul 4 der Ambruticin-Biosynthese durch das Zusammenspiel von AmbDH4 und AmbM stattfindet.



Schema 55: Ausschnitt aus Modul 4 der Ambruticin-Biosynthese.

Die Inkubation der C-4-Epimere **134a** und **134b** mit AmbDH4 zeigte, dass diese selektiv nur den (4L)-konfigurierten 3-Hydroxythioester **134b** dehydratisiert. Dieses Ergebnis ist bemerkenswert, da in den *in vitro* Studien zu AmbDH3 eindeutig nachgewiesen wurde, dass das Produkt **126** von Modul 3 eine (2D)-Konfiguration aufweist (Schema 52). Nach erfolgter Dehydratisierung katalysiert die multifunktionale AmbDH4-Domäne weiterhin die C-4-Epimerisierung die wiederum essentiell ist für die Initiierung der anschließenden Doppelbindungsisomerisierung. Die nachfolgend agierende C-Methyltransferase AmbM weist eine hohe Substratspezifität auf und katalysiert erst nach erfolgter Doppelbindungsisomerisierung die α -Methylierung (Schema 55). Diese Methylierung führt zu einer Verlagerung des Gleichgewichts zu Gunsten von **129**, da die α -methylierten Substrate nicht mehr von AmbDH4 umgesetzt werden können.



Schema 56: Invertierung der C-4-Konfiguration (Nummerierung bezogen auf Verbindung **130b**).

Wie oben beschrieben katalysiert AmbDH4 selektiv die Dehydratisierung von **134b**. Deshalb muss während der Prozessierung durch AmbAT4, AmbKS4 und AmbKR4 eine Invertierung der C-4-Konfiguration erfolgen (Schema 56). Für die Aufklärung mechanistischer Details sollten die einzelnen Domänen mit realistischen Vorläufern *in vitro* untersucht werden.

4.2 Etablierung der Dehydratase-Domäne AmbDH3 als chemoenzymatisches Werkzeug

Zur Evaluierung des synthetischen Potentials von AmbDH3 wurden Studien zur Maßstabsvergrößerung der Enzymreaktion sowie zur Substratspezifität durchgeführt.

Für die Etablierung der Dehydratase-Domäne AmbDH3 als chemoenzymatisches Werkzeug konnte der Zugang zum einsatzfähigen Enzym stark vereinfacht werden. Nach Zellaufschluss

direkt im Reaktionspuffer (HEPES) konnte das erhaltene Totallysate in der enzymatischen Reaktion ohne Umsatzverluste verwendet werden.

Die optimalen Enzymaktivitätstestbedingungen wurden durch Variation verschiedener Parameter (Temperatur, Substratkonzentration, Art und Menge des zugesetzten Lösungsmittels, Aufarbeitungsmethode) ermittelt.

Die Maßstabsvergrößerung vom semi-präparativen in den präparativen Maßstab konnte unter Zusatz von Toluol (1 %vol) bei 30 °C, 4 mM Substratkonzentration und Proteinase K für die Aufarbeitung erfolgreich für 250 mg in 78% Ausbeute durchgeführt werden.

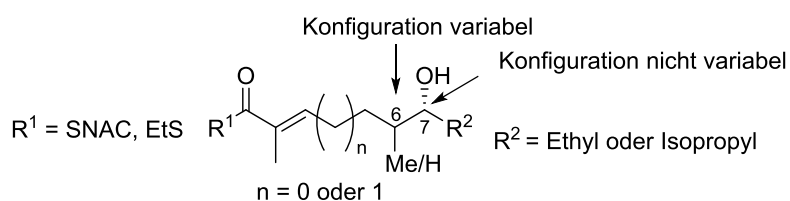


Abbildung 58: Substituenten- und Konfigurationsvariationen die von AmbDH3 akzeptiert werden.

Die Untersuchung des Substratspektrums zeigte, dass AmbDH3 bezüglich der getesteten Substituenten an C-6 und C-7 eine hohe Toleranz aufweist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die *N*-Acetylcysteamin-Einheit zum Ethanthiolester vereinfacht werden kann und dass die C-7-Konfiguration nicht variabel ist (Abbildung 58). Neben der Pyransynthese katalysiert AmbDH3 ebenfalls quantitativ die stereoselektive Synthese von Furan **175**.

Weiterführende Studien könnten an den vielversprechenden Ergebnissen der Maßstabsvergrößerung anknüpfen und versuchen die Einsatzbarkeit im Grammbereich zu erreichen. Diese Eigenschaft wäre zentral, um diese Art von Enzym auch in frühen Schritten eine Syntheseroute für die Herstellung chiraler zyklischer Synthesebausteine in ausreichenden Mengen zu nutzen. Ein weiterer interessanter Punkt wäre die Immobilisierung des Enzyms (z. B. durch Trägerfixierung) und die damit eventuell verbundene Stabilisierung und Wiederverwendbarkeit von AmbDH3. Weiterhin könnte basierend auf der erfolgreichen Furansynthese das Substratspektrum von AmbDH3 bezüglich Heterozyklen anderer Größen (z. B. Oxepan) und Klassen (z. B. Piperidin oder Tetrahydrothiopyran) untersucht werden, sowie die Toleranz der Domäne gegenüber sterisch anspruchsvolleren oder funktionalisierbaren Substituenten an C-2, C-6 und C-7.

5 Experimenteller Teil

5.1 Biologische Arbeiten - Material

5.1.1 Organismen

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme.

Name	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> One Shot® TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ80/ <i>acZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>StrR</i>) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	<i>Life Technologies</i>
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>) <i>gal</i> <i>dcm</i>	<i>Novagen</i>

5.1.2 Desoxyribonukleinsäuren

Synthetische Desoxyribonukleinsäuren

Das in dieser Arbeit verwendete synthetischen Gene *ambC* wurde im Klonierungsvektor pUC19 mit Ampicillinresistenz von der Firma *Gene9* bezogen.

Plasmide und Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und rekombinanten Plasmide sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Verwendete Vektoren und rekombinante Plasmide.

Plasmide	Antibiotikaresistenz	Referenz
pET28a(+)_ <i>ambDH3</i>	Kanamycin	Gesche Berkhan ¹⁰⁷
pET28a(+)_ <i>ambDH3_H51A</i>	Kanamycin	Erstellt im Rahmen der Arbeit
pET28a(+)_ <i>ambM</i>	Kanamycin	Claudia Holec ¹¹⁷
pUC19_ <i>ambC1</i>	Ampicillin	<i>Gene9</i>
pUC19_ <i>ambC2</i>	Ampicillin	<i>Gene9</i>
pUC19_ <i>ambC3</i>	Ampicillin	<i>Gene9</i>
pUC19_ <i>ambC4</i>	Ampicillin	<i>Gene9</i>
pET28a(+)	Kanamycin	<i>Novagen</i>

Oligonukleotide

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide für Polymerasekettenreaktionen.

Primer- nummer	Bezeichnung	Basensequenz (5' → 3') (Anzahl der Nukelobasen)
P1	AmbDH3_H51A_fw	CATGGGTTCTGGATGCAGTTGTTCTGGG (28)
P2	AmbDH3_H51A_bw	CCCAGAACAACACTGCATCCAGAACCCATG (28)
P3	AmbC3_fw	CATATGCAGGCACCGCGTCCGCG (23)
P4	AmbC3_bw	ATAACCGTCACGATCCGCCAGAC (23)
P5	AmbC4_fw	CCTTGGCTGGGTGCAGCCGT (20)
P6	AmbC4_bw	GAATTCATCACGTTTCGCTGGCACCAGCC (28)
P7	AmbDH4_86bp_fw	TATACATATGCAGGCACCGCGTCCGCGTCCGTCCTGACTGGAAG GTGTTGGCCTGACAGCAGCAAATCATCCTTGGCTGGGTGC AGCCG (86)
P8	AmbDH4_bw	TATAGAATTCATCACGTTTCGCTGGCACCAGCC (32)

5.1.3 Medien, Nährböden, Puffer und Lösungen

Alle Medien, Puffer und Nährböden zur Bakterienkultivierung wurden vor Gebrauch bei 121 °C autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße: 0.22 µm).

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Medien und Nährböden zur Kultivierung von *E. coli*.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	10.0 g/L Trypton 10.0 g/L NaCl 5.0 g/L Hefeextrakt
2TY-Medium	16.0 g/L Trypton 5.0 g/L NaCl 10.0 g/L Hefeextrakt
LB-Agar	10.0 g/L Trypton 10.0 g/L NaCl 5.0 g/L Hefeextrakt 15.0 g/L Agar
2TY-Agar	16.0 g/L Trypton 5.0 g/L NaCl 10.0 g/L Hefeextrakt 16.0 g/L Agar

Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen.

Verwendungszweck / Name	Zusammensetzung
Alkalische Lyse	
Lösung I	50 mM TRIS 10 mM EDTA 100 ng/mL RNase in TE-Puffer pH 8.0
Lösung II	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS
Lösung III	3 M KOAc pH 5.5
Agarosegelelektrophorese	
50x TAE-Puffer	2 M TRIS·AcOH 5 mM EDTA pH 8.0
6x DNA-Ladepuffer	0.25% (w/v) Bromphenolblau 0.25% (w/v) Xylencyanol FF

	30 % (v/v) Glycerin
SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	
<i>Lower</i> TRIS-Puffer	1.5 M TRIS pH 6.8
<i>Upper</i> TRIS-Puffer	1.5 M TRIS pH 8.8
Sammelgel (5%, 10 mL)	6.8 mL ddH ₂ O 1.7 mL 30% Acryl-Bisacrylamid Mix 1.25 mL <i>Upper</i> TRIS-Puffer 0.1 mL 10% SDS 0.1 mL 10% APS 0.01 mL TEMED
Trenngel (10%, 50 mL)	19.0 mL ddH ₂ O 17.0 mL 30% Acryl-Bisacrylamid Mix 13.0 mL <i>Lower</i> TRIS-Puffer 0.5 mL 10% SDS 0.5 mL 10% APS 0.03 mL TEMED
Trenngel (12%, 50 mL)	16.0 mL ddH ₂ O 20 mL 30% Acryl-Bisacrylamid Mix 13.0 mL <i>Upper</i> TRIS-Puffer 0.5 mL 10% SDS 0.5 mL 10% APS 0.02 mL TEMED
Trenngel (15%, 50 mL)	11.5 mL ddH ₂ O 25 mL 30% Acryl-Bisacrylamid Mix 12.5 mL <i>Upper</i> TRIS-Puffer 0.5 mL 10% SDS 0.5 mL 10% APS 0.02 mL TEMED
SDS-PAGE-Ladepuffer (1 mL)	0.8 mL 1 x Lämmli-Mix 0.1 mL 10% (w/v) SDS 0.1 mL 100 mM DTT
10 x Lämmli-Mix	150 mM TRIS (pH 6.8) 6% (w/v) SDS 30% (v/v) Glycerin 0.02% (w/v) Bromphenolblau

50 x Lämmli-Puffer	2 M Tris-Acetat 5 mM EDTA pH 8.0
Färbelösung	25% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure 1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
Entfärberlösung	25% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure

Zellaufschluss/Affinitätschromatographie

TRIS-Bindepuffer	40 mM TRIS 100 mM NaCl pH 8.0
Waschpuffer	40 mM TRIS 100 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 8.0
Elutionspuffer (Stammlösung)	40 mM TRIS 100 mM NaCl 1 M Imidazol pH 8.0

Antibiotika-Stammlösungen

Carbenicillin	50 mg/mL Carbenicillin-Dinatriumsalz in ddH ₂ O
Chloramphenicol	34 mg/mL in EtOH
Kanamycin	50 mg/mL Kanamycin-Monosulfat in ddH ₂ O

5.1.4 Geräte
Tabelle 8: Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Firma
Autoklaven	
VX-95	<i>Systec</i>
VX-150	<i>Systec</i>
Zentrifugen	
5417 R Mikrozentrifuge Rotortyp: F-45-30-11	<i>Eppendorf</i>

Heraeus Megafuge 16R	<i>Thermo Scientific</i>
Rotortyp: Highconic II	
Qik spin Mikrozentrifuge	<i>Edwards Instruments</i>
Heraeus Fresco 21 Centrifuge	<i>Thermo Scientific</i>
Rotortyp: 24 x 1.5/2.0 mL rotor with click seal	
Sorvall LYNX 6000 Centrifuge	<i>Thermo Scientific</i>
Rotortyp: F14-14x50cy	
Rotortyp: F12-6x500LEX	
Schüttler	
Innova® 44 Incubator Shaker Series	<i>New Brunswick Scientific</i>
Excella E24 Incubator Shaker Series	<i>New Brunswick Scientific</i>
Inkubatoren	
HEPATHERM Inkubator	<i>Thermo Scientific</i>
pH-Meter	
Checker	<i>Hanna</i>
pHenomenal™ pH 1000L	<i>VWR</i>
Gelkammer	
Gelkammer Mini PROTEAN Tetra System	<i>Bio-Rad</i>
GelkammerComPhor Mini	<i>Biozym Scientific GmbH</i>
PerfectBlue Gelsystem Mini S	<i>peqlab</i>
PerfectBlue Gelsystem Midi S	<i>peqlab</i>
Netzteile	
Power Supply E833	<i>Consort</i>
Power Supply E835	<i>Consort</i>
UV-Tisch	
N-90M	<i>Benda</i>
Double Vision UV/VIS	<i>Hofer</i>
Photometer	
FoodALYT Photometer	<i>FoodALYT</i>
SPECTRA max 384 Plus	<i>Molecular Devices</i>
Elisa Reader Mithras LB 940	<i>Berthold Technologies</i>
Zellaufschluss	
French Press R 125	<i>American Instrument Company</i>
Ultraschallgerät Sonoplus Typ UW31000	<i>Bandelin</i>

Thermocycler	
MJ Research Minicycler PTC-150	<i>Bio-Rad</i>
peqStar	<i>Peqlab</i>
T100™ Thermal Cycler	<i>Bio-Rad</i>
Geldokumentation	
Gel Doc™ XR+	<i>Bio-Rad</i>
Reinstwassersystem	
BARNSTEA GENPUREPRO	<i>Thermo Scientific</i>
Proteinreinigung	
ÄKTA™ pure mit UV-Dektor U9-L mit Leitfähigkeitsdetektor C9 HisTrap™ FF 5x5mL	<i>GE Healthcare Life Sciences</i>
Sonstige Geräte	
Thermomixer Comfort	<i>Eppendorf</i>
Vortex-Genie 2	<i>Scientific Industries</i>
Nanodrop DS-11 + Spectrophotometer	<i>DENOVIX®</i>
Clean Bench SAFE 2020	<i>Thermo Scientific</i>
SpeedvacConcentrator 5301	<i>Eppendorf</i>

5.2 Biologische Methoden

5.2.1 Kultivierungsmethoden

Stammhaltung

Zur Konservierung der Stämme wurden Gefrierkulturen angefertigt. Hierfür wurden 750 µL einer Bakterienkultur mit 750 µL Glycerin (50% in ddH₂O) vermischt und bei -80 °C gelagert.

5.2.2 Molekularbiologische Methoden

Transformation chemisch kompetenter Zellen (*E. coli* One Shot® TOP10 und *E. coli* BL21(DE3))

Zur Transformation von Plasmid-DNA mit chemisch kompetenten *E. coli* TOP10® Zellen wurde 1 µL Plasmid-DNA zu 50 µL chemisch kompetenten Zellen auf Eis gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 50 s. Der Transformationsansatz wurde erneut für 5 min auf Eis gestellt, nach der Zugabe von 500 µL 2TY-Medium für 1 h bei 37 °C inkubiert und im Anschluss für 30 s bei 5000 Upm zentrifugiert. Der Überstand (500 µL) wurde verworfen, das Zellpellet im

restlichen Volumen resuspendiert und auf LB-Agar Platten mit entsprechendem Antibiotikazusatz (50 µg/mL Kanamycin, Carbenicillin und/oder Chloramphenicol) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht.

Die Transformation der Plasmid-DNA nach der Ligation erfolgte nach dem gleichen Verfahren. Jedoch wurde 50 µL der chemisch kompetenten *E. coli* Top 10® Zellen mit 2 µL Ligationsansatz transformiert.

Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* One Shot® TOP10 Zellen wurden 2 mL einer Übernachtskultur (37 °C, 160 Upm) für 30 s bei 10000 Upm sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 300 µL Lösung I resuspendiert, mit 5 µL RNase vermischt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µL Lösung II und nach Vermischung der Lösungen eine Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 300 µL Lösung III wurde die Lösung vorsichtig invertiert, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, 10 Tropfen Chloroform zugegeben und anschließend für 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Plasmid-DNA enthaltene Überstand wurde in ein neues 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 650 µL Isopropanol versetzt und gut durchmischt. Nach Zentrifugation für 20 min bei 13000 Upm und 4 °C wurde das erhaltene Zellpellet mit Ethanol (70 %) gewaschen, in der Speedvac für 20 min bei 45 °C getrocknet, in 30 µL ddH₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration und -Reinheit wurde durch spektroskopische Analyse mit Hilfe der Nanodrop DS-11 + Spectrophotometer der Firma *DENOVIX*® bestimmt.

Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen wurde Agarosegelelektrophorese verwendet. Es wurde ein 1-2%iges Agarosegel (Agarose in 1 x TAE Puffer) verwendet, welches mit 0.5% Roti®-Safe-GelStain versetzt wurde. Die DNA-Probe wurde vor dem Auftragen mit 6 x Ladepuffer versetzt (1/6 des Gesamtprobenvolumens). Als Größenstandard wurden 5 µL des Markers *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (1 µL Marker, 1 µL 6-fach Ladepuffer und 4 µL ddH₂O) der Firma *Fermentas* oder 5 µL des Markers *100 bp DNA Ladder* der Firma *NEB* aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 110 V (250 mA, 150 W) für 45 min. Die Visualisierung und Dokumentation der Agarosegele erfolgte unter UV-Licht ($\lambda = 312$ nm). Für die anschließende Reinigung der DNA aus den Agarosegelen wurde das *QIAquick Purification* Kit der Firma *Qiagen* verwendet.

Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen von Plasmid-DNA und anschließende Reinigung

Die Hydrolyse, der in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektoren (pET28a(+)), sowie der durch PCR amplifizierten AmbDH4-Sequenz, erfolgte mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NdeI in einem Reaktionsvolumen von 20 µL. Die Restriktionsverdauansätze wurden für 2 h bei 37 °C und im Anschluss über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Isolierung der hydrolysierten Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese.

Tabelle 9: Hydrolyse von Plasmid DNA. Die Restriktionsenzyme EcoRI und NdeI wurden in Kombination mit CutSmart®-Puffer eingesetzt.

Reagenzien	Volumen [µL]
Plasmid-DNA	10
Buffer CutSmart®	2
20 u/µL EcoRI-HF/NdeI	1/1
Ad 20 µL ddH ₂ O	

Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Reinigung und Isolierung von linearisierter DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *QIAquick Purification* Kit der Firma *Qiagen* nach der Anleitung des Herstellers.

Ligation von linearisierten DNA-Fragmenten

Die Ligation von linearisierter Plasmid-DNA mit dem jeweiligen geschnittenen DNA-Fragment erfolgte unter Verwendung von T4-DNA-Ligase in einem Reaktionsvolumen von 10 µL über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 2 µL des Ligationsansatzes mit 50 µL chemisch kompetenten *E. coli* One Shot® TOP10 Zellen transformiert.

Tabelle 10: Ligationsansätze.

Reagenzien	Volumen [μL]
Plasmid-DNA	0.5
DNA-Fragment	5
T4-DNA-Ligase	1
10 x T4-DNA-Ligase Puffer	1
<i>Ad 10 μL mit ddH₂O</i>	

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Amplifikation von *ambDH4*

Die Amplifikation ausgehend von der synthetischen DNA *ambC4* im pUC19-Vektor wurde unter Verwendung selektiver Oligonukleotide durchgeführt (s. Tabelle 5). Zur Amplifikation wurde die Phusion® High-Fidelity-Polymerase der Firma *Thermo Scientific* verwendet. Die allgemeine Zusammensetzung der PCR-Ansätze kann Tabelle 11 entnommen werden.

Tabelle 11: Allgemeiner PCR-Ansatz zur Amplifikation von *ambDH4* ausgehend von dem synthetischen Gen puC19_ambC4.

Reagenzien	Volumen [μL]
5-fach Phusion GC Puffer	4
10 mM dNTPs	0.4
150 - 300 ng/ μL DNA	1
10 μM Vorwärts Primer	1
10 μM Rückwärts Primer	1
2 u/ μL Phusion® High-Fidelity-Polymerase	0.2
<i>Ad 20 μL mit ddH₂O</i>	

Die PCR-Ansätze wurden in einem Thermoblock mit einem jeweils auf das zu amplifizierende Gen angepassten Temperaturgradientenprogramm durchgeführt. Die verwendeten Temperaturprogramme sind der nachfolgenden Tabelle 12 zu entnehmen.

Tabelle 12: PCR-Temperaturprogramm zur Amplifikation von *ambDH4* mit der Phusion® High-Fidelity-Polymerase.

Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	Denaturierung	98	30
35-40	Denaturierung	98	10
	Annealing	62-67	30
	Elongation	72	30
1	Terminale Elongation	72	300

Die Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte anschließend im 1%igen Agarosegel. Zur Reinigung und Isolation der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurde das *QIAquick Purification Kit* der Firma *Qiagen* verwendet.

Darstellung der Punktmutante *ambDH3_H51A*

Um im aktiven Zentrum von AmbDH3 Histidin gegen Alanin auszutauschen wurde eine PCR unter Verwendung der entsprechenden Oligonukleotide (s. Tabelle 5) durchgeführt. Zur Amplifikation wurde die Phusion® High-Fidelity-Polymerase der Firma *Thermo Scientific* verwendet. Die allgemeine Zusammensetzung der PCR-Ansätze kann Tabelle 13 entnommen werden.

Tabelle 13: Allgemeiner PCR-Ansatz zur Erstellung der Punktmutante pET28a(+)*_ambDH3_H51A* ausgehend von pET28a(+)*_ambDH3*.

Reagenzien	Volumen [µL]
5-fach HF-Puffer	4.0
10 mM dNTPs	0.4
150 - 300 ng/µL DNA	1.0
10 µM Vorwärts Primer	1.5
10 µM Rückwärts Primer	1.5
DMSO	1.0
2 u/µL Phusion® High-Fidelity-Polymerase	0.2
<i>Ad</i> 20 µL mit ddH ₂ O	

Tabelle 14: PCR-Temperaturprogramm zur Erstellung der Punktmutante pET28a(+)*_ambDH3_H51A* mit der Phusion® High-Fidelity-Polymerase.

Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	Denaturierung	98	30
35-40	Denaturierung	98	10
	Annealing	45-57	10
	Elongation	72	180
1	Terminale Elongation	72	300

Nach erfolgter Amplifizierung wurde 1 µL Dnpi zum PCR-Ansatz hinzugeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der komplette PCR-Ansatz mit chemisch kompetenten *E. coli* One Shot® TOP10 Zellen transformiert. Die erfolgreiche Einführung der Punktmutation wurde durch Sequenzierung nachgewiesen.

Kolonie-PCR

Bei der Kolonie-PCR wurde anstelle von isolierter Plasmid-DNA eine Kolonie als Templat für die PCR genutzt. Zunächst wurden 8.75 µL vom Mastermix 1 (Tabelle 15) mit einer Kolonie für 3 min bei RT inkubiert und anschließend für 5 min auf 98 °C erhitzt. Nach Zugabe von 1.25 µL des Mastermix 2 (Tabelle 16) wurde das in Tabelle 17 beschriebene PCR-Temperaturprogramm durchlaufen.

Tabelle 15: Mastermix 1 für Kolonie-PCR

Reagenzien	Volumen [µL]
KCl-Puffer für Taq	1
MgCl ₂	1.6
ddH ₂ O	6.15

Tabelle 16: Mastermix 2 für Kolonie-PCR.

Reagenzien	Volumen [µL]
10 mM dNTPs	0.2
10 µM Vorwärtsprimer	0.4
10 µM Rückwärtsprimer	0.4
Taq Polymerase	0.25

Tabelle 17: PCR-Temperaturprogramm für die Kolonie-PCR mit Taq-Poylmerase.

Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	Denaturierung	98	20
35-40	Denaturierung	98	20
	Annealing	62-70	30
	Elongation	72	60
1	Terminale Elongation	72	300

5.2.3 Proteingewinnung

Alle Folgeschritte nach dem Zellaufschluss wurden bei 4 °C durchgeführt.

Heterologe Genexpression

Die Produktion der Proteine AmbDH3, AmbDH3_H51A und AmbDH4 erfolgte heterolog in *E. coli* BL21(DE3) mit den Plasmiden pET28a(+)_ambDH3, pET28a(+)_ambDH3_H51A und pET28a(+)_ambDH4. Die Produktion der Methyltransferase AmbM in *E. coli* BL21(DE3)-pG-KJE8 mit dem Plasmid pET28a(+)_ambM. Die Transformation erfolgte wie bereits beschrieben.

Nach Selektion auf antibiotikahaltigen Platten wurden 10-30 mL 2TY-Medium mit Antibiotikazusatz mit einer Einzelkolonie oder ausgehend von einer Kryokultur inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 160 Upm kultiviert. Ausgehend von den Vorkulturen wurden Hauptkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0.05 angeimpft und unter Selektionsdruck (Kanamycin, Carbenicillin und/oder Chloramphenicol 50 µg/mL) bei 37 °C und 160 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4-0.8 kultiviert. Bei der Genexpression von ambM wurde zusätzlich Tetracyclin (50 µL pro 100 mL Kultur einer 5 ng/mL Stammlösung) hinzugeben.

Durch Zugabe von 0.1 mM IPTG wurde die Genexpression induziert. Die heterologe Genexpression von His₆-AmbDH3, His₆-AmbDH3_H51A und His₆-AmbDH4 erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) Zellen für 22 h bei 25 °C und 160 Upm. Die heterologe Expression von His₆-AmbM erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)-pG-KJE8 Zellen für 22 h, bei 15 °C und 160 Upm. Die Zellen wurden im Anschluss für 15 min bei 4 °C und 5000 g sedimentiert, der Kulturüberstand abgenommen und das gebildete Zellpellet bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zellaufschluss durch French-Press

Für den Zellaufschluss mittels French-Press-Verfahren wurde das Zellpellet in Bindepuffer oder HEPES-Puffer resuspendiert (10 mL Bindungspuffer auf 1 g Zellpellet). In zwei Zyklen wurden die Zellen bei 1000 psi aufgeschlossen und im Anschluss 30 min bei 4 °C und 10000 g sedimentiert. Das erhaltende Zelllysat wurde direkt für Nickel-Affinitätschromatographie oder Enzymaktivitätstests verwendet.

Zellaufschluss durch Ultraschall

Für den Zellaufschluss mittels Ultraschall wurde das Zellpellet in Bindepuffer oder HEPES-Puffer resuspendiert (1 mL auf 0.1 g Zellpellet) und anschließend wurden die Zellen unter kontinuierlicher Eiskühlung in sieben Zyklen (45% Amplitude, 0.02 kJ/s Leistungseintrag, 30 s Ultraschall, 30 s Pause) aufgeschlossen. Die entstandenen Zelltrümmer wurden im Anschluss bei 4 °C und 10000 g für 30 min sedimentiert. Das erhaltende Zellysate wurde direkt für Nickel-Affinitätschromatographie oder Enzymaktivitätstests verwendet.

Nickel-Affinitätschromatographie

Für die gravimetrische Nickel-Affinitätschromatographie wurde eine Chromatographiesäule von *Macherey-Nagel* (Protino Ni-TED) mit einem Bettvolumen von 2 mL verwendet. Vor Beladung mit dem Lysat wurde diese mit 8 mL Equilibrierungspuffer gespült. Im Anschluss wurde das gesamte Zellysate aufgetragen und für 30 min inkubiert. Die nicht gebundenen Proteine wurden mit 10 mL Waschpuffer heruntergespült. Die gebundenen Proteine wurden mit je 5 mL Elutionspuffer ansteigender Imidazolkonzentration (50 mM auf 500 mM) eluiert. Die Fraktionen wurden getrennt aufgefangen. Zur Reinigung der Säule wurde diese mit 5 mL Elutionspuffer (1 M Imidazol) und anschließend mit 0.5 M NaOH-Lösung gespült. Die Säule wurde unter Bindepuffer gelagert.

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford¹²⁶

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wurde die Methode nach BRADFORD in Dreifachbestimmung durchgeführt. Den Herstellerangaben folgend wurden 50 µL einer verdünnten Proteinprobe mit 200 µL 1x Roti®-Nanoquant-Lösung versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 450 nm und 590 nm am Photometer gemessen. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine zuvor angefertigte BSA-Kalibrationsreihe verwendet.

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)¹²⁷

Die Analyse der Proteinzusammensetzung erfolgte durch denaturierende SDS-PAGE. Es wurden 10%ige, 12%ige oder 15%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet. Zur Probenvorbereitung wurden die aufzutrennenden Proben im Verhältnis 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend 10 min bei 95 °C inkubiert. Pro Geltasche wurden 15 µL Probe aufgetragen. Als Proteinstandard wurden 5 µL *PageRuler™ Prestained* (Thermo Scientific) oder *Color Protein Standard, Broad Range* (11-245 kDa, NEB) verwendet. Die Fokussierung der Proben im Sammelgel erfolgte bei 100 V für 25 min, die anschließende Auftrennung bei 150 V für 70 min. Zur Entwicklung der Gele wurden diese für 1 h in

Coomassie Blue Färbelösung inkubiert und im Anschluss mit der Entfärbelösung bis zur gewünschten Farbintensität entfärbt.

Membranzentrifugation

Zur Konzentrierung von Proteinproben wurden *Amicon® Ultra Centrifugal Filter Devices* der Firma *Millipore* mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa oder 30 kDa verwendet. Die Konzentrierung erfolgte bei 5500 g und 4 °C bis zum Erreichen der gewünschten Konzentration.

Gelfiltration

Zum Entsalzen und zum Pufferaustausch der Proteinproben wurden *PD-10 Säulen* der Firma *GE Healthcare* nach Herstellerangaben verwendet. Abweichend vom Protokoll wurde mit 4 mL Puffer eluiert.

5.2.4 Enzymaktivitätstest

5.2.4.1 Enzymaktivitätstests mit His₆-AmbDH3

Analytischer Maßstab

Die Untersuchung zur enzymatischen Aktivität von AmbDH3 im analytischen Maßstab wurde in einem Gesamtvolumen von 200 µL in HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl pH 6.8) mit einer Substratkonzentration von 5 mM und einer Proteinkonzentration von 5.0-5.4 mg/mL von gereinigtem His₆-AmbDH3 durchgeführt. Die Reaktion wurde 16 h bei 37 °C und 300 Upm inkubiert und anschließend mit EtOAc (3 x 5 mL) extrahiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand in 100 µL MeOH (HPLC Qualität) aufgenommen und per HPLC-MS analysiert.

Semi-präparativer Maßstab (2 bis 10 mg Substrat)

Die Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität von AmbDH3 im semi-präparativen Maßstab wurden in einem Totalvolumen von 4 mL in HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.8) mit einer Substratkonzentration von 8-10 mM und Proteinkonzentration von 5.0-5.4 mg/mL an gereinigtem His₆-AmbDH3 durchgeführt. Die Reaktion wurde 16 h bei 37 °C und 150 Ump inkubiert. Für die Aufarbeitung wurde die Lösung in ein Falcon überführt und mit EtOAc (5 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (1 mL) versetzt. Durch Zentrifugation (8000 g, 3 min, 20 °C) wurden die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde abgenommen und die wässrige noch zweimal mit EtOAc extrahiert. Das Lösungsmittel wurde

unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltende Produkt mittels ^1H NMR-Spektroskopie analysiert.

Präparativer Maßstab (>50 mg Substrat)

Für Enzymaktivitätstest im präparativen Maßstab wurden 2.0 g Pellet pro 50 mg Substrate in HEPES-Puffer (1 mL pro 0.1 g Pellet, 25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 6.8) resuspendiert und per Ultraschall (7 Zyklen, 45% Amplitude, 0.02 kJ/s, 30 s Ultraschall, 30 s Pause) aufgeschlossen. Nach anschließender Zentrifugation (10000 g, 30 min, 4 °C) wurde das erhaltende Zelllysat direkt eingesetzt. Das Substrat wurde in Toluol (1 %vol) gelöst, das Totallysat hinzugegeben und mit HEPES-Puffer bis zu einer finalen Substratkonzentration von 4 mM aufgefüllt. Die Reaktion wurde 16 h bei 30 °C und 175 Upm gerührt. Nach Zugabe von Proteinase K (4 mg pro 50 mg Substrat) und CaCl_2 (finale Konzentration 1 mM) wurde die Reaktion 2 h bei 37 °C gerührt. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Umsatz wurde mittels ^1H NMR-Spektroskopie bestimmt. Durch säulenchromatographische Reinigung ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOAc} \rightarrow 2:1 \rightarrow 1:1 \rightarrow 0:1$) konnte das gewünschte Produkt **99** erhalten werden.

5.2.4.2 Enzymaktivitätstests mit His₆-AmbDH4

Analytischer Maßstab

Die Untersuchung zur enzymatischen Aktivität von AmbDH4 im analytischen Maßstab wurde in einem Gesamtvolumen von 200 μL in HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl pH 7.5) mit einer Substratkonzentration von 5 mM und einer Proteinkonzentration von 1.5-2.0 mg/mL von gereinigtem His₆-AmbDH4 durchgeführt. Die Reaktion wurde 16 h bei 37 °C und 300 Upm inkubiert und anschließend mit EtOAc (3 x 5 mL) extrahiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand in 100 μL MeOH (HPLC Qualität) aufgenommen und per HPLC-MS analysiert.

Semi-präparativer Maßstab (2 bis 5 mg Substrat)

Die Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität von AmbDH4 im semi-präparativen Maßstab wurden in einem Totalvolumen von 4 mL in HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.5) mit einer Substratkonzentration von 2-3 mM und Proteinkonzentration von 1.5-2.0 mg/mL an gereinigtem His₆-AmbDH4 durchgeführt. Die Reaktion wurde 16 h bei 37 °C und 150 Upm inkubiert. Für die Aufarbeitung wurde die Lösung in ein Falcon überführt

und mit EtOAc (5 mL) und gesättigter NaCl-Lösung (1 mL) versetzt. Durch Zentrifugation (8000 g, 3 min, 20 °C) wurden die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde abgenommen und die wässrige noch zweimal mit EtOAc extrahiert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltende Produkt mittels ^1H NMR-Spektroskopie analysiert.

5.2.4.3 Enzymaktivitätstests mit His₆-AmbM

Analytischer Maßstab

Die Untersuchung zur enzymatischen Aktivität von AmbM im analytischen Maßstab wurde in einem Gesamtvolumen von 200 μL in HEPES-Puffer (25 mM HEPES, 100 mM NaCl pH 7.5) durchgeführt. Es wurde das Totallysat verwendet, welches durch Aufschluss von 0.8 g Zellpellet in 8 mL HEPES-Puffer und anschließender Zentrifugation der Zellen (10000 g, 30 min, 4 °C) und Konzentrierung des Lysats gewonnen wurde. Die Enzymaktivitätstest wurden mit 3 mM Substratkonzentration, 3.2 mM S-(5'-Adenosyl)-L-methionintosylat (SAM-Tosylat) und 3.2 mM MgCl_2 16 h bei 37 °C und 300 Upm durchgeführt. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc (3 x 5 mL) extrahiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurde der Rückstand in 100 μL MeOH (HPLC Qualität) aufgenommen und per HPLC-MS analysiert.

5.3 Chemische Arbeiten

Allgemeine Hinweise

Reaktionen

Alle Reaktionen mit luft- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien wurden in im Vakuum ausgeheizten Glasgeräten in einer sauerstofffreien, trockenen Intergasatmosphäre (Stickstoff oder Argon) durchgeführt.

Sämtliche Chemikalien deren Herstellung nicht beschrieben ist, wurden von den Firmen *ABCR, Acros, AppliChem, Alfa Aesar, Carl Roth, Fluka, Fluorochem, Sigma Aldrich* und *TCI* käuflich erworben und, soweit nicht anders vermerkt, ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Lösungsmittel wurden aus einer Lösungsmittel-Trockenanlage der Firma *M. Braun* oder direkt wasserfrei von den Herstellern bezogen. THF wurde vor Gebrauch über Natrium mit Benzophenon als Indikator unter Rückfluss erhitzt und anschließend destilliert. Diisopropylamin und Triethylamin wurden vor Verwendung über KOH getrocknet und destilliert.

Chromatographische Verfahren

Für die Umkehrphasen-HPLC wurde entgastes Lösungsmittel (MeCN) in HPLC-Qualität verwendet. Das verwendete Wasser wurde zuvor membranfiltriert und anschließend zweifach destilliert.

Präparative HPLC wurde an einer HPLC-Anlage der Firma *Merck Hitachi* (Pumpe L-7150, Interface D-7000, Diode Array Detector L-7450) durchgeführt. Hierfür kam folgende stationäre Phase zur Anwendung: (C18-SP) Trentec Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μ M, 250 mm· \varnothing 8 mm, entsprechende Vorsäulenkartusche, 40 mm· \varnothing 8 mm.

Alternativ wurde präparative HPLC an einer Varian HPLC-Anlage (Pumpen Prepstar Model 218, variabler Wellenlängendetektor Prostar ($\lambda = 248$ nm) mit paralleler Massendetektion (Micromass Typ ZMD ESI-Quad-Spektrometer) unter Verwendung der stationären Phasen C-18-P_[B] durchgeführt. Die verwendeten Elutionsprogramme und Retentionszeiten (t_R) sind den jeweiligen Versuchsvorschriften zu entnehmen.

Normalphasen-Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel (60 Å) der Firma *Merck* (Korngröße 35-70 µm) unter leichtem Überdruck durchgeführt. Die verwendeten Lösungsmittelkombinationen sind den jeweiligen Versuchsbeschreibungen zu entnehmen.

Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien ALUGRAM Xtra G/UV254 der Firma *Macherey-Nagel* eingesetzt. Der Nachweis erfolgte über UV-Absorption bei $\lambda = 254$ nm und/oder mit Tauchreagenzien (Anisaldehyd-, Kaliumpermanganat-, Vanillin- oder DNPH-Tauchreagenz).

Kernresonanzspektroskopie

Die Kernresonanzspektren wurden an den Geräten DPX-200, DPX-400, AVANCE-400 und DRX-500 der Firma *Bruker* aufgenommen. Die ^{13}C NMR-Spektren wurden ^1H breitbandenkoppelt aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben und wurden im ^1H NMR auf den Restprotonengehalt des Lösungsmittels (CDCl_3 : $\delta = 7.26$ ppm oder C_6D_6 : $\delta = 7.16$ ppm) bezogen. ^{13}C NMR-Spektren wurden auf das deuteriumgekoppelte Signal des Lösungsmittels (CDCl_3 : $\delta = 77.06$ ppm oder C_6D_6 : $\delta = 128.06$ ppm) kalibriert. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben.

Die Spektren wurden computergestützt mit dem Programm TOPSPIN der Firma *Bruker* ausgewertet. Für die Beschreibung der Multiplizitäten der ^1H NMR-Spektren wurden die folgenden Abkürzungen verwendet: s (Singulett), bs (breites Singulett), d (Dublett), dd (Dublett von Dubletts), t (Triplet), dt (Dublett von Triplets), q (Quartett), quin. (Quintett), m (Multipllett). Bei den ^{13}C NMR-Spektren wurden zur Kennzeichnung der Signale folgende Abkürzungen verwendet: p (primär), s (sekundär), t (tertiär), q (quartär).

Drehwerte

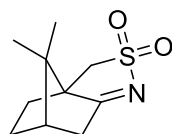
Die spezifischen optischen Rotationen $[\alpha]$ wurden bei der angegebenen Temperatur mit einem Polarimeter Typ 341 der Firma *Perkin-Elmer* in einer 10 cm Quarzglasküvette bei $\lambda = 589.3$ nm (Natrium-D-Linie) gemessen. Die Angabe der Drehwerte erfolgt in $10^{-1} \cdot \text{cm}^2 \text{g}^{-1}$, wobei die Konzentration c definitionsgemäß in 10 mg mL^{-1} angegeben ist.

Massenspektrometrie

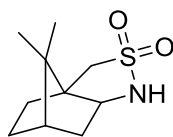
Hochaufgelöste Massenspektren (HRMS) wurden mit einem Micromass LCT mit Lock-Spray-Einheit gemessen. Die Injektion erfolgte im Loop-Modus in einer HPLC-Anlage der Firma Waters (Alliance 2695, Milford, USA). Alternativ wurden die Messungen an einer Acquity-UPLC Anlage (Waters) gekoppelt mit einem Q-TOF Premier Massenspektrometer (Waters) im Lock-Spray-Modus gemessen. Die Ionisierung erfolgte durch Elektrospray-Ionisation (ESI) oder durch chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (ACPI). Angegeben sind die berechnete und gefundene Masse.

5.3.1 Auxiliare, Hilfsreagenzien und allgemeine Synthesevorschriften

(3aS)-4,5,6,7-Tetrahydro-8,8-dimethyl-2,2-dioxid-3H-3a,6-methano-2,1-benzisothiazol (179)



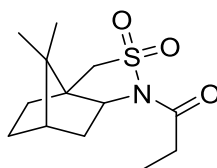
Thionylchlorid (15.6 mL, 215.35 mmol, 2.0 Äq.) wurde über 1 h tropfenweise zu (*R*)-Camphersulfonsäure (25 g, 107.62 mmol, 1.0 Äq.) gegeben und die Reaktionsmischung anschließend so lange unter Rückfluss (115 °C) erhitzt bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, mit Toluol (40 mL) codestilliert und der Rückstand in 1,4-Dioxan (40 mL) aufgenommen. Die Lösung wurde langsam in eiskalten Ammoniak (25%ig in H₂O, 410 mL) gegeben und 2 h unter Rückfluss (90 °C) erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das ausgefallene Produkt abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen. Produkt **179** wurde als farbloser Feststoff erhalten und ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.¹²⁸

(3aS)-Hexahydro-8,8-dimethyl-2,2-dioxid-3H-3a,6-methano-2,1-benzisothiazol (180)

Das Camphersulfonimin **179** (22.97 g, 107.69 mmol, 1.0 Äq.) wurde in MeOH/H₂O (3:1, 400 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. NaBH₄ (4.07 g, 107.69 mmol, 1.0 Äq.) wurde portionsweise zur Reaktionslösung gegeben und diese anschließend 2 h bei 0 °C gerührt. MeOH wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in CH₂Cl₂ aufgenommen und vorsichtig in wässrige H₂SO₄ (1 M, 150 mL) gegeben. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt **180** wurde als farbloser Feststoff (18.49 g, 85.87 mmol, 79% über zwei Stufen) erhalten.

Schmelzpunkt: 185 °C (Literatur: 190 °C); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.09 (bs, 1H, NH), 3.42 (td, *J* = 4.6, 7.9 Hz, 1H, CCHNH), 3.11 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, CH₂SO₂), 2.01-1.82 (m, 5H, CHCH₂CH, CH₂CH₂CH, CH₂CHCH₂), 1.49-1.40 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 1.36-1.27 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 1.13 (s, 3H, CCH₃), 0.93 (s, 3H, CCH₃); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 62.9 (t, CCHNH), 55.1 (s, CH₂SO₂), 50.4 (q, CCH₂SO₂), 47.5 (q, C(CH₃)₂), 44.7 (t, CH₂CHCH₂), 36.1 (s, CHCH₂CH), 31.9 (s, CH₂CH₂CH), 26.8 (s, CH₂CH₂CH), 20.5 (p, CCH₃), 20.5 (p, CCH₃).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.¹²⁸

N-propionyl OPPOLZER Sultam (110a)

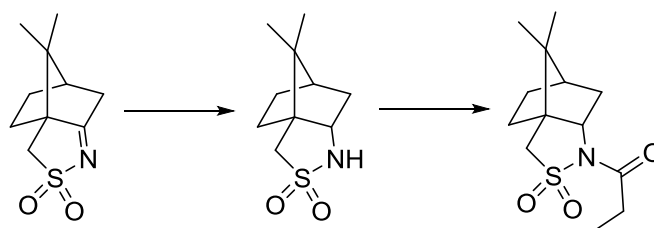
Verbindung **180** (10 g, 46.45 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem Toluol (200 mL) gelöst, portionsweise NaH (80% in Mineralöl, 2.09 g, 69.67 mmol, 1.5 Äq.) hinzugegeben und die Suspension 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von Propionylchlorid (6.07 mL, 69.67 mmol, 1.5 Äq.) wurde die Reaktionslösung weitere 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische

Reinigung (PE:EtOAc / 9:1) ergab Produkt **110a** als farblosen Feststoff (9.12 g, 33.61 mmol, 72%).

R_f: 0.26 (PE:EtOAc / 9:1); **Schmelzpunkt**: 145 °C (Literatur: 153 °C); $[\alpha]_D^{22} = +68.3$ (c = 1.0, CH₂Cl₂); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.86 (dd, J = 5.0, 7.6 Hz, 1H, CCHNH), 3.45 (m, 2H, CH₂SO₂), 2.83-2.66 (m, 2H, CH₂CH₃), 2.18-2.04 (m, 2H, CHCH₂CH), 1.96-1.83 (m, 3H, CH₂CH₂CH, CH₂CHCH₂), 1.45-1.31 (m, 2H, CH₂CH₂CH), 1.16 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.15 (s, 3H, CCH₃), 0.97 (s, 3H, CCH₃); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.7 (q, NCO), 65.3 (t, CCHNH), 53.0 (s, CH₂SO₂), 48.5 (q, CCH₂SO₂), 47.8 (q, C(CH₃)₂), 44.7 (t, CH₂CHCH₂), 38.6 (s, CHCH₂CH), 32.9 (s, CH₂CH₂CH), 29.0 (s, CH₂CH₃), 26.5 (s, CH₂CH₂CH), 20.9 (p, CCH₃), 19.9 (p, CCH₃), 8.4 (CH₂CH₃).

Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.¹²⁹

N-propionyl OPPOLZER Sultam (**110b**)



Ausgehend von (S)-Camphersulfonsäure erfolgte die Synthese des N-propioniertem OPPOLZER Sultams **110b** analog zur Synthese von **110a** (17.6 g, 64.85 mmol, 75% Ausbeute über 3 Stufen).

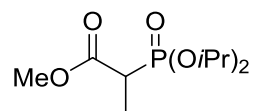
Camphersulfoniumin: **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.06 (bs, 1H, NH), 3.46-3.38 (m, 1H, CCHNH), 3.17-3.05 (m, 2H, CH₂SO₂), 2.01-1.82 (m, 5H, CHCH₂CH, CH₂CH₂CH, CH₂CHCH₂), 1.50-1.40 (m, , 1x CH₂CH₂CH), 1.37-1.26 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 1.13 (s, 3H, CCH₃), 0.93 (s, 3H, CCH₃); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 62.9 (t, CCHNH), 55.1 (s, CH₂SO₂), 50.4 (q, CCH₂SO₂), 47.5 (q, C(CH₃)₂), 44.8 (t, CH₂CHCH₂), 36.1 (s, CHCH₂CH), 31.9 (s, CH₂CH₂CH), 26.9 (s, CH₂CH₂CH), 20.6 (p, CCH₃), 20.5 (p, CCH₃).

N-propioniertes OPPOLZER Sultam (110b): **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.85 (dd, J = 5.1, 7.5 Hz, 1H, CCHNH), 3.51-3.38 (m, 2H, CH₂SO₂), 2.82-2.65 (m, 2H, CH₂CH₃), 2.18-2.03 (m, 2H, CHCH₂CH), 2.01-1.82 (m, 3H, CH₂CH₂CH, CH₂CHCH₂), 1.49-1.24 (m, 2H, CH₂CH₂CH), 1.15 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.14 (s, 3H, CCH₃), 0.96 (s, 3H, CCH₃); **¹³C NMR**

(100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 172.7 (q, NCO), 65.3 (t, CCHNH), 52.9 (s, CH₂SO₂), 48.5 (q, CCH₂SO₂), 47.8 (q, C(CH₃)₂), 44.7 (t, CH₂CHCH₂), 38.5 (s, CHCH₂CH), 32.9 (s, CH₂CH₂CH), 28.9 (s, CH₂CH₃), 26.5 (s, CH₂CH₂CH), 20.8 (p, CCH₃), 19.9 (p, CCH₃), 8.4 (CH₂CH₃).

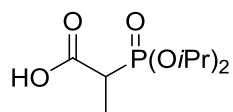
Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.^{128,129}

Methyl-2-(diisopropoxyphosphoryl)propanoat (**181**)

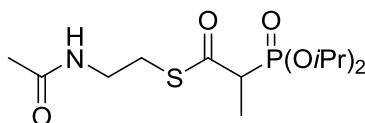


Methyl-2-bromopropionat (10 mL, 89.64 mmol, 1.0 Äq.) wurde vorgelegt, Triisopropylphosphit (22.1 mL, 89.64 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und die Reaktionsmischung 5 h unter Rückfluss erhitzt. Alle leicht flüchtigen Komponenten wurden *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Phosphonat **181** wurde ohne weitere Reinigung direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

2-(Diisopropoxyphosphoryl)propansäure (**182**)

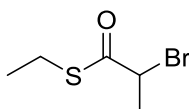


Methylester **181** (5.0 g, 19.83 mmol, 1.0 Äq.) wurde in THF (100 mL) gelöst und NaOH (0.5 M, 60 mL) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 5 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die wässrige Phase mit Et₂O extrahiert. Anschließend wurde die wässrige Phase mit HCl (1M) auf pH 1 angesäuert und mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und die erhaltene freie Säure **182** direkt ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

S-(2-Acetamidoethyl) 2-(diisopropoxyphosphoryl)propanthioat (123)

Carbonsäure **182** (3.17 g, 13.30 mmol, 1.0 Äq.) und *N*-Acetylcysteamin (2.06 g, 17.29 mmol, 1.3 Äq.) wurden in trockenem CH₂Cl₂ (10 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. DCC (2.88 g, 13.97 mmol, 1.05 Äq.) und 4-DMAP (0.16 g, 1.33 mmol, 0.1 Äq.) wurden hinzugegeben, die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Nach Zugabe von Et₂O wurde die Reaktionslösung über Celite filtriert und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc / 1:4) ergab SNAC-Thioester **123** (2.99 g, 8.80 mmol, 44% über 3 Stufen) als farbloses Öl.

R_f(EtOAc): 0.06; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.34 (bs, 1H, NH), 4.78-4.64 (m, 2H, 2x CH₃CHOP), 3.56-3.36 (m, 2H, NHCH₂), 3.30-3.12 (m, 2H, 1x CH₂S, COCHCH₃), 3.03-2.94 (m, 1H, 1x CH₂S), 1.96 (s, 3H, CH₃CO), 1.45 (d, *J* = 7.0 Hz, 1.5 H, 1.5x COCHCH₃), 1.41 (d, *J* = 6.2 Hz, 1.5 H, 1.5x COCHCH₃), 1.37-1.30 (m, 12H, 4x CH₃CHOP); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 196.2 (q, SCO), 196.1 (q, SCO), 170.5 (q, CH₃CO), 72.0 (t, CH₃CHOP), 72.0 (t, CH₃CHOP), 71.6 (t, CH₃CHOP), 71.5 (t, CH₃CHOP), 49.9 (t, COCHCH₃), 48.6 (t, COCHCH₃), 39.1 (s, NHCH₂), 29.3 (s, CH₂S), 24.2 (p, CH₃CHOP), 24.2 (p, CH₃CHOP), 24.1 (p, CH₃CHOP), 24.0 (p, CH₃CHOP), 23.9 (p, CH₃CHOP), 23.9 (p, CH₃CHOP), 23.8 (p, CH₃CHOP), 23.8 (p, CH₃CHOP), 23.8 (p, CH₃CHOP), 23.1 (p, CH₃CO), 12.6 (p, COCHCH₃), 12.5 (p, COCHCH₃); HRMS (ESI): *m/z* für C₁₃H₂₆NO₅PS [M+H]⁺: berechnet 340.1341, gefunden 340.1348.

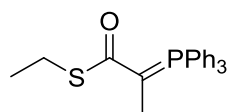
S-Ethyl 2-bromopropanthioat (183)

Brompropionsäure (1.98 mL, 21.95 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem CH₂Cl₂ (50 mL) gelöst, Ethanthiol (1.8 mL, 21.14 mmol, 1.1 Äq.) und 4-DMAP (0.27 g, 2.195 mmol, 0.1 Äq.) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung auf 0 °C abgekühlt. DCC (4.76 g, 23.05 mmol, 1.05 Äq.) wurde portionsweise hinzugegeben, die Reaktion auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert, das Filtrat wurde mit gesättigter NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das

Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der erhaltene Thioester **183** wurde ohne weitere Reinigung direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 4.50 (q, J = 6.9 Hz, 1H, CHBr), 2.94 (q, J = 7.4 Hz, 2H, CH_2S), 1.84 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH_3CHBr), 1.28 (t, J = 7.5 Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S}$); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 196.6 (q, SCO), 48.1 (t, CHBr), 24.3 (s, CH_2S), 22.1 (p, CH_3CHBr), 14.3 (p, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S}$).

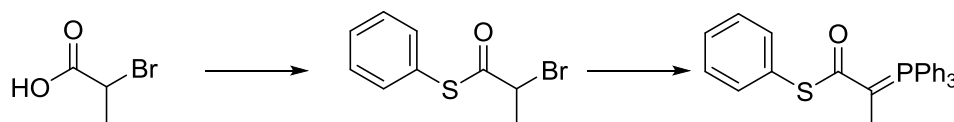
S-Ethyl-2-(triphenyl- λ^5 -phosphanyliden)propanthioat (**167**)



Thioester **183** (4.33 g, 21.95 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem Toluol gelöst (6.5 mL), PPh_3 (8.64 g, 32.93 mmol, 1.5 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion 3 h bei 100 °C gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand in heißem Wasser aufgenommen und mit EtOAc extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit NaOH (2 M) auf pH 10 eingestellt und mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Phosphoran **167** (2.42 g, 6.380 mmol, 29% über zwei Stufen) wurde ohne weitere Reinigung in hinreichender Reinheit als gelber Feststoff erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.62-7.51 (m, 9H, PPh_3), 7.49-7.42 (m, 6H, PPh_3), 2.83 (dq, J = 1.0, 7.3 Hz, 2H, CH_2S), 1.67 (d, J = 15.0 Hz, 3H, CH_3C), 1.23 (t, J = 7.3 Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S}$); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 133.7 (t, PPh_3), 133.6 (t, PPh_3), 131.8 (t, PPh_3), 131.8 (t, PPh_3), 128.8 (q, PPh_3), 128.7 (q, PPh_3), 22.6 (s, CH_2S), 16.6 (p, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S}$), 12.8 (p, CH_3C), 12.7 (p, CH_3C).

S-Phenyl-2-(triphenyl- λ^5 -phosphanyliden)propanthioat (**168**)



Brompropionsäure (2.2 mL, 24.75 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem CH_2Cl_2 (100 mL) gelöst, Thiophenol (2.8 mL, 27.23 mmol, 1.1 Äq.) und 4-DMAP (0.3 g, 2.475 mmol, 0.1 Äq.) wurden hinzugegeben und die Reaktionslösung auf 0 °C abgekühlt. DCC (5.36 g, 25.99 mmol, 1.05 Äq.) wurde portionsweise hinzugegeben, die Reaktion auf Raumtemperatur erwärmt

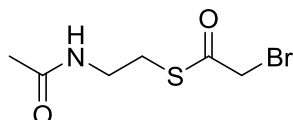
und über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wurde über Celite filtriert und das Filtrat mit gesättigter NaHCO_3 - und NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der erhaltene Thiophenolester wurde ohne weitere Reinigung direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

Der Thiophenolester (3.3 g, 13.46 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem Toluol (5 mL) gelöst, PPh_3 (5.3 g, 20.19 mmol, 1.5 Äq.) hinzugegeben und die Reaktion 3 h bei 100 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in heißem Wasser aufgenommen und mit EtOAc extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit NaOH (2 M) auf pH 10 eingestellt und mit CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Thioester **168** (0.66 g, 1.547 mmol, 6% über zwei Stufen) wurde ohne weitere Reinigung in hinreichender Reinheit erhalten.

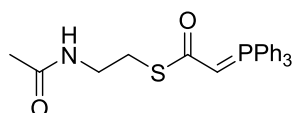
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.72-7.57 (m, 6H, aromatisch), 7.57-7.51 (m, 3H, aromatisch), 7.51-7.40 (m, 8H, aromatisch), 7.29-7.15 (m, 2H, aromatisch), 1.76 (d, J = 15.0 Hz, 3H, CH_3CPh_3).

*Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.*¹³⁰

S-(2-Acetamidoethyl) 2-bromoethanthioat (**184**)



Bromessigsäure (4.48 g, 32.30 mmol, 1.1 Äq.) und *N*-Acetylcysteamin (3.5 g, 29.37 mmol, 1.0 Äq.) wurden in trockenem CH_2Cl_2 (100 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nacheinander wurden EDC·HCl (6.17 g, 32.30 mmol, 1.1 Äq.) und 4-DMAP (0.358 g, 2.94 mmol, 0.1 Äq.) hinzugegeben, die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von HCl (1 M, 100 mL) beendet. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurde mit gesättigter NaHCO_3 - und NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der erhaltene Thioester **184** wurde ohne weitere Reinigung direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

S-(2-Acetamidoethyl)-2-(triphenyl- λ^5 -phosphanyliden)ethanthioat (145)

Thioester **184** (4.16 g, 17.32 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem Toluol (20 mL) gelöst und PPh_3 (4.55 g, 17.32 mmol, 1.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wurde 16 h bei 80 °C gerührt. Der ausgefallene gelbe Feststoff wurde abfiltriert und mit Toluol gewaschen. Das erhaltene Produkt wurde in Wasser gelöst und mit NaOH (2M) auf pH 10 eingestellt. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das Produkt **145** (5.8 g, 13.76 mmol, 47% über zwei Stufen) wurde als gelber Feststoff ohne weitere Reinigung in hinreichender Reinheit erhalten.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.67-7.56 (m, 9H, PPh_3), 7.53-7.45 (m, 6H, PPh_3), 3.81 (d, $J = 22.2$ Hz, 1H, CHPPH_3), 3.40-3.33 (m, 2H, NHCH_2), 3.02-2.95 (m, 2H, CH_2S), 1.69 (s, 3H, CH_3CO); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 181.7 (q, SCO), 181.7 (q, SCO), 170.4 (q, CH_3CO), 133.1 (t, PPh_3), 133.0 (t, PPh_3), 132.6 (q, PPh_3), 132.5 (q, PPh_3), 129.1 (t, PPh_3), 129.0 (t, PPh_3), 126.6 (q, PPh_3), 125.7 (q, PPh_3), 49.3 (t, CHPPH_3), 48.2 (t, CHPPH_3), 42.9 (s, NHCH_2), 27.5 (s, CH_2S), 27.5 (s, CH_2S), 23.1 (p, CH_3CO).

*Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur überein.*¹³¹

Allgemeine Vorschriften**Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von EVANS-Aldol-Produkten**

Propioniertes EVANS Auxiliar (**111a** oder **111b**) (1.0 Äq.) wird in trockenem CH_2Cl_2 gelöst (0.1 M), auf 0 °C abgekühlt und $n\text{Bu}_2\text{BOTf}$ (1.0 M in CH_2Cl_2 , 1.1 Äq.) tropfenweise über 15 min hinzugegeben. Nach Zugabe von DIPEA (1.4 Äq.) wird weitere 15 min bei 0 °C gerührt und anschließend die Reaktionslösung auf -78 °C abgekühlt. Der Aldehyd (2.0 Äq.) wird hinzugegeben, die Reaktion 3 h bei -78 °C gerührt und dann auf 0 °C erwärmt. Durch Zugabe von Phosphatpuffer (pH 7.4), MeOH und MeOH/30%- H_2O_2 (2:1) wird die Reaktion beendet. Nach 1 h bei 0 °C werden die Phasen getrennt, die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Aldol-Produkt wird direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von MUKAIYAMA-Aldol-Produkten unter Verwendung des OPPOLZER-Auxiliars

Propioniertes OPPOLZER-Auxiliar (**110a** oder **110b**) (1.0 Äq.) wird in CH_2Cl_2 (1 M bezogen auf das Auxiliar) gelöst und Et_3N (1.5 Äq.) und TMSOTf (1.8 Äq.) werden nacheinander tropfenweise über 15 min dazugegeben. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. In einem separaten Kolben wird der Aldehyd (1.5 Äq.) in CH_2Cl_2 (0.2 M bezogen auf das Auxiliar) gelöst und auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. TiCl_4 (1.0 M in CH_2Cl_2 , 1.5 Äq.) wird tropfenweise über 15 min hinzugegeben. Die den Silylenolether enthaltene Lösung wird auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt und anschließend tropfenweise zur anderen Lösung über 15 min hinzugegeben. Die Reaktion wird für 1.5 h bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Durch Zugabe von gesättigter NH_4Cl -Lösung wird die Reaktion beendet, anschließend auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt und für 1 h gerührt. Die Phasen werden getrennt, die wässrige Phase wird mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Aldol-Produkt wird direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

Allgemeine Vorschrift zur TBS-Schätzung von sekundären Alkoholen

Das Aldol-Produkt (1.0 Äq.) wird in trockenem CH_2Cl_2 (0.1 M) gelöst und auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. 2,6-Lutidin (1.5 Äq.) und TBSOTf (1.5 Äq.) werden nacheinander hinzugegeben, die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Durch Zugabe von gesättigter NH_4Cl -Lösung wird die Reaktion beendet. Die Phasen werden getrennt, die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung ergibt das TBS-geschützte Aldol-Produkt.

Allgemeine Vorschrift zur reduktiven Abspaltung von EVANS-, OPPOLZER- und NAGAO-Auxiliaren

Zur reduktiven Abspaltung des EVANS-, OPPOLZER- oder NAGAO-Auxiliars wird das TBS-geschützte Aldol-Produkt (1.0 Äq.) in einem Gemisch aus $\text{Et}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (20:1, 0.1 M) gelöst und auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Nach der langsamen Zugabe von LiBH_4 (1.5 Äq.) wird die Reaktionslösung über Nacht bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Durch Zugabe von HCl (1 M) wird die Reaktion beendet. Die Phasen werden getrennt, die wässrige Phase wird mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo*

entfernt. Der erhaltene primäre Alkohol wird entweder säulenchromatographisch gereinigt oder direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

Allgemeine Vorschrift zur Tosylierung von primären Alkoholen

Der primäre Alkohol (1.0 Äq.) wird in trockenem CH_2Cl_2 (0.1 M) gelöst und auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Nach Zugabe von Pyridin (1.5 Äq.) und TsCl (1.2 Äq.) wird die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und 96 h gerührt. Durch Zugabe von gesättigter NaHCO_3 -Lösung wird die Reaktion beendet und weitere 24 h gerührt. Die Phasen werden getrennt, die wässrige Phase mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Nach säulenchromatographischer Reinigung wird das Tosylat erhalten.

Allgemeine Vorschrift für die Substitutionsreaktion mit Allylmagnesiumbromid

Das Tosylat (1.0 Äq.) wird zu einer Lösung aus Allylmagnesiumbromid (1.0 M in Et_2O , 4.0 Äq.) in Et_2O (0.1 M) gegeben und 3 h bei $45\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Die Reaktionslösung wird auf $0\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt und die Reaktion durch Zugabe von gesättigter NH_4Cl -Lösung und H_2O (1:1) beendet. Nach 1 h bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ werden die Phasen getrennt, die wässrige Phase wird mit Et_2O extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene terminale Alken wird über eine kurze Filtersäule gereinigt und anschließend direkt in der nächsten Reaktion eingesetzt.

Allgemeine Vorschrift für die Ozonolyse von terminalen Alkenen

Das terminale Alken (1.0 Äq.) wird in CH_2Cl_2 (0.1 M) gelöst und auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Es wird solange durch elektrische Ladung erzeugtes Ozon durch die Lösung geleitet bis eine konstante Blaufärbung bestehen bleibt. Das überschüssige Ozon wird mit Sauerstoff vertrieben und die Reaktion durch Zugabe von PPh_3 (1.1-1.5 Äq.) beendet. Die Reaktionslösung wird auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Alle leichtflüchtigen Komponenten werden *in vacuo* entfernt. Durch säulenchromatographische Reinigung wird der Aldehyd erhalten.

Allgemeine Vorschrift für WITTIG-Reaktionen

Der Aldehyd (1.0 Äq.) wird in trockenem CH_2Cl_2 (0.1 M) gelöst und das entsprechende Phosphoniumylid (1.2-2.5 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Alle leichtflüchtigen Komponenten werden *in vacuo* entfernt. Durch säulenchromatographische Reinigung wird der α,β -ungesättigte Ester erhalten.

Allgemeine Vorschrift zur Verseifung von Methyl- und Ethylestern

Der Methyl- oder Ethylester (1.0 Äq.) wird in $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (0.1 M, 3:1) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (5.0 Äq.) wird die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. MeOH wird *in vacuo* entfernt und der Rückstand in EtOAc aufgenommen. Die wässrige Phase wird mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Die erhaltene freie Säure wird direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

Allgemeine Vorschrift zur Darstellung von N-Acetylcysteaminestern aus Carbonsäuren

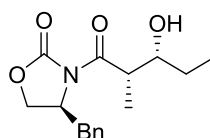
Die freie Carbonsäure (1.0 Äq.) und *N*-Acetylcysteamin (1.1 Äq.) werden in trockenem CH_2Cl_2 (0.1 M) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von $\text{EDC}\cdot\text{HCl}$ (1.1 Äq.) und 4-DMAP (0.22 Äq.) wird die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von HCl (1 M) beendet. Die Phasen werden getrennt, die wässrige Phase wird mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden mit gesättigter NaHCO_3 - und NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Durch säulenchromatographische Reinigung wird der Thioester erhalten.

Allgemeine Vorschrift zur TBS-Entschützung mit PPTS

Der TBS-geschützte Ester (1.0 Äq.) wird in MeOH (0.1 M) gelöst und PPTS (5.0-15.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktion wird 24-96 h bei 50 °C gerührt. Durch Zugabe von gesättigter NH_4Cl -Lösung wird die Reaktion beendet. MeOH wird *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wird in EtOAc aufgenommen. Die wässrige Phase wird mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Durch Normal- oder Umkehrphasensäulenchromatographie wird das entschützte Produkt erhalten.

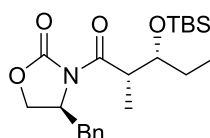
5.3.2 Verbindungen für die *in vitro* Untersuchung von AmbDH3

(S)-4-Benzyl-3-((2S,3R)-3-hydroxy-2-methylpentanoyl)oxazolidin-2-on (185)



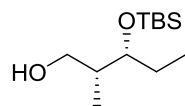
Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von EVANS-Aldol-Produkten folgend, wurde aus dem (4S)-EVANS-Auxiliar (**111a**) (6.0 g, 25.72 mmol, 1.0 Äq.), *n*Bu₂BOTf (28.3 mL, 28.29 mmol, 1.1 Äq.), DIPEA (6.3 mL, 36.01 mmol, 1.4 Äq.) und Propionaldehyd (3.7 mL, 51.44 mmol, 2.0 Äq.) Aldol-Produkt **185** erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

(S)-4-Benzyl-3-((2S,3R)-3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylpentanoyl)-oxazolidin-2-on (112)



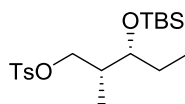
Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Schätzung folgend, wurde aus Aldol-Produkt **185** (7.49 g, 25.71 mmol, 1.0 Äq.), 2,6-Lutidin (4.5 mL, 38.56 mmol, 1.5 Äq.) und TBSOTf (8.9 mL, 38.56 mmol, 1.5 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39.1) das TBS-geschützte Produkt **112** (9.48 g, 23.40 mmol, 90% über zwei Stufen) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 39:1): 0.35; $[\alpha]_D^{21} = +23.8$ ($c = 1.3$, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.36-7.24 (m, 3H, Bn), 7.24-7.20 (m, 2H, Bn), 4.63-4.56 (m, 1H, CHBn), 4.19-4.13 (m, 2H, OCH₂CHBn), 3.96 (q, $J = 5.7$ Hz, 1H, CH(OTBS)CH₂), 3.92-3.84 (m, 1H, C(O)CHCH₃), 3.30 (dd, $J = 3.2, 13.3$ Hz, 1H, BnCH₂), 2.76 (dd, $J = 3.6, 9.7$ Hz, 1H, BnCH₂), 1.59-1.51 (m, 2H, CH₃CH₂CH), 1.20 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃CHC(O)), 0.92-0.85 (m, 12H, OSiC(CH₃)₃, CH₃CH₂CH), 0.03 (s, 3H, OSiCH₃), -0.01 (s, 3H, OSiCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 175.4 (q, OCON), 153.1 (q, NCOCH), 135.4 (q, Bn), 129.5 (t, Bn), 127.4 (t, Bn), 73.8 (t, COTBS), 66.0 (s, CH₂CHBn), 55.9 (t, CHBn), 42.3 (t, CH₃CH), 37.6 (s, BnCH₂), 28.2 (s, CH₃CH₂), 25.9 (p, OSiC(CH₃)₃), 18.1 (q, OSiC(CH₃)₃), 11.5 (p, CH₃CH), 9.4 (p, CH₃CH₂), -4.1 (p, OSiCH₃), -4.8 (p, OSiCH₃).

(2*R*,3*R*)-3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylpentan-1-ol (186)

Der allgemeinen Vorschrift zur reduktiven Abspaltung folgend, wurde aus dem TBS-geschützten Aldol-Produkt **112** (9.48 g, 23.37 mmol, 1.0 Äq.) und LiBH₄ (0.76 g, 35.06 mmol, 1.5 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (CH₂Cl₂:Et₂O / 99:1) der primäre Alkohol **186** (4.55 g, 19.57 mmol, 84%) als farbloses Öl erhalten.

R_f (CH₂Cl₂:Et₂O / 99:1): 0.70; $[\alpha]_D^{21} = +1.8$ ($c = 0.7$, CH₂Cl₂); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 3.71-3.65 (m, 2H, OHCH₂), 3.51 (dt, $J = 5.5, 11.3$ Hz, 1H, CHCHOTBS), 2.63 (dd, $J = 3.8, 6.5$ Hz, 1H, OH), 2.01-1.91 (m, 1H, OHCH₂CH), 1.55-1.47 (m, 2H, CH₃CH₂COTBS), 0.92-0.86 (m, 12H, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃, CH₃CH₂), 0.80 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃CH), 0.08 (s, 3H, OSiCH₃), 0.06 (s, 3H, OSiCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 77.3 (t, CHOTBS), 66.2 (s, OHCH₂), 39.4 (t, CH₂CHCH₃), 26.0 (p, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), 18.2 (q, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), 11.9 (p, CH₃CH), 10.9 (p, CH₃CH₂), -4.2 (p, OSiCH₃), -4.4 (p, OSiCH₃).

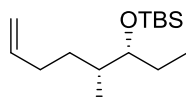
(2*R*,3*R*)-3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylpentyl-4-methylbenzensulfonat (114)

Der allgemeinen Vorschrift zur Tosylierung folgend, wurde aus dem primären Alkohol **186** (1.74 g, 7.50 mmol, 1.0 Äq.), Pyridin (0.9 mL, 11.25 mmol, 1.5 Äq.) und TsCl (1.72 g, 9.00 mmol, 1.2 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) das Tosylat **114** (2.21 g, 5.72 mmol, 76%) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 39:1): 0.37; $[\alpha]_D^{21} = +1.1$ ($c = 0.6$, CH₂Cl₂); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.78 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, Ts aromatisch), 7.33 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, Ts aromatisch), 4.00 (dd, $J = 6.4, 9.3$ Hz, 1H, TsOCH₂), 3.84 (dd, $J = 7.5, 9.2$ Hz, 1H, TsOCH₂), 3.59-3.54 (m, 1H, CHCHOTBS), 2.44 (s, 3H, TsMe), 1.97-1.87 (m, 1H, TsOCH₂CH), 1.49-1.29 (m, 2H, CH₂CH₃), 0.84-0.75 (m, 15H, OSi(CH₃)₃, CH₃CH, CH₂CH₃), 0.00 (s, 3H, OSiCH₃), -0.06 (s, 3H, OSiCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 144.8 (q, Ts aromatisch), 133.2 (q, Ts aromatisch), 129.9 (t, Ts aromatisch), 128.1 (t, Ts aromatisch), 73.3 (t, CHOTBS), 73.2 (s, TsOCH), 37.0 (t, CH₃CH), 26.7 (s, CH₂CH₃), 25.9 (p, OSi(CH₃)₃), 21.7 (p, TsMe), 18.1 (q, OSi(CH₃)₃), 10.5 (p, CH₃CH), 10.2

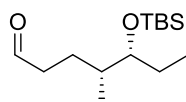
(p, CH₂CH₃), -4.1 (p, OSiCH₃), -4.7 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₁₉H₃₄O₄SSi [M+H]⁺: berechnet 387.2025, gefunden 387.2032.

tert-Butyldimethyl (((3R,4R)-4-methyloct-7-en-3-yl)oxy)silan (187)



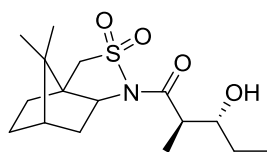
Der allgemeinen Vorschrift zur Substitution folgend, wurde aus Tosylat **114** (1.1 g, 2.84 mmol, 1.0 Äq.) und Allylmagnesiumbromid (11.4 mL, 11.36 mmol, 4.0 Äq.) nach einer kurzen Filtersäule (purer PE) das terminale Alken **187** als farbloses Öl erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

(4R,5R)-5-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-4-methylheptanal (116)

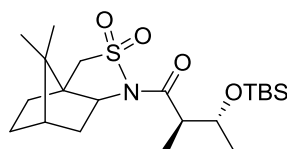


Der allgemeinen Ozonolyse-Vorschrift folgend, wurde ausgehend vom terminalen Alken **187** (200 mg, 0.781 mmol, 1.0 Äq.) und PPh₃ (307 mg, 1.171 mmol, 1.5 Äq.) nach säulen-chromatographischer Reinigung (PE:Et₂O / 39:1) Aldehyd **116** (121 mg, 0.468 mmol, 60% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 39:1): 0.33; **[α]_D²¹** = +9.66 (c = 0.9, CH₂Cl₂); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 9.76 (t, J = 1.9 Hz, 1H, HCO), 3.48-3.43 (m, 1H, CHOTBS), 2.52-2.35 (m, 2H, C(O)CH₂), 1.88-1.77 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 1.60-1.50 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 1.48-1.36 (m, 3H, CH₂CHCH₃, CH₂CH₃), 0.90-0.81 (m, 15H, OSiC(CH₃)₃, CH₂CH₃, CH₃CH), 0.04 (s, 3H, OSiCH₃), 0.02 (s, 3H, OSiCH₃); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 203.1 (t, CHO), 77.1 (t, CHOTBS), 42.5 (t, CHCH₃), 37.2 (s, CH₂CH₂CH), 26.1 (s, C(O)CH₂), 26.0 (p, OSiC(CH₃)₃), 25.0 (s, CH₂CH₃), 18.3 (q, OSiC(CH₃)₃), 14.3 (p, CH₃CH), 10.5 (p, CH₂CH₃), -4.1 (p, OSiCH₃), -4.3 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₁₄H₃₀O₂Si [M+Na]⁺: berechnet 281.1913, gefunden 281.1913.

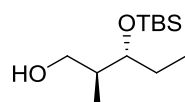
***N*-[(2*R*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methylpentanoyl]bornan-10,2-sultam (**188**)**

Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von MUKAIYAMA-Aldol-Produkten folgend, wurde aus dem propionierten OPPOLZER-Auxiliar **110a** (3.0 g, 11.03 mmol, 1.0 Äq.), NEt₃ (2.3 mL, 16.55 mmol, 1.5 Äq.), TMSOTf (3.6 mL, 19.86 mmol, 1.8 Äq.), TiCl₄ (1.0 M in CH₂Cl₂, 16.5 mL, 16.55 mmol, 1.8 Äq.) und Propionaldehyd (1.2 mL, 16.55 mmol, 1.5 Äq.) das Aldol-Produkt **188** erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

***N*-[(2*R*,3*R*)-3-(*tert*-Butyl)dimethylsilyloxy]2-methylpentanoyl]boran-10,2-sultam (**113**)**

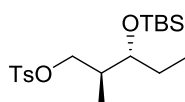
Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Schätzung folgend, wurde aus Aldol-Produkt **188** (3.64 g, 11.03 mmol, 1.0 Äq.), 2,6-Lutidin (1.9 mL, 16.55 mmol, 1.5 Äq.) und TBSOTf (3.8 mL, 16.55 mmol, 1.5 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 9:1) das TBS-geschützte Aldol-Produkt **113** (3.98 g, 8.21 mmol, 81% über zwei Stufen, *d.r.* > 10:1) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 9:1): 0.30; $[\alpha]_D^{22} = +17.5$ ($c = 1.0$, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 4.06 (ddd, $J = 3.0, 6.2, 7.3$ Hz, 1H, CHOTBS), 3.88 (dd, $J = 5.2, 7.4$ Hz, 1H, CCHN), 3.45 (m, 2H, CH₂SO₂), 3.29 (quin., $J = 6.6$ Hz, 1H, CH₃CH), 2.09-1.97 (m, 2H, CHCH₂CH), 1.95-1.82 (m, 3H, CH₂CHCH₂, CH₂CH₂CH), 1.54-1.25 (m, 4H, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH), 1.15 (s, 3H, CCH₃), 1.11 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃CH), 0.96 (s, 3H, CCH₃), 0.90-0.87 (m, 12H, OSi(CH₃)₃, CH₂CH₃), 0.09 (s, 3H, OSiCH₃), 0.06 (s, 3H, OSiCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 174.3 (q, NCO), 73.9 (t, CHOTBS), 65.4 (t, CCHN), 53.2 (s, CH₂SO₂), 48.2 (q, C(CH₃)₂), 47.8 (q, CCH₂SO₂), 46.0 (t, CH₃CH), 44.7 (t, CH₂CHCH₂), 38.6 (s, CHCH₂CH), 32.9 (s, CH₂CH₂CH), 26.5 (s, CH₂CH₂CH), 25.9 (p, OSi(CH₃)₃), 25.1 (s, CH₂CH₃), 20.8 (p, CCH₃), 19.9 (p, CCH₃), 18.2 (q, OSi(CH₃)₃), 10.7 (p, CH₃CH), 9.3 (p, CH₂CH₃), -4.3 (p, OSiCH₃), -5.0 (p, OSiCH₃); HRMS (ESI): m/z für C₂₂H₄₁O₄SSi [M+Na]⁺: berechnet 466.2423, gefunden 466.2421.

(2S,3R)-3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylpentan-1-ol (189)

Der allgemeinen Vorschrift zur reduktiven Abspaltung folgend, wurde aus dem TBS-geschützten Aldol-Produkt **113** (3.98 g, 8.98 mmol, 1.0 Äq.) und LiBH₄ (0.292 g, 13.47 mmol, 1.5 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 9:1) Alkohol **189** (1.73 g, 7.43 mmol, 92%) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc): 0.31; $[\alpha]_D^{21} = +14.5$ ($c = 1.1$, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 3.78 (dd, $J = 3.6, 10.9$ Hz, 1H, OHCH₂), 3.63 (dd, $J = 5.3, 11.1$ Hz, 1H, CHCHOTBS), 3.54 (dd, $J = 5.3, 10.9$ Hz, 1H, OHCH₂), 2.61 (bs, 1H, OH), 1.83-1.73 (m, 1H, OHCH₂CH), 1.64-1.55 (m, 2H, CH₂CH₃), 0.98 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH₃CH), 0.91-0.89 (m, 9H, OSiC(CH₃)₃), 0.87 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.09 (s, 3H, OSiCH₃), 0.08 (s, 3H, OSiCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 78.7 (t, CHCHOTBS), 65.6 (s, OHCH₂), 37.1 (t, OHCH₂CH), 27.5 (s, CH₂CH₃), 25.9 (p, OSiC(CH₃)₃), 18.0 (q, OSiC(CH₃)₃), 14.8 (p, CH₃CH), 9.0 (p, CH₂CH₃), -4.3 (p, OSiCH₃), -4.7 (p, OSiCH₃); HRMS (ESI): m/z für C₁₂H₂₈O₂Si [M+H]⁺: berechnet 233.1937, gefunden 233.1930.

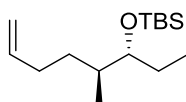
(2S,3R)-3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylpentyl-4-methylbenzensulfonat (115)

Der allgemeinen Vorschrift zur Tosylierung folgend, wurde aus Alkohol **189** (5.2 g, 22.37 mmol, 1.0 Äq.), Pyridin (2.7 mL, 33.56 mmol, 1.5 Äq.) und TsCl (4.69 g, 24.61 mmol, 1.1 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) Tosylat **115** (4.87 g, 12.60 mmol, 56%) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 39:1): 0.41; $[\alpha]_D^{21} = -14.5$ ($c = 1.1$, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.78 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, Ts aromatisch), 7.33 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, Ts aromatisch), 4.07 (dd, $J = 5.1, 9.2$ Hz, 1H, TsOCH₂), 3.85 (dd, $J = 7.2, 9.6$ Hz, 1H, TsOCH₂), 3.49 (q, $J = 5.6$ Hz, 1H, CHCHOTBS), 2.44 (s, 3H, TsMe), 1.99-1.88 (m, 1H, TsOCH₂CH), 1.49-1.31 (m, 2H, CH₂CH₃), 0.86 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃CH), 0.83-0.77 (m, 12H, OSiC(CH₃)₃, CH₂CH₃), 0.00 (s, 3H, OSiCH₃), -0.04 (s, 3H, OSiCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 144.6 (q, Ts aromatisch),

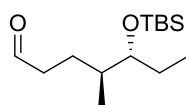
133.1 (q, Ts aromatisch), 129.8 (t, Ts aromatisch), 128.0 (t, aromatisch), 74.1 (t, CHCHOTBS), 72.8 (s, TsOCH₂), 36.9 (t, TsOCH₂CH), 26.2 (s, CH₂CH₃), 25.8 (p, OSiC(CH₃)₃), 21.6 (p, TsMe), 18.0 (q, OSiC(CH₃)₃), 13.4 (p, CH₃CH), 8.6 (p, CH₂CH₃), -4.3 (p, OSiCH₃), -4.8 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₁₉H₃₄O₄SSi [M+Na]⁺: berechnet 409.1844, gefunden 409.1848.

tert-Butyldimethyl(((3R,4S)-4-methyloct-7-en-3-yl)oxy)silan (190)



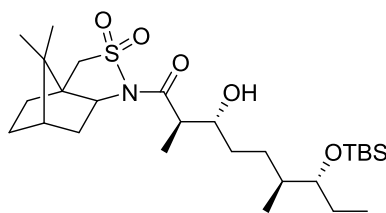
Der allgemeinen Vorschrift zur Substitution folgend, wurde aus Tosylat **115** (0.577 g, 1.49 mmol, 1.0 Äq.) und Allylmagnesiumbromid (6 mL, 5.96 mmol, 4.0 Äq.) nach einer kurzen Filtersäule (purer PE) das terminale Alken **190** als farbloses Öl erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

(4S,5R)-5-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-4-methylheptanal (117)

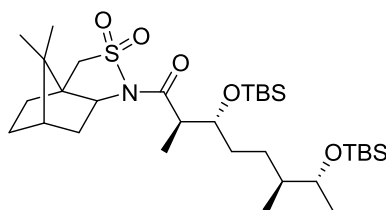


Der allgemeinen Ozonolyse Vorschrift folgend, wurde aus dem terminalen Alken **190** (0.588 g, 2.29 mmol, 1.0 Äq.) und PPh₃ (0.721 g, 2.75 mmol, 1.2 Äq.) nach säulen-chromatographischer Reinigung (PE:Et₂O / 39:1) Aldehyd **117** (0.448 g, 1.73 mmol, 78% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:Et₂O / 39:1) = 0.28; $[\alpha]_D^{21} = -35.3$ (c = 1.5, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 9.77 (t, J = 1.9 Hz, 1H, HCO), 3.44 (q, J = 5.3 Hz, 1H, CHOTBS), 2.54-2.45 (m, 1H, C(O)CH₂), 2.43-2.33 (m, 1H, C(O)CH₂), 1.82-1.72 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 1.63-1.53 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 1.53-1.47 (m, 3H, CH₂CHCH₃, CH₂CH₃), 0.90-0.84 (m, 15H, OSiC(CH₃)₃, CH₂CH₃, CH₃CH), 0.04 (s, 3H, OSiCH₃), 0.03 (s, 3H, OSiCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 202.9 (t, HCO), 77.2 (t, CHOTBS), 42.2 (t, CH₂CHCH₃), 37.1 (s, CH₂CH₂CH), 26.0 (p, OSiC(CH₃)₃), 25.6 (s, C(O)CH₂), 24.3 (s, CH₂CH₃), 18.2 (q, OSiC(CH₃)₃), 15.0 (p, CH₃CH), 9.9 (p, CH₂CH₃), -4.3 (p, OSiCH₃), -4.5 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₁₄H₃₀O₂Si [M+Na]⁺: berechnet 281.1912, gefunden 281.1914.

***N*-[(2*R*,3*R*,6*S*,7*R*)-7-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylnonaoyl]boran-10,2-sultam (**191**)**

Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von MUKAIYAMA-Aldol-Produkten folgend, wurde aus dem propionierten OPPOLZER-Auxiliar **110a** (0.303 g, 1.12 mmol, 1.0 Äq.), NEt₃ (0.23 mL, 1.68 mmol, 1.5 Äq.), TMSOTf (0.36 mL, 2.01 mmol, 1.8 Äq.), TiCl₄ (1.0 M in CH₂Cl₂, 1.7 mL, 1.68 mmol, 1.8 Äq.) und Aldehyd **117** (0.433 mg, 1.68 mmol, 1.5 Äq.) das Aldol-Produkt **191** erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

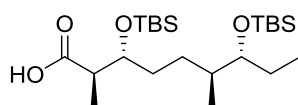
***N*-[(2*R*,3*R*,6*S*,7*R*)-3,7-Bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylnonaoyl]boran-10,2-sultam (**192**)**

Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Schützung folgend, wurde aus Aldol-Produkt **191** (0.592 g, 1.12 mmol, 1.0 Äq.), 2,6-Lutidin (0.19 mL, 1.68 mmol, 1.5 Äq.) und TBSOTf (0.38 mL, 1.68 mmol, 1.5 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) das TBS-geschützte Aldol-Produkt **192** (0.340 g, 0.53 mmol, 47% über zwei Stufen, *d.r.* > 10:1) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 19:1): 0.52; $[\alpha]_D^{22} = +27.4$ ($c = 1.0$, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 4.12-4.05 (m, 1H, C(O)CHCHOTBS), 3.88 (dd, $J = 4.9, 7.6$ Hz, 1H, CCHN), 3.45 (m, 2H, CH₂SO₂), 3.40-3.35 (m, 1H, CH(OTBS)CH₂CH₃), 3.35-3.27 (m, 1H, C(O)CHCH₃), 2.05-2.00 (m, 1H, 1x CHCH₂CH), 2.00-1.81 (m, 4H, 1x CHCH₂CH, CH₂CHCH₂, CH₂CH₂CHCH₂), 1.55-1.31 (m, 6H, 1x CH(OTBS)CH₂CH₂, CH₂CHCH₃, CHCH(OTBS)CH₂CH₃, CH₂CH₃, CCH₂CH₂), 1.23-1.16 (m, 1H, 1x CH(OTBS)CH₂CH₂), 1.15 (s, 3H, CCH₃), 1.12 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH₃CHC(O)), 0.96 (s, 3H, CCH₃), 0.88 (m, 18H, OSi(CH₃)₃), 0.83 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.78 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃CHCH₂), 0.10 (s, 3H, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), 0.06 (s, 3H, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), 0.02 (s, 3H, OSiCH₃), 0.01 (s, 3H, OSiCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 174.1 (q, NCO), 78.0 (t, CH(OTBS)CH₂CH₃), 72.8

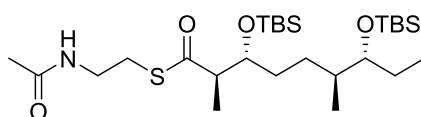
(t, C(O)CHCHOTBS), 65.4 (t, CCHNH), 53.2 (s, CH₂SO₂), 48.1 (q, CCH₂SO₂), 47.8 (q, C(CH₃)₂), 46.7 (t, C(O)CHCH₃), 44.7 (t, CH₂CHCH₂), 38.7 (s, CHCH₂CH), 37.6 (t, CHCH(OTBS)CH₂CH₃), 32.9 (s, CCH₂CH₂), 30.3 (s, CH(OTBS)CH₂CH₂), 28.3 (s, CH₂CHCH₃), 26.5 (s, CH₂CH₂CHCH₂), 26.1 (s, CH₂CH₃), 26.0 (p, OSi(CH₃)₃), 26.0 (p, OSi(CH₃)₃), 20.9 (p, CCH₃), 19.9 (p, CCH₃), 18.2 (q, OSi(CH₃)₃), 18.1 (q, OSi(CH₃)₃), 14.4 (p, CH₃CHCH₂), 10.2 (p, CH₂CH₃), 10.0 (p, CH₃CHC(O)), -4.2 (p, OSiCH₃), -4.3 (p, OSiCH₃), -4.3 (p, OSiCH₃), -5.0 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₃₃H₆₅O₅SSi₂ [M+Na]⁺: berechnet 666.4020, gefunden 666.4020.

(2R,3R,6S,7R)-3,7-Bis((tert-butyltrimethylsilyloxy)-2,6-dimethylnonansäure (193)



Das TBS-geschützte Aldol-Produkt **192** (0.324 g, 0.50 mmol, 1.0 Äq.) wurde in THF:H₂O (4 mL, 3:1) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von H₂O₂ (35%ig, 0.22 mL, 2.52 mmol, 5.0 Äq.) und LiOH·H₂O (26 mg, 0.63 mmol, 1.25 Äq.) wurde die Reaktion auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Durch Zugabe von NaHSO₃ (1.5 M, 6 mL) wurde die Reaktion beendet. THF wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und die erhaltene Säure **193** direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

S-(2-Acetamidoethyl)-(2R,3R,6S,7R)-3,7-bis((tert-butyltrimethylsilyloxy)-2,6-dimethylnonanthioat (194)

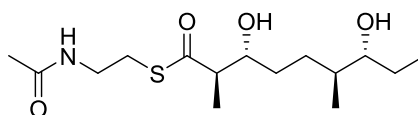


Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von *N*-Acetylcysteaminestern folgend, wurde aus der freien Säure **193** (112 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äq.), *N*-Acetylcysteamin (33 mg, 0.28 mmol, 1.1 Äq.), EDC·HCl (53 mg, 0.28 mmol, 1.1 Äq.) und 4-DMAP (7 mg, 0.06 mmol, 0.22 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 1:1) SNAC-Thioester **194** (62 mg, 0.11 mmol, 45% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 1:1) = 0.44; **[α]_D²¹** = -48.5 (c = 1.0, CH₂Cl₂); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃,) δ [ppm] = 5.91 (bs, 1H, NH), 4.00-3.93 (m, 1H, C(O)CHCHOTBS), 3.45-3.37 (m, 3H, NHCH₂,

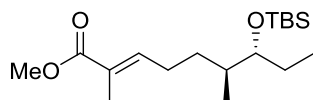
CH(OTBS)CH₂CH₃), 3.09-3.00 (m, 1H, CH₂S), 2.97-2.89 (m, 1H, CH₂S), 2.83 (quin., $J = 7.1$ Hz, 1H, C(O)CHCH₃), 1.95 (s, 3H, CH₃CO), 1.28-1.08 (m, 7H, CH(OTBS)CH₂CH₂, CH₂CHCH₃, CHCH(OTBS)CH₂CH₃, CH₂CH₃), 1.08 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃CHC(O)), 0.91-0.80 (m, 24H, 2x OSi(CH₃)₃, CH₂CH₃, CH₃CHCH₂), 0.04 (s, 3H, OSiCH₃), 0.02 (s, 3H, OSiCH₃), 0.01 (s, 3H, OSiCH₃), -0.01 (s, 3H, OSiCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 202.9 (q, SCO), 170.2 (q, CH₃CONH), 77.4 (t, CH(OTBS)CH₂CH₃), 73.6 (t, C(O)CHCHOTBS), 53.9 (t, C(O)CHCH₃), 39.7 (s, NHCH₂), 38.3 (t, CHCH(OTBS)CH₂CH₃), 31.4 (s, CH₂CHCH₃), 28.4 (s, CH₂S), 26.1 (s, CH(OTBS)CH₂CH₂), 26.0 (p, OSi(CH₃)₃), 25.8 (p, OSi(CH₃)₃), 25.2 (s, CH₂CH₃), 23.2 (p, CH₃CO), 18.2 (q, OSi(CH₃)₃), 18.1 (q, OSi(CH₃)₃), 15.1 (p, CH₃CHCH₂), 13.2 (p, CH₃CHC(O)), 10.3 (p, CH₂CH₃), -4.3 (p, OSiCH₃), -4.3 (p, OSiCH₃), -4.5 (p, OSiCH₃), -5.0 (p, OSiCH₃); HRMS (ESI): m/z für C₂₇H₅₇NO₄SSi₂ [M+Na]⁺: berechnet 570.3445, gefunden 570.3448.

S-(2-Acetamidoethyl) (2R,3R,6S,7R)-3,7-dihydroxy-2,6-dimethylnonanthioat (105)



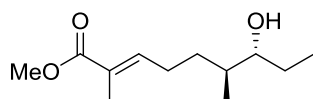
Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus SNAC-Thioester **194** (30 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (206 mg, 0.82 mmol, 15.0 Äq.) nach 96 h bei 50 °C und anschließender Reinigung per HPLC (H₂O:CH₃CN = 95:5 {10 min}, Gradient H₂O:CH₃CN 95:5 → 0:100 {70 min}, H₂O:CH₃CN = 0:100 {10 min}, 15 mL/min) Produkt **105** (14 mg, 0.04 mmol, 82%) als farbloses Öl erhalten.

$t_R = 40$ min; $[\alpha]_D^{21} = -11.0$ (c = 0.2, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 6.05 (bs, 1H, NH), 3.74-3.66 (m, 1H, C(O)CHCHOH), 3.51-3.38 (m, 2H, NHCH₂), 3.36-3.30 (m, 1H, CH(OH)CH₂CH₃), 3.11-2.95 (m, 2H, CH₂S), 2.78 (quin., $J = 6.9$ Hz, 1H, C(O)CHCH₃), 1.96 (s, 3H, CH₃CO), 1.84-1.45 (m, 4H, 1x CH₂CHCH₃, CHCH(OH)CH₂CH₃, CH₂CH₃), 1.45-1.30 (m, 2H, CH(OH)CH₂CH₂), 1.29-1.16 (m, 1H, 1x CH₂CHCH₃), 1.22 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, CH₃CHC(O)), 0.95 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.89 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃CHCH₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 204.2 (q, SCO), 170.6 (q, CH₃CONH), 77.2 (t, CH(OH)CH₂CH₃), 74.5 (t, C(O)CHCHOH), 53.8 (t, C(O)CHCH₃), 39.4 (s, NHCH₂), 38.5 (t, CHCH(OH)CH₂CH₃), 32.2 (s, CH₂CHCH₃), 28.8 (s, CH₂S), 27.9 (s, CH(OH)CH₂CH₂), 26.6 (s, CH₂CH₃), 23.2 (p, CH₃CO), 15.8 (p, CH₃CHCH₂), 15.1 (p, CH₃CHC(O)), 10.2 (p, CH₂CH₃); HRMS (ESI): m/z für C₁₅H₂₉NO₄S [M+H]⁺: berechnet 320.1896, gefunden 320.1902.

Methyl-(6*S*,7*R*,*E*)-7-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnon-2-enoate (195)

Der allgemeinen Vorschrift für WITTIG-Reaktionen folgend, wurde aus Aldehyd **117** (122 mg, 0.47 mmol, 1.0 Äq.) und Phosphoran **125** (197 mg, 0.57 mmol, 1.2 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) Methylester **195** (142 mg, 0.37 mmol, 92%) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 39:1) = 0.53; $[\alpha]_D^{23} = +3.0$ ($c = 1.2$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 6.75 (dt, $J = 1.4, 7.4$ Hz, 1H, C=CH), 3.73 (s, 3H, OMe), 3.42 (q, $J = 5.3$ Hz, 1H, CHOTBS), 2.29-2.18 (m, 1H, 1x C=CHCH₂), 2.16-2.04 (m, 1H, 1x C=CHCH₂), 1.84 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H, CH₃C=CH), 1.64-1.45 (m, 2H, CH₃CH, CH₂CHCH₃), 1.44-1.36 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.28-1.16 (m, 1H, CH₂CHCH₃), 0.90-0.83 (m, 15H, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃, CH₂CH₃, CH₃CH), 0.03 (s, 3H, OSiCH₃), 0.02 (s, 3H, OSiCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 168.8 (q, MeOCO), 142.9 (t, C=CH), 127.4 (q, C=CH), 77.3 (t, CHOTBS), 51.7 (p, MeO), 37.5 (t, CH₃CH), 31.1 (s, CH₂CHCH₃), 26.7 (s, C=CHCH₂), 26.0 (p, OSiC(CH₃)₃), 25.3 (s, CH₂CH₃), 18.2 (q, OSiC(CH₃)₃), 14.9 (p, CH₃CH), 12.4 (p, CH₃C=CH), 10.2 (p, CH₂CH₃), -4.3 (p, OSiCH₃), -4.5 (p, OSiCH₃); HRMS (ESI): m/z für C₁₈H₃₆O₃Si [M+Na]⁺: berechnet 351.2331, gefunden 351.2332.

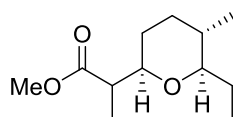
Methyl-(6*S*,7*R*,*E*)-7-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnon-2-enoat (196)

Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus Methylester **195** (119 mg, 0.36 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (571 mg, 1.81 mmol, 5.0 Äq.) nach 24 h bei 50 °C und anschließender säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 9:1) der entschützte Methylester **196** (36 mg, 0.17 mmol, 47%) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 9:1) = 0.11; $[\alpha]_D^{21} = -9.0$ ($c = 0.7$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 6.74 (dt, $J = 1.4, 7.4$ Hz, 1H, C=CH), 3.71 (s, 3H, OMe), 3.37-3.31 (m, 1H, CHOH), 2.31-2.20 (m, 1H, C=CHCH₂), 2.18-2.06 (m, 1H, C=CHCH₂), 1.82 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H, CH₃C=CH), 1.67-1.46 (m, 3H, 1x CH₂CHCH₃, CH₃CH, CH₂CH₃), 1.43-1.31 (m, 1H, CH₂CH₃), 1.30-1.18 (m, 1H, 1x CH₂CHCH₃), 0.95 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.90 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH₃CH); $^{13}\text{C NMR}$

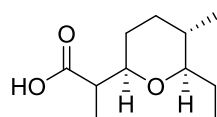
(100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 168.7 (q, MeOCO), 142.6 (t, C=CH), 127.5 (q, C=CH), 77.3 (t, CHOH), 51.7 (p, MeO), 38.1 (t, CH₃CH), 30.7 (s, CH₂CHCH₃), 26.4 (s, C=CHCH₂), 26.4 (s, CH₂CH₃), 15.3 (p, CH₃CH), 12.4 (p, CH₃C=CH), 10.3 (p, CH₂CH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₁₂H₂₂O₃ [M+Na]⁺: berechnet 237.1467, gefunden 237.1463.

Methyl-2-((2R,5S,6R)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)propanoat (197a/b)

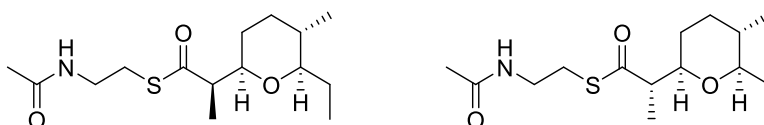


Der α,β -ungesättigte Methylester **196** (52 mg, 0.24 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem CH₂Cl₂ (2 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von *t*-BuOK (27 mg, 0.24 mmol, 1.0 Äq.) wurde die Reaktion 4 h bei 0 °C gerührt. Durch Zugabe von gesättigter NH₄Cl-Lösung (2 mL) wurde die Reaktion beendet. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc / 19:1) ergab ein untrennbares Diastereomeregemisch von Produkt **197a/197b** (22 mg, 0.11 mmol, 42%).

R_f (PE:EtOAc / 9:1) = 0.48; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 3.70 und 3.68 (s, 3H, CH₃O), 3.44-3.36 (m, 1H, C(O)CHCHO), 2.85-2.76 (m, 1H, OCHCH₂CH₃), 2.57-2.47 (m, 1H, COCHCH₃), 1.84-1.60 (m, 2H, 1x CH₂CHCH₃, 1x CH₂CH₃), 1.59-1.52 (m, 1H, 1x CHOCH₂CH₂), 1.40-1.26 (m, 3H, 1x CHOCH₂CH₂, CH₂CHCH₃, 1x CH₂CH₃), 1.24 (d, J = 6.8 Hz, 2H, COCHCH₃), 1.23-1.15 (m, 1H, 1x CH₂CHCH₃), 1.11 (d, J = 7.2 Hz, 1H, COCHCH₃), 0.97-0.91 (m, 2H, CH₂CH₃), 0.89 (t, J = 7.5 Hz, 1H, CH₂CH₃), 0.81 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH₂CHCH₃); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 176.1 (q, CH₃OC(O)), 175.5 (q, CH₃OC(O)), 85.0 (t, OCHCH₂CH₃), 84.9 (t, OCHCH₂CH₃), 79.7 (t, C(O)CHCHO), 78.5 (t, C(O)CHCHO), 51.5 (p, OCH₃), 51.5 (p, OCH₃), 45.8 (t, COCHCH₃), 45.7 (t, COCHCH₃), 35.2 (t, CH₂CHCH₃), 35.0 (t, CH₂CHCH₃), 32.9 (s, CH₂CHCH₃), 32.8 (s, s, CH₂CHCH₃), 30.0 (s, CHOCH₂CH₂), 29.1 (s, CHOCH₂CH₂), 26.1 (s, CH₂CH₃), 25.9 (s, CH₂CH₃), 17.7 (p, CH₂CHCH₃), 17.7 (p, CH₂CHCH₃), 13.4 (p, COCHCH₃), 13.2 (p, COCHCH₃), 9.9 (p, CH₂CH₃), 9.9 (p, CH₂CH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₁₂H₂₂O₃ [M+Na]⁺: berechnet 237.1467, gefunden 237.1472.

2-((2R,5S,6R)-6-Ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)propansäure (198a/b)

Der allgemeinen Vorschrift zur Verseifung von Methylestern folgend, wurde aus Methylester **197a/b** (22 mg, 0.10 mmol, 1.0 Äq.) und LiOH·H₂O (22 mg, 0.51 mmol, 5.0 Äq.) die freie Säure als Diastereomerenmisch **198a/198b** erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

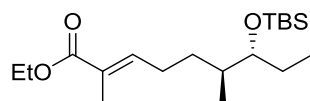
S-(2-Acetamidoethyl)-(R)-2-((2R,5S,6R)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)propanthioat (99) und S-(2-Acetamidoethyl)-(S)-2-((2R,5S,6R)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)propanthioat (97)

Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von *N*-Acetylcysteaminestern folgend, wurden aus der freien Säure **198a/b** (21 mg, 0.11 mmol, 1.0 Äq.), *N*-Acetylcysteamin (14 mg, 0.12 mmol, 1.1 Äq.), EDC·HCl (22 mg, 0.17 mmol, 1.1 Äq.) und 4-DMAP (3 mg, 0.02 mmol, 0.22 Äq.) nach Reinigung per HPLC (H₂O:CH₃CN = 95:5 {10 min}, Gradient H₂O:CH₃CN 95:5 → 0:100 {70 min}, H₂O:CH₃CN = 0:100 {10 min}, 15 mL/min) Produkt **99** (10 mg, 0.03 mmol, 32%) und Produkt **97** (2 mg, 0.01 mmol, 7%) als farblose Feststoffe erhalten.

Diastereomer 1: t_R : 58 min; $[\alpha]_D^{24} = +2.0$ (c = 0.2, CH₂Cl₂); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 5.86 (bs, 1H, NH), 3.51-3.40 (m, 3H, C(O)CHCHO, NHCH₂), 3.07-2.95 (m, 2H, CH₂S), 2.81-2.68 (m, 2H, OCHCH₂CH₃, COCHCH₃), 1.95 (s, 3H, CH₃CO), 1.83-1.76 (m, 1H, 1x CH₂CHCH₃), 1.71-1.60 (m, 2H, 1x CH₂CH₃, 1x CHOCH₂CH₂), 1.38-1.13 (m, 4H, CH₂CHCH₃, 1x CHOCH₂CH₂, 1x CH₂CHCH₃, 1x CH₂CH₃), 1.10 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, COCHCH₃), 0.86 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.79 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH₂CHCH₃); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 203.5 (q, SCO), 170.2 (q, CH₃CO), 84.8 (t, OCHCH₂CH₃), 79.4 (t, C(O)CHCHO), 54.3 (t, COCHCH₃), 39.9 (s, NHCH₂), 35.0 (t, CH₂CHCH₃), 32.7 (s, CH₂CHCH₃), 29.1 (s, CHOCH₂CH₂), 28.5 (s, CH₂S), 26.0 (s, CH₂CH₃), 23.3 (p, CH₃CO), 17.7 (p, CH₂CHCH₃), 14.0 (p, COCHCH₃), 9.8 (p, CH₂CH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₁₅H₂₇NO₃S [M+H]⁺: berechnet 302.1790, gefunden 302.1764.

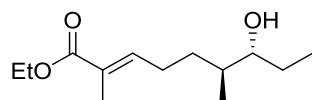
Diastereomer 2: t_R : 61 min; $[\alpha]_D^{24} = +26.0$ ($c = 0.9$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 5.82 (bs, 1H, NH), 3.48-3.37 (m, 3H, NHCH_2 , C(O)CHCHO), 3.01 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, CH_2S), 2.81 (dt, $J = 2.6, 9.2$ Hz, 1H, $\text{OCHCH}_2\text{CH}_3$), 2.72 (quin., $J = 7.1$ Hz, 1H, COCHCH_3), 1.95 (s, 3H, CH_3CO), 1.79-1.65 (m, 2H, 1x CH_2CHCH_3 , 1x CH_2CH_3), 1.59-1.52 (m, 1H, 1x $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2$), 1.38-1.27 (m, 3H, 1x $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2$, CH_2CHCH_3 , 1x CH_2CH_3), 1.25 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, COCHCH_3), 1.21-1.09 (m, 1H, 1x CH_2CHCH_3), 0.92 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.79 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, CH_2CHCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 202.9 (q, SCO), 170.2 (q, CH_3CO), 85.1 (t, $\text{OCHCH}_2\text{CH}_3$), 78.4 (t, C(O)CHCHO), 54.5 (t, COCHCH_3), 39.9 (s, NHCH_2), 35.0 (t, CH_2CHCH_3), 32.8 (s, CH_2CHCH_3), 30.0 (s, $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2$), 28.3 (s, CH_2S), 26.1 (s, CH_2CH_3), 23.3 (p, CH_3CO), 17.7 (p, CH_2CHCH_3), 14.2 (p, COCHCH_3), 9.9 (p, CH_2CH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: berechnet 302.1790, gefunden 302.1779.

Ethyl-(6*S*,7*R*,*E*)-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnon-2-enoat (**199**)



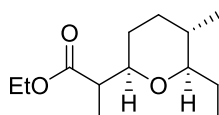
Der allgemeinen Vorschrift für WITTIG-Reaktionen folgend, wurde aus Aldehyd **117** (267 mg, 1.03 mmol, 1.0 Äq.) und Phosphoran **147** (450 mg, 1.23 mmol, 1.2 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) Ethylester **199** (311 mg, 0.91 mmol, 88%) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 39:1): 0.04; $[\alpha]_D^{21} = -2.7$ ($c = 0.9$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 6.74 (dt, $J = 1.4, 7.4$ Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 4.18 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 3.46-3.39 (m, 1H, CHOTBS), 2.29-2.18 (m, 1H, 1x $\text{C}=\text{CHCH}_2$), 2.17-2.04 (m, 1H, 1x $\text{C}=\text{CHCH}_2$), 1.64 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), 1.45-1.35 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.33-1.17 (m, 1H, 1x CH_2CHCH_3), 1.28 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 0.91-0.82 (m, 15H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$, CH_2CH_3 , CHCH_3), 0.03 (s, 3H, OSiCH_3), 0.02 (s, 3H, OSiCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 168.3 (q, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCO}$), 142.5 (t, $\text{C}=\text{CH}$), 127.7 (q, $\text{C}=\text{CH}$), 77.3 (t, CHOTBS), 60.4 (s, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 37.6 (t, CHCH_3), 31.1 (s, CH_2CHCH_3), 26.7 (s, $\text{C}=\text{CHCH}_2$), 26.0 (p, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 25.2 (s, CH_2CH_3), 18.2 (q, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 14.8 (p, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 14.3 (p, CHCH_3), 12.4 (p, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), 10.2 (p, CH_2CH_3), -4.3 (p, OSiCH_3), -4.5 (p, OSiCH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_3\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 365.2488, gefunden 365.2492.

Ethyl-(6*S*,7*R*,*E*)-7-hydroxy-2,6-dimethylnon-2-enoat (139)

Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus Ethylester **199** (3.64 g, 10.63 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (10.05 g, 31.88 mmol, 3.0 Äq.) nach 24 h bei 50 °C und anschließender säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 9:1 → 4:1) der entschützte Ethylester **139** (2.15 mg, 9.42 mmol, 87%) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 9:1): 0.16; $[\alpha]_D^{22} = -9.1$ ($c = 0.7$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 6.78-6.72 (m, 1H, C=CH), 4.18 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 3.40-3.33 (m, 1H, CHOH), 2.32-2.21 (m, 1H, 1x C=CHCH₂), 2.19-2.07 (m, 1H, 1x C=CHCH₂), 1.84 (d, $J = 1.4$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), 1.69-1.49 (m, 3H, 1x CH_2CH_3 , 1x CH_2CHCH_3 , CH_2CHCH_3), 1.45-1.34 (m, 1H, 1x CH_2CH_3), 1.29-1.22 (m, 1H, 1x CH_2CHCH_3), 1.28 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 0.97 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.92 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CHCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 168.3 (q, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCO}$), 142.2 (t, C=CH), 127.9 (q, C=CH), 77.4 (t, CHOH), 60.5 (s, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 38.2 (t, CHCH_3), 30.7 (s, CH_2CHCH_3), 26.4 (s, C=CHCH₂), 26.4 (s, CH_2CH_3), 15.3 (p, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 14.3 (p, CHCH_3), 12.4 (p, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), 10.4 (p, CH_2CH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: berechnet 251.1623, gefunden 251.1625.

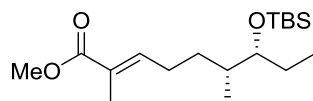
Ethyl-2-((2*R*,5*S*,6*R*)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)propanoat (140a/b)

Der α,β -ungesättigte Ethylester **139** (2.15 g, 9.42 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem CH_2Cl_2 (100 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von *t*-BuOK (1.06 g, 9.42 mmol, 1.0 Äq.) wurde die Reaktion 4 h bei 0 °C gerührt. Durch Zugabe von gesättigter NH_4Cl -Lösung (100 mL) wurde die Reaktion beendet. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc / 29:1) ergab ein untrennbares Diastereomeregemisch von Produkt **140a/140b** (1.80 mg, 7.88 mmol, 83%).

R_f (PE:EtOAc / 9:1): 0.16; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 4.20-4.06 (m, 2H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 3.43-3.35 (m, 1H, C(O)CHCHO), 2.84-2.75 (m, 1H, $\text{OCHCH}_2\text{CH}_3$), 2.52-2.42 (m, 1H, COCHCH_3),

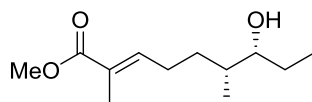
1.83-1.59 (m, 2H, 1x CH_2CH_3 , 1x $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2$), 1.39-1.13 (m, 9H, 1x $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2$, 1x $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2$, CH_2CHCH_3 , 1x CH_2CH_3 , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$, COCHCH_3), 1.08 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, COCHCH_3), 0.92 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 0.87 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, CH_2CH_3), 0.79 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH_2CHCH_3), 0.79 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, CH_2CHCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 175.7 (q, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}$), 175.1 (q, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCO}$), 85.0 (t, $\text{OCHCH}_2\text{CH}_3$), 84.9 (t, $\text{OCHCH}_2\text{CH}_3$), 79.6 (t, C(O)CHCHO), 78.5 (t, C(O)CHCHO), 60.2 (s, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 45.9 (t, COCHCH_3), 45.8 (t, COCHCH_3), 35.1 (t, CH_2CHCH_3), 35.1 (t, CH_2CHCH_3), 32.9 (s, CH_2CHCH_3), 32.8 (s, CH_2CHCH_3), 30.0 (s, $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2$), 29.0 (s, $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2$), 26.1 (s, CH_2CH_3), 26.0 (s, CH_2CH_3), 17.7 (p, CH_2CHCH_3), 17.7 (p, CH_2CHCH_3), 14.3 (p, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$), 13.4 (p, COCHCH_3), 13.3 (p, COCHCH_3), 10.0 (p, CH_2CH_3), 9.9 (p, CH_2CH_3).

Methyl-(6*R*,7*R*,*E*)-7-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnon-2-enoat (**200**)



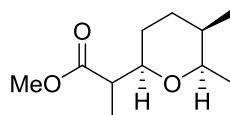
Der allgemeinen Vorschrift für WITTIG-Reaktionen folgend, wurde aus Aldehyd **116** (80 mg, 0.31 mmol, 1.0 Äq.) und Phosphoran **125** (129 mg, 0.37 mmol, 1.2 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) Methylester **200** (68 mg, 0.21 mmol, 67%) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 39:1): 0.52; $[\alpha]_D^{22} = -2.3$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 6.76 (dt, $J = 1.4, 7.4$ Hz, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.44 (quin., $J = 4.1$ Hz, 1H, CHOTBS), 2.28-2.07 (m, 2H, $\text{C}=\text{CHCH}_2$), 1.83 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), 1.68-1.49 (m, 2H, 1x CH_2CHCH_3 , CHCH_3), 1.49-1.32 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.27-1.16 (m, 1H, 1x CH_2CHCH_3), 0.90-0.81 (m, 15H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$, CH_2CH_3 , CHCH_3), 0.04 (s, 3H, OSiCH_3), 0.02 (s, 3H, OSiCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 168.8 (q, CH_3OCO), 143.0 (t, $\text{C}=\text{CH}$), 127.4 (q, $\text{C}=\text{CH}$), 77.1 (t, CHOTBS), 51.7 (p, OCH_3), 37.2 (t, CHCH_3), 31.2 (s, CH_2CHCH_3), 26.9 (s, $\text{C}=\text{CHCH}_2$), 26.0 (p, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$ und s, CH_2CH_3), 18.2 (q, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 14.4 (p, CHCH_3), 12.4 (p, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), 10.5 (p, CH_2CH_3), -4.3 (p, OSiCH_3), -4.4 (p, OSiCH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_3\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 351.2331, gefunden 351.2325.

Methyl-(6*R*,7*R*,*E*)-7-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnon-2-enoat (124**)**

Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus Methylester **200** (68 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (98 mg, 3.15 mmol, 15.0 Äq.) nach 24 h bei 50 °C und anschließender säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 9:1) der entschützte Methylester **124** (36 mg, 0.17 mmol, 47%) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 9:1): 0.2; $[\alpha]_D^{21} = +12.0$ ($c = 0.7$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ [ppm] = 6.81-6.74 (m, 1H, C=CH), 3.73 (s, 3H, OCH_3), 3.43 (quin., $J = 4.1$ Hz, 1H, CHOH), 2.30-2.12 (m, 2H, C=CH CH_2), 1.84 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), 1.84-1.27 (m, 5H, CH_2CHCH_3 , CHCH_3 , CH_2CH_3), 0.95 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.89 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CHCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 168.7 (q, CH_3OCO), 142.5 (t, C=CH), 127.6 (q, C=CH), 76.4 (t, CHOH), 51.7 (p, OCH_3), 37.5 (t, CHCH_3), 32.2 (s, CH_2CHCH_3), 27.3 (s, C=CH CH_2), 26.5 (s, CH_2CH_3), 13.3 (p, CHCH_3), 12.4 (p, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), 10.6 (p, CH_2CH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 237.1467, gefunden 237.1464.

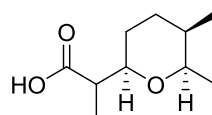
Methyl-2-((2*R*,5*R*,6*R*)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)propanoat (201a/b**)**

Der α,β -ungesättigte Methylester **124** (50 mg, 0.23 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem CH_2Cl_2 (2 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von *t*-BuOK (26 mg, 0.23 mmol, 1.0 Äq.) wurde die Reaktion 4 h bei 0 °C gerührt. Durch Zugabe von gesättigter NH_4Cl -Lösung (2 mL) wurde die Reaktion beendet. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc / 19:1) ergab ein untrennbares Diastereomeregemisch von Produkt **201a/201b** (23 mg, 0.11 mmol, 46%).

R_f (PE:EtOAc / 9:1): 0.48; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 3.67 (s, 1H, OCH_3), 3.66 (s, 2H, OCH_3), 3.48-3.38 (m, 1H, C(O)CHCHO), 3.28-3.21 (m, 1H, $\text{OCHCH}_2\text{CH}_3$), 2.57-2.45 (m, 1H, COCH CH_3), 1.77-1.58 (m, 3H, CH_2CHCH_3 , CH_2CHCH_3), 1.54-1.33 (m, 2H, 1x $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2$, 1x CH_2CH_3), 1.33-1.24 (m, 2H, 1x $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2$, 1x CH_2CH_3), 1.23 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, COCH CH_3),

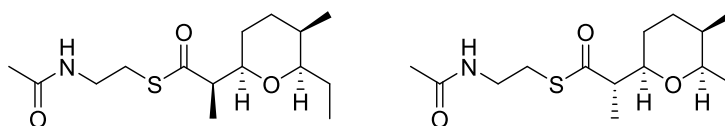
1.09 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, COCHCH₃), 0.93-0.78 (m, 6H, CH₂CH₃, CH₂CHCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 176.1 (q, CH₃OCO), 175.5 (q, CH₃CO), 82.1 (t, OCHCH₂CH₃), 82.0 (t, OCHCH₂CH₃), 80.3 (t, C(O)CHCHO), 79.4 (t, C(O)CHCHO), 51.5 (p, OCH₃), 51.5 (p, OCH₃), 45.8 (t, COCHCH₃), 45.7 (t, COCHCH₃), 31.1 (s, CH₂CHCH₃), 30.4 (t, CH₂CHCH₃), 30.3 (t, CH₂CHCH₃), 26.3 (s, CHOCH₂CH₂), 26.2 (s, CHOCH₂CH₂), 24.2 (s, CH₂CH₃), 23.2 (s, CH₂CH₃), 13.3 (p, COCHCH₃), 13.1 (p, COCHCH₃), 11.7 (p, CH₂CHCH₃), 11.6 (p, CH₂CHCH₃), 10.5 (p, CH₂CH₃), 10.4 (p, CH₂CH₃); HRMS (ESI): m/z für C₁₂H₂₂O₃ [M+Na]⁺: berechnet 237.1467, gefunden 237.1471.

2-((2*R*,5*R*,6*R*)-6-Ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)propansäure (202a/b)



Der allgemeinen Vorschrift zur Verseifung von Methylestern folgend, wurde aus Methylester **201a/b** (23 mg, 0.11 mmol, 1.0 Äq.) und LiOH·H₂O (23 mg, 0.54 mmol, 5.0 Äq.) ein Gemisch der freien Säuren **202a** und **202b** erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

S-(2-Acetamidoethyl)-(R)-2-((2*R*,5*R*,6*R*)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)propanthioat (**100**) und S-(2-Acetamidoethyl)-(S)-2-((2*R*,5*R*,6*R*)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)propanthioat (**98**)



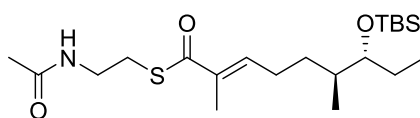
Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von *N*-Acetylcysteaminestern folgend, wurden aus der freien Säure **202a/b** (21 mg, 0.11 mmol, 1.0 Äq.), *N*-Acetylcysteamin (14 mg, 0.12 mmol, 1.1 Äq.), EDC·HCl (22 mg, 0.17 mmol, 1.1 Äq.) und 4-DMAP (3 mg, 0.02 mmol, 0.22 Äq.) nach Reinigung per HPLC (H₂O:CH₃CN = 95:5 {10 min}, Gradient H₂O:CH₃CN 95:5 → 0:100 {70 min}, H₂O:CH₃CN = 0:100 {10 min}, 15 mL/min) Produkt **100** (9 mg, 0.03 mmol, 28%) und Produkt **98** (6 mg, 0.02 mmol, 19%) als farblose Feststoffe erhalten.

Diastereomer 1: t_R : 57.5 min; $[\alpha]_D^{21} = +28.4$ ($c = 0.9$, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 5.85 (bs, 1H, NH), 3.48-3.39 (m, 3H, NHCH₂, C(O)CHCHO), 3.26 (ddd, $J = 2.2, 5.3, 8.3$ Hz, 1H, OCHCH₂CH₃), 3.07-2.95 (m, 2H, CH₂S), 2.73 (quin., $J = 7.0$ Hz, 1H, COCHCH₃), 1.95

(s, 3H, CH_3CO), 1.75-1.59 (m, 3H, CH_2CHCH_3 , 1x CH_2CH_3), 1.55-1.41 (m, 2H, 1x $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2$, 1x CH_2CH_3), 1.35-1.28 (m, 2H, 1x $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2$, CH_2CHCH_3), 1.26 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, COCHCH_3), 0.92-0.86 (m, 6H, CH_2CHCH_3 , CH_2CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 202.8 (SCO, C-1), 170.2 (q, CH_3CO), 82.2 (t, $\text{OCHCH}_2\text{CH}_3$), 79.2 (t, C(O)CHCHO), 54.6 (t, COCHCH_3), 39.9 (s, NHCH_2), 31.0 (s, CH_2CHCH_3), 30.2 (s, CH_2CHCH_3), 28.4 (s, CH_2S), 26.3 (s, $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2$), 24.2 (s, CH_2CH_3), 23.3 (p, CH_3CO), 14.1 (p, COCHCH_3), 11.6 (p, CH_2CHCH_3), 10.5 (p, CH_2CH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 324.1609, gefunden 324.1594.

Diastereomer 2: t_R : 59.5 min; $[\alpha]_D^{21} = -4.8$ ($c = 0.6$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 5.85 (bs, 1H, NH), 3.56-3.49 (m, 1H, C(O)CHCHO), 3.44 (q, $J = 6.1$ Hz, 2H, NHCH_2), 3.25-3.20 (m, 1H, $\text{OCHCH}_2\text{CH}_3$), 3.08-2.95 (m, 2H, CH_2S), 2.79-2.70 (m, 1H, COCHCH_3), 1.95 (s, 3H, CH_3CO), 1.77-1.60 (m, 3H, CH_2CHCH_3 , CH_2CHCH_3), 1.50-1.21 (m, 4H, $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2$, CH_2CH_3), 1.11 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H, COCHCH_3), 0.89 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_2CHCH_3), 0.83 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H, CH_2CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 203.5 (q, SCO), 170.5 (q, CH_3CO), 81.9 (t, $\text{OCHCH}_2\text{CH}_3$), 79.9 (t, C(O)CHCHO), 54.3 (q, COCHCH_3), 39.9 (s, NHCH), 31.1 (s, CH_2CHCH_3), 30.2 (t, CH_2CHCH_3), 28.5 (s, CH_2S), 26.2 (s, $\text{CHOCH}_2\text{CH}_2$), 23.3 (p, CH_3CO), 23.3 (s, CH_2CH_3), 13.8 (p, COCHCH_3), 11.6 (p, CH_2CHCH_3), 10.4 (p, CH_2CH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 324.1609, gefunden 324.1594.

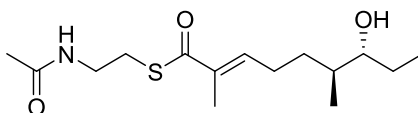
S-(2-Acetamidoethyl)-(6S,7R,E)-7-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnon-2-enthioat (203)



SNAC-Phosphonat **123** (1.0 g, 2.89 mmol, 1.2 Äq.) wurde in trockenem THF (15 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von DBU (1.0 mL, 7.46 mmol, 3.0 Äq.) wurde 30 min bei 0 °C gerührt und anschließend Aldehyd **117** (0.618 g, 2.41 mmol, 1.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 48 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter NH_4Cl -Lösung beendet. THF wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc / 1:1) ergab SNAC-Thioester **203** (636 mg, 1.53 mmol, 40%) als farbloses Öl.

R_f (PE: EtOAc / 1:1): 0.14; $[\alpha]_D^{21} = -7.6$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 6.75 (dt, $J = 1.3, 7.3$ Hz, 1H, C=CH), 5.97 (bs, 1H, NH), 3.47-3.39 (m, 3H, NHCH_2 , CHOTBS), 3.05 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH_2S), 2.33-2.21 (m, 1H, 1x C=CH CH_2), 2.20-2.08 (m, 1H, 1x C=CH CH_2), 1.95 (s, 3H, CH_3CO), 1.86 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), 1.63-1.48 (m, 2H, 1x CH_2CHCH_3 , CH CH_3), 1.44-1.35 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.30-1.18 (m, 1H, 1x CH_2CHCH_3), 0.91-0.81 (m, 15H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$, CH_2CH_3 , CH CH_3), 0.03 (s, 3H, OSiCH_3), 0.01 (s, 3H, OSiCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 194.0 (q, SCO), 170.3 (q, CH_3CO), 142.4 (t, C=CH), 135.8 (q, C=CH), 77.3 (t, CHOTBS), 39.9 (s, NHCH_2), 37.4 (t, CH CH_3), 30.9 (s, CH_2CHCH_3), 28.4 (s, CH_2S), 26.9 (s, 1x C=CH CH_2), 25.9 (p, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 25.4 (s, CH_2CH_3), 23.3 (p, CH_3CO), 18.2 (q, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 14.9 (p, CH CH_3), 12.5 (p, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), 10.1 (p, CH_2CH_3), -4.3 (p, OSiCH_3), -4.5 (p, OSiCH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{NO}_3\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 438.2474, gefunden 438.2473.

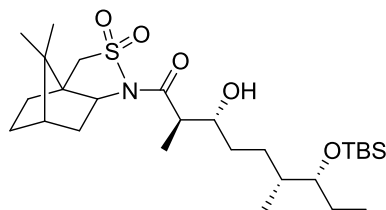
S-(2-Acetamidoethyl)-(6S,7R,E)-7-hydroxy-2,6-dimethyl-2-enthioat (101)



Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus SNAC-Thioester **203** (30 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (272 mg, 1.08 mmol, 15.0 Äq.) nach 48 h bei 50 °C und anschließender Reinigung per HPLC ($\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} = 95:5$ {10 min}, Gradient $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} 95:5 \rightarrow 0:100$ {70 min}, $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} = 0:100$ {10 min}, 15 mL/min) Produkt **101** (14 mg, 0.05 mmol, 81%) als farbloses Öl erhalten.

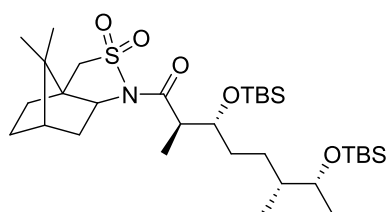
t_R : 47 min; $[\alpha]_D^{24} = +1.0$ ($c = 0.2$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 6.76 (dt, $J = 1.0, 7.3$ Hz, 1H, C=CH), 5.93 (bs, 1H, NH), 3.44 (q, $J = 6.1$ Hz, 2H, NHCH_2), 3.36 (ddd, $J = 3.5, 5.4, 8.8$ Hz, 1H, CHOH), 3.05 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH_2S), 2.36-2.25 (m, 1H, 1x C=CH CH_2), 2.23-2.11 (m, 1H, 1x C=CH CH_2), 1.96 (s, 3H, CH_3CO), 1.87 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), 1.72-1.63 (m, 1H, 1x CH_2CHCH_3), 1.61-1.49 (m, 2H, 1x CH_2CH_3 , CH CH_3), 1.45-1.35 (m, 1H, 1x CH_2CH_3), 1.35-1.24 (m, 1H, 1x CH_2CHCH_3), 0.96 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.93 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 194.0 (q, SCO), 170.3, (q, CH_3CO), 142.2 (t, C=CH), 135.8 (q, C=CH), 77.3 (t, CHOH), 39.9 (s, NHCH_2), 38.2 (t, CH CH_3), 30.6 (s, CH_2CHCH_3), 28.5 (s, CH_2S), 26.5 (s, C=CH CH_2), 26.5 (s, CH_2CH_3), 23.3 (p, CH_3CO), 15.4 (p, CH CH_3), 12.5 (p, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), 10.3 (p, CH_2CH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 324.1609, gefunden 324.1601.

***N*-[(2*R*,3*R*,6*R*,7*R*)-7-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylnonaoyl]boran-10,2-sultam (204)**



Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von MUKAIYAMA-Aldol-Produkten folgend, wurde aus dem propionierten OPPOLZER-Auxiliar **110a** (0.300 g, 1.10 mmol, 1.0 Äq.), NEt_3 (0.23 mL, 1.66 mmol, 1.5 Äq.), TMSOTf (0.36 mL, 1.99 mmol, 1.8 Äq.), TiCl_4 (1.0 M in CH_2Cl_2 , 2.0 mL, 1.99 mmol, 1.8 Äq.) und Aldehyd **116** (0.430 mg, 1.66 mmol, 1.5 Äq.) das Aldol-Produkt **204** erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

***N*-[(2*R*,3*R*,6*R*,7*R*)-3,7-Bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylnonaoyl]borane-10,2-sultam (121)**

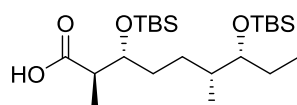


Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Schätzung folgend, wurde aus Aldol-Produkt **204** (0.585 g, 1.10 mmol, 1.0 Äq.), 2,6-Lutidin (0.19 mL, 1.68 mmol, 1.5 Äq.) und TBSOTf (0.38 mL, 1.66 mmol, 1.5 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) das TBS-geschützte Aldol-Produkt **121** (0.446 g, 0.69 mmol, 63% über zwei Stufen, *d.r.* > 10:1) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 39:1) = 0.23; $[\alpha]_D^{21} = +12.7$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 4.14-4.07 (m, 1H, C(O)CHCHOTBS), 3.89 (dd, $J = 5.4, 6.9$ Hz, 1H, CCHN), 3.52-3.37 (m, 3H, CH_2SO_2 , $\text{CH(OTBS)CH}_2\text{CH}_3$), 3.35-3.26 (m, 1H, C(O)CHCH_3), 2.10-2.02 (m, 1H, CHCH_2CH), 2.01-1.82 (m, 4H, CHCH_2CH , CH_2CHCH_2 , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCH}_2$), 1.54-1.42 (m, 2H, $\text{CH(OTBS)CH}_2\text{CH}_2$), 1.42-1.24 (m, 5H, CH_2CHCH_3 , $\text{CHCH(OTBS)CH}_2\text{CH}_3$, CH_2CH_3), 1.14 (s, 3H, CCH_3), 1.12 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CHC(O)}$), 0.96 (s, 3H, CCH_3), 0.90-0.85 (m, 18H, $\text{OSiC(CH}_3)_3$), 0.82 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH_3CHCH_2), 0.78 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.09 (s, 3H, $\text{OSi(CH}_3)_2\text{C(CH}_3)_3$), 0.07 (s, 3H, OSiCH_3), 0.02 (s, 3H, OSiCH_3), 0.01 (s, 3H, OSiCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 174.1 (q, NCO), 77.7 (t, $\text{CH(OTBS)CH}_2\text{CH}_3$), 73.4 (t, C(O)CHCHOTBS), 65.4 (t,

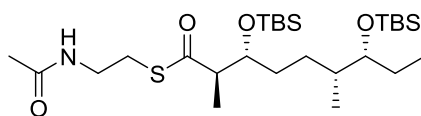
CCHN), 53.2 (s, CH₂SO₂), 48.2 (q, CCH₂SO₂), 47.8 (q, C(CH₃)₂), 46.6 (t, C(O)CHCH₃), 44.7 (t, CH₂CHCH₂), 38.6 (s, CHCH₂CH), 38.3 (s, CHCH(OTBS)CH₂CH₃), 32.9 (s, C-5'), 30.7 (s, CH(OTBS)CH₂CH₂), 27.8 (s, CH₂CHCH₃), 26.5 (s, CH₂CH₂CHCH₂), 26.0 (p, OSiC(CH₃)₃), 26.0 (p, OSiC(CH₃)₃), 25.2 (s, CH₂CH₃), 20.8 (p, CCH₃), 19.9 (p, CCH₃), 18.2 (q, OSiC(CH₃)₃), 18.1 (q, OSi(CH₃)₂C(CH₃)₃), 15.2 (p, CH₃CHCH₂), 10.7 (p, CH₂CH₃), 10.3 (p, CH₃CHC(O)), -4.3 (p, OSiCH₃), -4.3 (p, OSiCH₃), -4.4 (p, OSiCH₃), -4.9 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₃₃H₆₅NO₅SSi₂ [M+Na]⁺: berechnet 666.4019, gefunden 666.4020.

(2R,3R,6R,7R)-3,7-Bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnonansäure (205)



Das TBS-geschützte Aldol-Produkt **121** (0.100 g, 0.16 mmol, 1.0 Äq.) wurde in THF:H₂O (1.5 mL, 3:1) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von H₂O₂ (35%ig, 0.07 mL, 0.78 mmol, 5.0 Äq.) und LiOH·H₂O (8 mg, 0.19 mmol, 1.25 Äq.) wurde die Reaktion auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Durch Zugabe von NaHSO₃ (1.5 M, 3 mL) wurde die Reaktion beendet. THF wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und die erhaltene Säure direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

S-(2-Acetamidoethyl)-(2R,3R,6R,7R)-3,7-Bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnonanthioat (206)

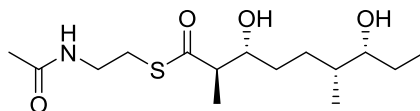


Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von *N*-Acetylcysteaminestern folgend, wurde aus der freien Säure **205** (69 mg, 0.15 mmol, 1.0 Äq.), *N*-Acetylcysteamin (20 mg, 0.17 mmol, 1.1 Äq.), EDC·HCl (32 mg, 0.17 mmol, 1.1 Äq.) und 4-DMAP (4 mg, 0.03 mmol, 0.22 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 1:1) SNAC-Thioester **206** (35 mg, 0.06 mmol, 42% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 1:1) = 0.44; $[\alpha]_D^{22} = -35.4$ (c = 1.4, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 5.92 (bs, 1H, NH), 4.04-3.90 (m, 1H, C(O)CHCHOTBS), 3.46-3.33 (m, 3H, NHCH₂, CH(OTBS)CH₂CH₃), 3.09-3.01 (m, 1H, 1x CH₂S), 2.97-2.88 (m, 1H, 1x CH₂S), 2.82 (quin., J =

7.0 Hz, 1H, C(O)CHCH₃), 1.95 (s, 3H, CH₃CO), 1.56-1.23 (m, 7H, CH(OTBS)CH₂CH₂, CH₂CHCH₃, CHCH(OTBS)CH₂CH₃, CH₂CH₃), 1.09 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, C(O)CHCH₃), 0.89-0.80 (m, 21H, 2x OSiC(CH₃)₃, CH₂CH₃), 0.79 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₂CHCH₃), 0.04 (s, 3H, OSiCH₃), 0.02 (s, 3H, OSiCH₃), 0.01 (s, 3H, OSiCH₃), 0.00 (s, 3H, OSiCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 202.8 (q, SCO), 170.2 (q, CH₃CO), 77.7 (t, CH(OTBS)CH₂CH₃), 73.7 (t, C(O)CHCHOTBS), 54.2 (t, C(O)CHCH₃), 39.7 (s, NHCH₂), 37.6 (t, CHCH(OTBS)CH₂CH₃), 31.4 (s, CH(OTBS)CH₂CH₂), 28.4 (s, CH₂S), 27.1 (s, CH₂CHCH₃), 26.3 (s, CH₂CH₃), 26.0 (p, OSiC(CH₃)₃), 25.8 (p, OSiC(CH₃)₃), 23.2 (p, CH₃CO), 18.2 (q, OSiC(CH₃)₃), 18.0 (q, OSiC(CH₃)₃), 14.3 (p, CH₂CHCH₃), 12.7 (p, C(O)CHCH₃), 10.2 (p, CH₂CH₃), -4.2 (p, OSiCH₃), -4.3 (p, OSiCH₃), -4.4 (p, OSiCH₃), -4.9 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): *m/z* für C₂₇H₅₇NO₄SSi₂ [M+Na]⁺: berechnet 570.3445, gefunden 570.3443.

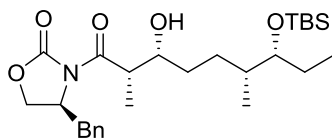
S-(2-Acetamidoethyl)-(2*R*,3*R*,6*R*,7*R*)-3,7-dihydroxy-2,6-dimethylnonanthioat (**106**)



Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus SNAC-Thioester **206** (20 mg, 0.04 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (137 mg, 0.55 mmol, 15.0 Äq.) nach 96 h bei 50 °C und anschließender Reinigung per HPLC (H₂O:CH₃CN = 95:5 {10 min}, Gradient H₂O:CH₃CN 95:5 → 0:100 {70 min}, H₂O:CH₃CN = 0:100 {10 min}, 15 mL/min) Produkt **106** (8 mg, 0.03 mmol, 70%) als farbloses Öl erhalten.

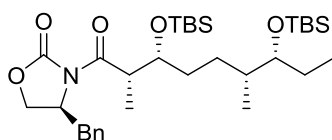
t_R: 41 min; [α]_D²⁰ = -2.0 (c = 0.8, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 6.16 (bs, 1H, NH), 3.75-3.68 (m, 1H, C(O)CHCHOH), 3.49-3.41 (m, NHCH₂, CH(OH)CH₂CH₃), 3.14-3.06 (m, 1H, 1x CH₂S), 3.03-2.94 (m, 1H, 1x CH₂S), 2.79 (quin., *J* = 6.8 Hz, 1H, C(O)CHCH₃), 2.19 (bs, 2H, OH), 1.98 (s, 3H, CH₃CO), 1.60-1.31 (m, 7H, CH(OH)CH₂CH₂, CH₂CHCH₃, CHCH(OH)CH₂CH₃, CH₂CH₃), 1.23 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, C(O)CHCH₃), 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.87 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₂CHCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 204.1 (q, SCO), 170.8 (t, CH₃CO), 76.4 (t, CH(OH)CH₂CH₃), 74.0 (t, C(O)CHCHOH), 53.8 (t, C(O)CHCH₃), 39.5 (s, NHCH₂), 37.6 (t, CHCH(OH)CH₂CH₃), 32.6 (s, CH₂CHCH₃), 28.8 (s, CH₂S), 28.8 (s, CH(OH)CH₂CH₂), 27.1 (s, CH₂CH₃), 23.2 (p, CH₃CO), 15.1 (p, CH₂CHCH₃), 13.7 (p, C(O)CHCH₃), 10.7 (p, CH₂CH₃); **HRMS** (ESI): *m/z* für C₁₅H₂₉NO₄S [M+H]⁺: berechnet 320.1896, gefunden 320.1889.

(S)-4-Benzyl-3-((2S,3R,6R,7R)-7-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-3-hydroxy-2,6-dimethylnonanoyl)oxazolidin-2-on (207)



Propioniertes (4S)-EVANS-Auxiliar (**111a**) (104 mg, 0.45 mmol, 1.5 Äq.) wurde in trockenem CH₂Cl₂ gelöst (3 mL), auf 0 °C abgekühlt und *n*Bu₂BOTf (1.0 M in CH₂Cl₂, 0.45 mL, 0.45 mmol, 1.6 Äq.) tropfenweise über 15 min hinzugegeben. Nach Zugabe von DIPEA (0.1 mL, 0.57 mmol, 1.9 Äq.) wurde weitere 15 min bei 0 °C gerührt und anschließend die Reaktionslösung auf -78 °C abgekühlt. Aldehyd **116** (77 mg, 0.30 mmol, 1.0 Äq.) wurde hinzugegeben, die Reaktion für 3 h bei -78 °C gerührt und dann auf 0 °C erwärmt. Durch Zugabe von Phosphatpuffer (pH 7.4, 2 mL), MeOH (1 mL) und MeOH/35%-H₂O₂ (3 mL, 2.4:1) wurde die Reaktion beendet. Nach 1 h bei 0 °C wurden die Phasen getrennt, die wässrige Phase mit CH₂Cl₂ extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Aldol-Produkt wurde direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

(S)-4-Benzyl-3-((2S,3R,6R,7R)-3,7-bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnonaoyl)oxazolidin-2-on (122)

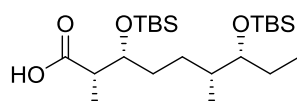


Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Schätzung folgend, wurde aus Aldol-Produkt **207** (220 mg, 0.30 mmol, 1.0 Äq.), 2,6-Lutidin (52 µL, 0.45 mmol, 1.5 Äq.) und TBSOTf (0.1 mL, 0.45 mmol, 1.5 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 9:1) das TBS-geschützte Aldol-Produkt **122** (110 mg, 0.18 mmol, 61% über zwei Stufen, *d.r.* > 10:1) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f (PE: EtOAc / 9:1): 0.63; $[\alpha]_D^{24} = +28.7$ ($c = 1.0$, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7.39-7.21 (m, 5H, Bn), 4.61 (ddt, $J = 2.8, 7.0, 9.8$ Hz, 1H, CHBn), 4.19-4.10 (m, 2H, OCH₂CHBn), 3.98 (q, $J = 5.6$ Hz, 1H, C(O)CHCHOTBS), 3.91-3.83 (m, 1H, C(O)CHCH₃), 3.42 (td, $J = 3.8, 5.9$ Hz, 1H, CH(OTBS)CH₂CH₃), 3.30 (dd, $J = 3.0, 13.2$ Hz, 1H, 1x BnCH₂), 2.76 (dd, $J =$

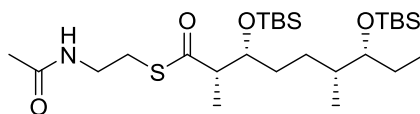
9.7, 13.3 Hz, 1H, 1x BnCH₂), 1.63-1.35 (m, 6H, CH₂CH₂CH, 1x CH₂CH₂CH, CH₂CH₃, CH₂CHCH₃), 1.21 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, C(O)CHCH₃), 1.16-1.02 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 0.89 (s, 9H, OSiC(CH₃)₃), 0.84 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.81 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₂CHCH₃), 0.05-0.02 (m, 9H, 3x OSiCH₃), -0.01 (s, 3H, OSiCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 175.4 (q, OCON), 153.1 (q, NCOCH), 135.5 (q, Bn), 129.6 (t, Bn), 129.0 (t, Bn), 127.4 (t, Bn), 77.5 (t, CH(OTBS)CH₂CH₃), 73.4 (t, C(O)CHCHOTBS), 66.0 (s, OCH₂CHBn), 55.9 (t, CHBn), 42.8 (t, C(O)CHCH₃), 37.9 (t, CH₂CHCH₃), 37.8 (s, BnCH₂), 33.8 (s, CH₂CH₂CH), 27.7 (s, CH₂CH₂CH), 26.0 (p, OSiC(CH₃)₃) und s, CH₂CH₃), 25.9 (p, OSiC(CH₃)₃), 18.2 (q, OSiC(CH₃)₃), 18.1 (q, OSiC(CH₃)₃), 14.8 (p, CH₂CHCH₃), 11.6 (p, C(O)CHCH₃), 10.3 (p, CH₂CH₃), -4.0 (p, OSiCH₃), -4.2 (p, OSiCH₃), -4.4 (p, OSiCH₃), -4.8 (p, OSiCH₃); HRMS (ESI): *m/z* für C₃₃H₅₉NO₅Si₂ [M+Na]⁺: berechnet 628.3830, gefunden 628.3827.

(2*S*,3*R*,6*R*,7*R*)-3,7-Bis((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnonansäure (208)



Das TBS-geschützte Aldol-Produkt **122** (50 mg, 0.08 mmol, 1.0 Äq.) wurde in THF:H₂O (1 mL, 3:1) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von H₂O₂ (35%ig, 80 µL, 0.92 mmol, 11.1 Äq.) und LiOH·H₂O (8 mg, 0.20 mmol, 2.4 Äq.) wurde die Reaktion auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Durch Zugabe von NaHSO₃ (1.5 M, 3 mL) wurde die Reaktion beendet. THF wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und die erhaltene Säure direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

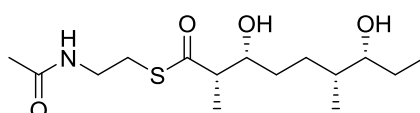
S-(2-Acetamidoethyl)-(2S,3R,6R,7R)-3,7-bis((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnonanthioat (209)



Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von *N*-Acetylcysteaminestern folgend, wurde aus der freien Säure **208** (60 mg, 0.13 mmol, 1.0 Äq.), *N*-Acetylcysteamin (17 mg, 0.15 mmol, 1.1 Äq.), EDC·HCl (28 mg, 0.15 mmol, 1.1 Äq.) und 4-DMAP (4 mg, 0.03 mmol, 0.22 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 1:1) SNAC-Thioester **209** (32 mg, 0.06 mmol, 38% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE: EtOAc / 1:1): 0.48; $[\alpha]_D^{23} = +30.7$ ($c = 1.1$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 5.82 (bs, 1H, NH), 3.95 (q, $J = 5.2$ Hz, 1H, C(O)CHCHOTBS), 3.50-3.35 (m, 3H, NHCH_2 , $\text{CH}(\text{OTBS})\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.00 (m, 2H, CH_2S), 2.77 (qd, $J = 5.2, 6.9$ Hz, 1H, C(O)CHCH₃), 1.96 (s, 3H, CH_3CO), 1.56-1.33 (m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, 1x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, $\text{CHCH}(\text{OTBS})\text{CH}_2\text{CH}_3$, CH_2CH_3), 1.16 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, C(O)CHCH₃), 1.14-1.06 (m, 1H, 1x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 0.91-0.82 (m, 21H, 2x $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$, CH_2CH_3), 0.80 (d, $J = 6.7$ Hz, CH_2CHCH_3), 0.06-0.00 (m, 12H, 4x OSiCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 202.9 (q, SCO), 170.2 (q, CH_3CO), 77.5 (t, $\text{CH}(\text{OTBS})\text{CH}_2\text{CH}_3$), 74.1 (t, C(O)CHCHOTBS), 53.4 (t, C(O)CHCH₃), 39.8 (s, NHCH_2), 37.8 (t, $\text{CHCH}(\text{OTBS})\text{CH}_2\text{CH}_3$), 33.3 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 28.4 (s, CH_2S), 27.8 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 26.0 (p, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$ und s, CH_2CH_3), 25.9 (p, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 23.3 (p, CH_3CO), 18.2 (q, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 18.1 (q, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 14.6 (p, CH_2CHCH_3), 12.3 (p, C(O)CHCH₃), 10.4 (p, CH_2CH_3), -4.2 (p, OSiCH_3), -4.2 (p, OSiCH_3), -4.3 (p, OSiCH_3), -4.5 (p, OSiCH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $\text{C}_{27}\text{H}_{57}\text{NO}_4\text{SSi}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 570.3445, gefunden 570.3445.

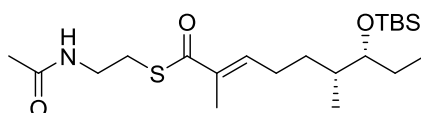
S-(2-Acetamidoethyl)-(2S,3R,6R,7R)-3,7-dihydroxy-2,6-dimethylnonanthioat (104)



Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus SNAC-Thioester **209** (20 mg, 0.04 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (137 mg, 0.55 mmol, 15.0 Äq.) nach 96 h bei 50 °C und anschließender Reinigung per HPLC ($\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} = 95:5$ {10 min}, Gradient $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} 95:5 \rightarrow 0:100$ {70 min}, $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} = 0:100$ {10 min}, 15 mL/min) Produkt **104** (8 mg, 0.03 mmol, 70%) als farbloses Öl erhalten.

t_R : 38.5 min; $[\alpha]_D^{21} = +21.8$ ($c = 1.5$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 6.03 (bs, 1H, NH), 3.94-3.87 (m, 1H, C(O)CHCHOH), 3.52-3.38 (m, 3H, NHCH_2 , $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.10-2.95 (m, 2H, CH_2S), 2.77-2.69 (m, 1H, C(O)CHCH₃), 2.19 (bs, 2H, OH), 1.98 (s, 3H, CH_3CO), 1.62-1.32 (m, 7H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, $\text{CHCH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_3$, CH_2CH_3), 1.22 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H, C(O)CHCH₃), 0.95 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.87 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_2CHCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 204.1 (q, SCO), 170.7 (q, CH_3CO), 76.5 (t, $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_3$), 72.4 (t, C(O)CHCHOH), 53.6 (t, C(O)CHCH₃), 39.4 (s, NHCH_2), 37.6 (t, $\text{CHCH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}_3$), 32.0 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 29.5 (s, CH_2S), 28.7 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 27.1 (s, CH_2CH_3), 23.2 (p, CH_3CO), 13.8 (p, CH_2CHCH_3), 11.4 (p, C(O)CHCH₃), 10.7 (p, CH_2CH_3); HRMS (ESI): m/z für $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{NO}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: berechnet 320.1896, gefunden 320.1901.

S-(2-Acetamidoethyl)-(6R,7R,E)-7-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnon-2-enthiat (210**)**

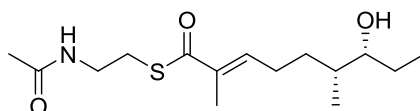


SNAC-Phosphonat **123** (0.297 g, 0.87 mmol, 1.2 Äq.) wurde in trockenem THF (5 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von DBU (0.24 mL, 1.56 mmol, 3.0 Äq.) wurde 30 min bei 0 °C gerührt und anschließend Aldehyd **116** (0.187 g, 0.73 mmol, 1.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 48 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter NH_4Cl -Lösung (5 mL) beendet. THF wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen, die Phasen getrennt und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc / 1:1) ergab SNAC-Thioester **210** (120 mg, 0.29 mmol, 40%) als farbloses Öl.

R_f (PE: EtOAc / 1:1): 0.18; $[\alpha]_D^{24} = +16.9$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 6.73 (dt, $J = 1.2, 7.3$ Hz, 1H, C=CH), 6.14 (bs, 1H, NH), 3.41 (m, 3H, NHCH_2 , CHOH), 3.03 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH_2S), 2.28-2.09 (m, 2H, C=CHCH₂), 1.93 (s, 3H, CH_3CO), 1.84 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{C}=\text{CH}$), 1.65-1.48 (m, 2H, CH_2CHCH_3), 1.45-1.28 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.26-1.15 (m, 1H, CHCH₃), 0.85-0.82 (m, 15H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$, CHCH₃, CH_2CH_3), 0.01 (s, 3H, OSiCH_3), 0.00 (s, 3H, OSiCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ [ppm] = 193.9 (q, SCO), 170.4 (q, CH_3CO), 142.3 (t, C=CH), 135.7 (q, C=CH), 77.0 (t, CHOH), 39.8 (s, NHCH_2), 37.3 (s, CH_2CHCH_3), 30.9 (t, CHCH₃), 28.3 (s, CH_2S),

26.9 (s, C=CHCH₂), 25.9 (p, OSiC(CH₃)₃), 25.8 (s, CH₂CH₃), 23.2 (p, CH₃CO), 18.1 (q, OSiC(CH₃)₃), 14.4 (p, CHCH₃), 12.4 (p, CH₃C=CH), 10.4 (p, CH₂CH₃), -4.3 (p, OSiCH₃), -4.4 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₂₁H₄₁NO₃SSi [M+Na]⁺: berechnet 438.2474, gefunden 438.2471.

S-(2-Acetamidoethyl)-(6R,7R,E)-7-hydroxy-2,6-dimethylnon-2-enthioat (102)

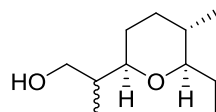


Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus SNAC-Thioester **210** (38 mg, 0.09 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (432 mg, 1.37 mmol, 15.0 Äq.) nach 48 h bei 50 °C und anschließender Reinigung per HPLC (H₂O:CH₃CN = 95:5 {10 min}, Gradient H₂O:CH₃CN 95:5 → 0:100 {70 min}, H₂O:CH₃CN = 0:100 {10 min}, 15 mL/min) Produkt **102** (15 mg, 0.05 mmol, 55%) als farbloses Öl erhalten.

t_R: 47.5 min; $[\alpha]_D^{20} = +5.2$ (c = 0.6, CH₂Cl₂); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 6.76 (dt, J = 1.2, 7.2 Hz, 2H, C=CH), 5.87 (bs, 1H, NH), 3.48-3.41 (m, 3H, NHCH₂, CHOH), 3.06 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH₂S), 2.34-2.17 (m, 2H, C=CHCH₂), 1.96 (s, 3H, CH₃CO), 1.88 (s, 3H, CH₃C=CH), 1.67-1.24 (m, 5H, CH₂CH₃, CHCH₃, CH₂CHCH₃), 0.96 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CHCH₃), 0.90 (d, J = 6.6 Hz, 3H, CH₂CH₃); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 194.0 (q, SCO), 170.3 (q, CH₃CO), 142.2 (t, C=CH), 135.6 (q, C=CH), 76.4 (t, CHOH), 39.9 (s, NHCH₂), 37.6 (s, CH₂CHCH₃), 32.1 (t, CHCH₃), 29.7 (s, CH₂S), 28.5 (s, C=CHCH₂), 26.7 (s, CH₂CH₃), 23.3 (p, CH₃CO), 13.4 (p, CHCH₃), 12.5 (p, CH₃C=CH), 10.7 (p, CH₂CH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₁₅H₂₇NO₃S [M+Na]⁺: berechnet 324.1609, gefunden 324.1620.

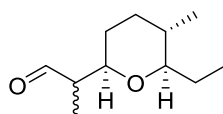
5.3.3 Verbindungen für die *in vitro* Untersuchung von AmbDH4

2-((2*R*,5*S*,6*R*)-6-Ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)propan-1-ol (**137a/b**)

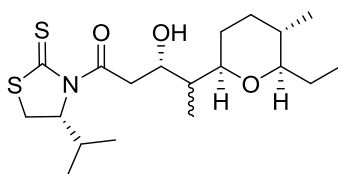


Ein Diastereomerengemisch von Ethylester **140a/140b** (50 mg, 0.22 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem CH₂Cl₂ (2 mL) gelöst und auf -78 °C abgekühlt. DIBAL-H (1.0 M in Hexan, 0.6 mL, 0.55 mmol, 2.5 Äq.) wurde langsam hinzugegeben, die Reaktionslösung auf 0 °C erwärmt und 4 h gerührt. Durch Zugabe von gesättigter Na,K-Tatrat Lösung (5 mL) wurde die Reaktion beendet und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase mit Et₂O extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc / 19:1) ergab Alkohol als Diastereomerengemisch **137a/137b** (30 mg, 0.16 mmol, 73%) als farbloses Öl.

R_f (PE:EtOAc / 14:1): 0.30, **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.71-3.56 (m, 2.6H, CH₂OH, OH), 3.50-3.43 (m, 0.4H, CH₂OH), 3.23-3.15 (m, 1H, HOCH₂CHCHO), 2.91-2.82 (m, 1H, CH₂CHO), 1.97-1.86 (m, 0.4H, CHCH₂OH), 1.81-1.62 (m, 2.6H, CHCH₂CH₂, CHCH₂OH, CH₂CH₃), 1.51-1.45 (m, 1H, CHCH₂CH₂), 1.42-1.28 (m, 3H, CHCH₂CH₂, CH₂CH₂CHCH₃, CH₂CH₃), 1.21-1.08 (m, 1H, CHCH₂CH₂), 0.94 (d, *J* = 7.7 Hz, 1.4 H, CH₃CHCH₂OH), 0.91 (t, *J* = 7.7 Hz, 3H, CH₃CH₂), 0.83 (d, *J* = 6.8 Hz, 1.6H, CH₃CHCH₂OH), 0.81-0.79 (m, 3H, CH₃CHCH₂CH₂); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 85.2 (t, CH₂CHO), 85.1 (t, CH₂CHO), 84.5 (t, HOCH₂CHCHO), 81.8 (t, HOCH₂CHCHO), 68.4 (s, CHCHO), 66.9 (s, CHCHO), 40.2 (t, CHCH₂OH), 38.8 (t, CHCH₂OH), 34.6 (s, CHCH₂CH₂), 34.6 (s, CHCH₂CH₂), 32.8 (t, CH₂CH₂CHCH₃), 32.8 (t, CH₂CH₂CHCH₃), 30.5 (s, CHCH₂CH₂), 27.1 (s, CHCH₂CH₂), 25.9 (s, CH₂CH₃), 25.8 (s, CH₂CH₃), 17.8 (p, CH₃CHCH₂OH), 17.7 (p, CH₃CHCH₂OH), 13.7 (p, CH₃CHCH₂CH₂), 11.8 (p, CH₃CHCH₂CH₂), 9.8 (p, CH₃CH₂), 9.6 (p, CH₃CH₂); **HRMS** (ESI): *m/z* für C₁₁H₂₂O₂ [M+Na]⁺: berechnet 209.1517, gefunden 209.1516.

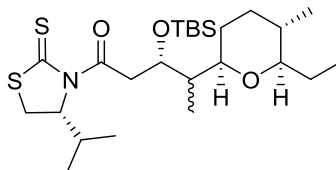
2-((2R,5S,6R)-6-Ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)propanal (138a/b)

DMP (341 mg, 0.81 mmol, 3.0 Äq.) und NaHCO_3 (225 mg, 2.68 mmol, 10.0 Äq.) wurden in trockenem CH_2Cl_2 (2 mL) gelöst. Ein Gemisch von Alkohol **137a/b** (50 mg, 0.27 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem CH_2Cl_2 (1 mL) gelöst und langsam zur Reaktionslösung gegeben. Nach 2 h bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (2 mL) und Et_2O (2 mL) beendet und so lange gerührt bis beide Phasen klar wurden. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Gemisch von Aldehyd **138a/b** wurde direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

(3S)-4-((2R,5S,6R)-6-Ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-3-hydroxy-1-((R)-4-isopropyl-2-thioxothiazolidin-3-yl)pentan-1-on (211a/b)

Acetyliertes (4R)-NAGAO-Auxiliar (**142**) (77 mg, 0.38 mmol, 1.7 Äq.) wurde in trockenem CH_2Cl_2 (3 mL) gelöst, auf $-40\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt und TiCl_4 (1.0 M in CH_2Cl_2 , 0.4 mL, 0.40 mmol, 1.8 Äq.) und DIPEA (0.07 mL, 0.40 mmol, 1.8 Äq.) wurden nacheinander tropfenweise hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 2 h bei $-40\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt und anschließend auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Das Gemisch von Aldehyd **138a/b** (49 mg, 0.27 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem CH_2Cl_2 (1 mL) gelöst und über 30 min zur Reaktionslösung getropft. Nach 30 min bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter NH_4Cl (5 mL) und Phosphatpuffer (pH 7.4, 10 mL) beendet, auf Raumtemperatur erwärmt und 1 h gerührt. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Aldol-Produkt-Diastereomeregemisch **211a/b** wurde direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

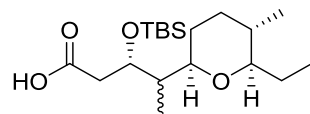
(3S)-3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-4-((2R,5S,6R)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1-((R)-4-isopropyl-2-thioxothiazolidin-3-yl)pentan-1-on (141a/b)



Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Schätzung folgend, wurde aus dem Aldol-Produkt-Diastereomerenmisch **211a/b** (103 mg, 0.27 mmol, 1.0 Äq.), 2,6-Lutidin (0.05 mL, 0.40 mmol, 1.5 Äq.) und TBSOTf (0.09 mL, 0.40 mmol, 1.5 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 99:1 → 39:1) wurde ein untrennbares Gemisch des TBS-geschützte Aldol-Produkts **141a/b** (37 mg, 0.07 mmol, 27% über drei Stufen) als farbloser Feststoff erhalten.

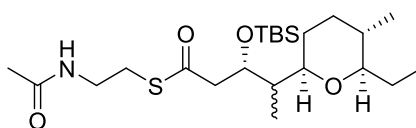
R_f (PE:EE / 39:1): 0.38; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.05 (q, J = 6.6 Hz, 1H, CHN), 4.81-4.75 (m, 0.5H, CHOTBS), 4.39-4.34 (m, 0.5H, CHOTBS), 3.69 (dd, J = 8.0 Hz, 17.2 Hz, 0.4H, CHCHOTBS), 3.57 (dd, J = 9.7 Hz, 17.2 Hz, 0.6H, CHCHOTBS), 3.50-3.41 (m, 1H, CH_2S), 3.29-3.23 (m, 0.4H, CHCHCHO), 3.14 (dd, J = 3.8, 17.1 Hz, 0.4H, CHCHCHO), 3.04-2.98 (m, 1H, CH_2S), 2.84-2.76 (m, 0.5H, H- CH_2CHO), 2.69 (dt, J = 2.7, 9.2 Hz, 0.5H, CH_2CHO), 2.49-2.33 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.82-1.56 (m, 4H, COCH_2 , CHCH_2CH_2 , CH_2CH_3), 1.41-1.08 (m, 5H, CHCH_2CH_2 , CHCH_2CH_2 , CH_2CHCH_3 , CH_2CH_3), 1.06 (d, J = 6.5 Hz, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.99-0.87 (m, 9H, $\text{CH}_3\text{CHCHOTBS}$, CH_2CH_3 , $\text{CH}(\text{CH}_3)$), 0.87-0.82 (m, 9H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 0.81-0.76 (m, 3H, CH_2CHCH_3), 0.09 (s, 1.6H, OSiCH_3), 0.06 (s, 1.2H, OSiCH_3), 0.02 (s, 1.5H, OSiCH_3), 0.00 (s, 1.2H, OSiCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 172.6 (q, NCO), 84.8 (t, CH_2CHO), 84.4 (t, CH_2CHO), 79.7 (t, CHCHCHO), 77.3 (t, CHCHCHO), 71.7 (t, CHN), 70.6 (t, CHOTBS), 68.9 (t, CHOTBS), 44.7 (s, COCH_2), 40.5 (t, $\text{CH}_3\text{CHCHOTBS}$), 35.1 (s, CHCH_2CH_2), 34.7 (s, CHCH_2CH_2), 33.4 (t, CH_2CHCH_3), 33.2 (t, CH_2CHCH_3), 31.1 (s, CH_2S), 30.8 (t, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 30.5 (t, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 26.1 (s, CH_2CH_3), 25.9 (p, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 19.2 (p, $\text{CH}_3\text{CHCHOTBS}$), 19.2 (p, $\text{CH}_3\text{CHCHOTBS}$), 18.2 (q, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 18.1 (q, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 18.0 (p, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 18.0 (q, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 17.8 (p, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 10.7 (p, CH_2CHCH_3), 10.2 (p, CH_2CHCH_3), 10.1 (p, CH_2CH_3), 9.7 (p, CH_2CH_3), -4.4 (p, OSiCH_3), -4.6 (p, OSiCH_3), -4.6 (p, OSiCH_3), -4.7 (p, OSiCH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $\text{C}_{25}\text{H}_{47}\text{NO}_3\text{S}_2\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 524.2662, gefunden 524.2662.

(3S)-3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-4-((2*R*,5*S*,6*R*)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)pentansäure (212a/b)



Das Gemisch des TBS-geschützte Aldol-Produkts **141a/b** (37 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.) wurde in THF/H₂O (1 mL, 3:1) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von H₂O₂ (35%ig, 31 µL, 0.37 mmol, 5.0 Äq.) und LiOH·H₂O (4 mg, 0.09 mmol, 1.25 Äq.) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und 24 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NaHSO₃ (1.5 M, 1 mL) beendet, THF *in vacuo* entfernt und der Rückstand in EtOAc aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Gemisch aus Säure **212a/b** wurde direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

S-(2-Acetamidoethyl)-((3S)-3-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-4-((2*R*,5*S*,6*R*)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)pentanthioat (213a/b)



Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von *N*-Acetylcysteaminestern folgend, wurde aus dem Gemisch der freien Säuren **212a/b** (26 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.), *N*-Acetylcysteamin (10 mg, 0.08 mmol, 1.1 Äq.), EDC·HCl (15 mg, 0.08 mmol, 1.1 Äq.) und 4-DMAP (2 mg, 0.02 mmol, 0.22 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 4:1 → 2:1 → 1:1) ein untrennbares Gemisch an SNAC-Thioester **213a/b** (14 mg, 0.03 mmol, 40% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 1:1): 0.29; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.84 (bs, 1H, NH), 4.68 (dt, J = 3.5, 9.2 Hz, 0.5H, CHOTBS), 4.18 (quin., J = 4.0 Hz, 0.5 H, CHOTBS), 3.50-3.36 (m, 2.5H, NHCH₂, CHCHCHO), 3.07-2.93 (m, 2H, CH₂S), 2.93-2.85 (m, 0.5H, CHCHCHO), 2.85-2.57 (m, 3H, COCH₂, CH₂CHO), 1.97 (s, 1.3H, CH₃CO), 1.96 (s, 3H, CH₃CO), 1.81-1.62 (m, 1.3H, CHCHCHO, CH₂CH₃), 1.62-1.52 (m, 0.7H, CHCHCHO), 1.52-1.08 (m, 6H, CHCH₂CH₂, CHCH₂CH₂, CH₂CHCH₃, CH₂CH₃), 0.99-0.75 (m, 18H, CH₃CHCHOTBS, CH₂CHCH₃, CH₂CH₃, OSi(CH₃)₃), 0.04 (s, 1.6H, OSiCH₃), 0.02 (s, 1.4H, OSiCH₃), 0.00 (s, 1.3H, OSiCH₃), -0.01 (s, 1.7H, OSiCH₃);

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 199.2 (q, SCO), 199.1 (q, SCO), 170.2 (q, CH_3CO), 170.2 (q, CH_3CO), 84.8 (t, CH_2CHO), 84.6 (t, CH_2CHO), 79.4 (t, CHCHCHO), 75.9 (t, CHCHCHO), 71.6 (t, CHOTBS), 69.4 (t, CHOTBS), 48.9 (s, COCH_2), 46.8 (s, COCH_2), 44.7 (t, CHCHCHO), 44.1 (t, CHCHCHO), 39.8 (s, NHCH_2), 39.7 (s, NHCH_2), 35.1 (s, CHCH_2CH_2), 35.0 (s, CHCH_2CH_2), 33.4 (t, CH_2CHCH_3), 33.1 (t, CH_2CHCH_3), 30.4 (s, CHCH_2CH_2), 30.4 (s, CHCH_2CH_2), 28.7 (s, CH_2S), 28.7 (s, CH_2S), 26.2 (s, CH_2CH_3), 26.1 (s, CH_2CH_3), 25.8 (p, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 23.3 (p, CH_3CO), 23.3 (p, CH_3CO), 18.1 (q, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 18.1 (q, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 17.9 (p, CH_2CHCH_3), 17.8 (p, CH_2CHCH_3), 10.4 (p, $\text{CH}_3\text{CHCHOTBS}$), 10.2 (p, $\text{CH}_3\text{CHCHOTBS}$), 9.7 (p, CH_2CH_3), -4.5 (p, OSiCH_3), -4.6 (p, OSiCH_3), -4.6 (p, OSiCH_3), -4.9 (p, OSiCH_3); HRMS (ESI): m/z für $\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{NO}_4\text{SSi}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 482.2736, gefunden 482.2736.

S-(2-Acetamidoethyl)-(3S,4S)-4-((2R,5S,6R)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-3-hydroxypentanthioat (134a) und S-(2-Acetamidoethyl)-(3S,4R)-4-((2R,5S,6R)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-3-hydroxypentanthioat (134b)



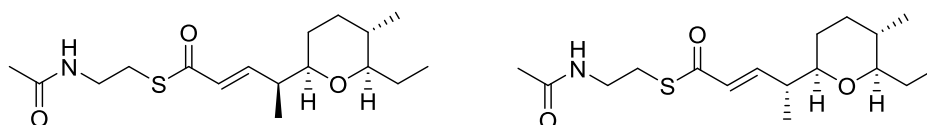
Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurden aus dem Diastereomerenmisch von Thioester **213a/b** (13 mg, 0.03 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (71 mg, 0.28 mmol, 5.0 Äq.) nach 24 h bei 50 °C und anschließender Reinigung per semi-präparativer HPLC ($\text{C}_{18}\text{-P}_{[\text{B}]}$ $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} = 90:10$ {10 min}, Gradient $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} = 90:10 \rightarrow 0:100$ {70 min}, $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} = 0:100$ {10 min}, 2.5 mL/min) SNAC-Thioester **134a** und **134b** (4 mg, 0.01 mmol, 43%, *d.r.* = 1:1) als farblose Öle erhalten.

134a: t_{R} : 37.5 min; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -9.4$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.93 (bs, 1H, NH), 4.62 (s, 1H, OH), 4.19-4.12 (m, 1H, CHOH), 3.52-3.39 (m, 2H, NHCH_2), 3.27-3.20 (m, 1H, CHCHCHO), 3.13-3.00 (m, 2H, CH_2S), 2.94-2.87 (m, 1H, CH_2CHO), 2.79-2.76 (m, 1H, COCH_2), 2.69 (dd, $J = 9.2, 14.3$ Hz, 1H, COCH_2), 1.94 (s, 3H, CH_3CO), 1.83-1.75 (m, 2H, CHCH_2CH_2 , CHCH_2CH_2), 1.74-1.63 (m, 2H, CHCHCHO , CH_2CH_3), 1.45-1.09 (m, 4H, CHCH_2CH_2 , CHCH_2CH_2 , CH_2CHCH_3 , CH_2CH_3), 0.92 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.82 (d, $J = 4.1$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CHCHOTBS}$), 0.80 (d, $J = 3.4$ Hz, 3H, CH_2CHCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 199.1 (q, SCO), 170.4 (q, CH_3CO), 85.2 (t, CH_2CHO), 83.1 (t, CHCHCHO), 73.4 (t, CHOH), 49.3 (s, COCH_2), 43.6 (t, CHCHCHO), 39.5 (s, NHCH_2), 34.3 (s, CHCH_2CH_2), 32.7 (t, CH_2CHCH_3), 30.5

(s, CHCH₂CH₂), 28.8 (s, CH₂S), 25.7 (s, CH₂CH₃), 23.2 (p, CH₃CO), 17.7 (p, CH₂CHCH₃), 12.8 (p, CH₃CHCHOTBS), 9.8 (p, CH₂CH₃). **HRMS** (ESI): m/z für C₁₇H₃₁NO₄S [M+H]⁺: berechnet 346.2052, gefunden 346.2053.

134b: t_R: 40.5 min; [α]_D²⁰ = -11.1 (c = 1.1, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.87 (bs, 1H, NH), 4.40-4.33 (m, 1H, CHOH), 3.84 (s, 1H, OH), 3.59-3.53 (m, 1H, CHCHCHO), 3.52-3.37 (m, 2H, NHCH₂), 3.13-2.99 (m, 2H, CH₂S), 2.97-2.91 (m, 1H, CH₂CHO), 2.87 (dd, J = 14.3, 8.9 Hz, 1H, COCH₂), 2.64-2.58 (m, 1H, COCH₂), 1.95 (s, 3H, CH₃CO), 1.81-1.74 (m, 1H, CHCH₂CH₂), 1.74-1.72 (m, 1H, CH₂CH₃), 1.60-1.58 (m, 1H, CHCHCHO), 1.44-1.14 (m, 5H, CHCH₂CH₂, CHCH₂CH₂, CH₂CHCH₃, CH₂CH₃), 0.97 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃CHCHOTBS), 0.89 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.81 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH₂CHCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 198.7 (q, SCO), 170.3 (q, CH₃CO), 84.9 (t, CH₂CHO), 82.5 (t, CHCHCHO), 73.4 (t, CHOH), 49.3 (s, COCH₂), 41.2 (t, CHCHCHO), 39.5 (s, NHCH₂), 34.3 (s, CHCH₂CH₂), 32.8 (t, CH₂CHCH₃), 29.3 (s, CHCH₂CH₂), 28.8 (s, CH₂S), 25.8 (s, CH₂CH₃), 23.2 (p, CH₃CO), 17.8 (p, CH₂CHCH₃), 9.7 (p, CH₂CH₃), 6.3 (p, CH₃CHCHOTBS); **HRMS** (ESI): m/z für C₁₇H₃₁NO₄S [M+Na]⁺: berechnet 368.1872, gefunden 368.1870.

S-(2-Acetamidoethyl)-(S,E)-4-((2R,5S,6R)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)pent-2-enthioat (135a) und **S-(2-Acetamidoethyl)-(R,E)-4-((2R,5S,6R)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)pent-2-enthioat (135b)**



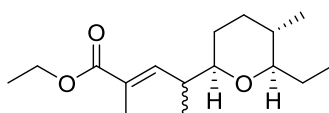
Der allgemeinen Vorschrift für WITTIG-Reaktionen folgend, wurden aus dem Diastereomeregemisch von Aldehyd **138a/b** (49 mg, 0.27 mmol, 1.0 Äq.) und Phosphoran **145** (280 mg, 0.67 mmol, 2.5 Äq.) nach Reinigung per semi-präparativer HPLC (C18-P_[B] H₂O:CH₃CN = 90:10 {10 min}, Gradient H₂O:CH₃CN = 90:10 → 0:100 {70 min}, H₂O:CH₃CN = 0:100 {10 min}, 2.5 mL/min) SNAC-Thioester **135a** und **135b** (46 mg, 0.01 mmol, 53% über zwei Stufen) als farblose Öle erhalten.

135a: t_R: 42 min; [α]_D²² = +7.0 (c = 0.5, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.04 (dd, J = 7.8, 16.0 Hz, 1H, COCHCH), 6.13 (dd, J = 1.4, 14.3 Hz, 1H, COCHCH), 5.90 (bs, 1H, NH), 3.46 (q, J = 6.1 Hz, 2H, NHCH₂), 3.17-3.06 (m, 3H, CHCHCHO, CH₂S), 2.78 (dt, J = 2.4, 9.1 Hz, 1H,

CH₂CHO), 2.43-2.32 (m, 1H, CHCHCHO), 1.96 (s, 3H, CH₃CO), 1.82-1.74 (m, 1H, CHCH₂CH₂), 1.73-1.57 (m, 3H, CHCH₂CH₂, CHCH₂CH₂, CH₂CH₃), 1.39-1.11 (m, 4H, CHCH₂CH₂, CH₂CHCH₃, CH₂CH₃), 1.06 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃CHCHCH), 0.92 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.79 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₂CHCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 190.8 (q, SCO), 170.3 (q, CH₃CO), 149.8 (t, COCHCH), 127.8 (t, COCHCH), 84.9 (t, CH₂CHO), 80.4 (t, CHCHCHO), 42.2 (t, CHCHCHO), 40.0 (s, NHCH₂), 35.0 (s, CHCH₂CH₂), 33.0 (s, CHCH₂CH₂), 29.8 (t, CH₂CHCH₃), 28.3 (s, CH₂S), 26.1 (s, CH₂CH₃), 23.3 (p, CH₃CO), 17.7 (p, CH₂CHCH₃), 15.6 (p, CH₃CHCHCH), 10.0 (p, CH₂CH₃); HRMS (ESI): *m/z* für C₁₇H₂₉NO₃S [M+H]⁺: berechnet 328.1946, gefunden 328.1945.

135b: *t*_R: 44 min; [α]_D²² = + 8.2 (c = 0.3, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.90 (dd, *J* = 8.0, 15.5 Hz, 1H, COCHCH), 6.13 (dd, *J* = 1.0, 15.7 Hz, 1H, COCHCH), 5.87 (bs, 1H, NH), 3.47 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H, NHCH₂), 3.17-3.06 (m, 3H, CH₂S, CHCHCHO), 2.81 (dt, *J* = 2.7, 9.0 Hz, 1H, CH₂CHO), 2.45-2.34 (m, 1H, CHCHCHO), 1.97 (s, 3H, CH₃CO), 1.81-1.63 (m, 1H, CHCH₂CH₂), 1.60-1.49 (m, 3H, CHCH₂CH₂, CHCH₂CH₂, CH₂CH₃), 1.43-1.16 (m, CHCH₂CH₂, CH₂CHCH₃, CH₂CH₃), 1.11 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃CHCHCH), 0.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.80 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₂CHCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 190.6 (q, SCO), 148.8 (t, COCHCH), 128.0 (t, COCHCH), 84.9 (t, CH₂CHO), 79.9 (t, CHCHCHO), 42.5 (t, CHCHCHO), 39.9 (s, NHCH₂), 34.9 (s, CHCH₂CH₂), 32.9 (s, CHCH₂CH₂), 29.8 (t, CH₂CHCH₃), 28.4 (s, CH₂S), 26.1 (s, CH₂CH₃), 23.3 (p, CH₃CO), 17.7 (p, CH₂CHCH₃), 15.4 (p, CH₃CHCHCH), 9.9 (p, CH₂CH₃); HRMS (ESI): *m/z* für C₁₇H₂₉NO₃S [M+H]⁺: berechnet 328.1946, gefunden 328.1945.

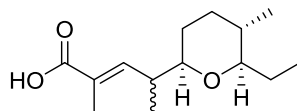
Ethyl-(*E*)-4-((2*R*,5*S*,6*R*)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-2-methylpent-2-enoat (146a/b)



Der allgemeinen Vorschrift für WITTIG-Reaktionen folgend, wurde aus dem Diastereomerengemisch von Aldehyd **138a/b** (98 mg, 0.53 mmol, 1.0 Äq.) und Phosphoran **147** (482 mg, 1.32 mmol, 2.5 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) ein untrennbares Diastereomerengemisch an Ethylester **146a/b** (Diastereomerengemisch, 58 mg, 0.22 mmol, 41% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

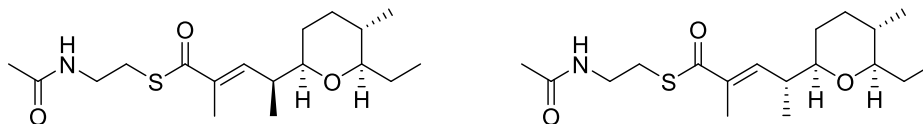
R_f (PE:EtOAc / 39:1): 0.45; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.74 (dd, *J* = 1.4, 9.9 Hz, 0.5H, CCHCH), 6.56 (dd, *J* = 1.4, 10.2 Hz, 0.4H, CCHCH), 4.25-4.12 (m, 2H, CH₃CH₂CO), 3.16-3.10 (m, 0.55H, CHCHCHO), 3.08-2.99 (m, 0.45H, CHCHCHO), 2.76 (dq, *J* = 2.7, 9.2 Hz, 1H, CH₂CHO), 2.62-2.48 (m, 1H, CHCHCHO), 1.84 (d, *J* = 1.4 Hz, 1.4H, CH₃CCH), 1.83 (d, *J* = 1.4 Hz, CH₃CCH), 1.80-1.51 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 1.38-1.10 (m, 8H, CHCH₂CH₂, CH₂CHCH₃, CH₂CH₃, CH₃CH₂CO), 1.07 (d, *J* = 6.8 Hz, 1.4H, CH₃CHCHC), 1.00 (d, *J* = 6.8 Hz, 1.6H, CH₃CHCHC), 0.96 (t, *J* = 7.5 Hz, 1.4H, CH₂CHCH₃), 0.89 (t, *J* = 7.3 Hz, 1.6H, CH₂CHCH₃), 0.79 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₂CH₃); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 168.6 (q, OCO), 168.4 (q, OCO), 145.5 (t, CCHCH), 144.2 (t, CCHCH), 127.6 (q, CCHCH), 127.2 (q, CCHCH), 85.1 (t, CH₂CHO), 84.7 (t, CH₂CHO), 80.9 (t, CHCHCHO), 60.5 (s, CH₃CH₂CO), 60.3 (s, CH₃CH₂CO), 39.5 (t, CHCHCHO), 38.8 (t, CHCHCHO), 35.4 (s, CHCH₂CH₂), 34.8 (s, CHCH₂CH₂), 33.1 (s, CHCH₂CH₂), 33.1 (s, CHCH₂CH₂), 30.5 (t, CH₂CHCH₃), 29.6 (t, CH₂CHCH₃), 26.3 (s, CH₂CH₃), 26.0 (s, CH₂CH₃), 17.8 (p, CH₂CHCH₃), 17.7 (p, CH₂CHCH₃), 16.3 (p, CH₃CCH), 16.0 (p, CH₃CCH), 14.3 (s, CH₃CH₂CO), 12.8 (p, CH₃CCH), 12.7 (p, CH₃CCH), 10.2 (p, CH₂CH₃), 9.7 (p, CH₂CH₃); **HRMS** (ESI): *m/z* für C₁₆H₂₈O₃ [M+H]⁺: berechnet 291.1939, gefunden 291.1936.

**(E)-4-((2R,5S,6R)-6-Ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-2-methylpent-2-ensäure
(214a/b)**



Der allgemeinen Vorschrift zur Verseifung von Ethylestern folgend, wurde aus dem Diastereomerengemisch von Ethylester **146a/b** (58 mg, 0.22 mmol, 1.0 Äq.) und LiOH·H₂O (45 mg, 1.08 mmol, 5.0 Äq.) ein Gemisch der freien Säure **214a/b** erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

S-(2-Acetamidoethyl)-(S,E)-4-((2R,5S,6R)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-2-methylpent-2-enthioat (136a) und S-(2-Acetamidoethyl)-(R,E)-4-((2R,5S,6R)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-2-methylpent-2-enthioat (136b)



Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von *N*-Acetylcysteaminestern folgend, wurden aus dem Diastereomerengemisch der freien Säuren **214a/b** (52 mg, 0.22 mmol, 1.0 Äq.), *N*-Acetylcysteamin (26 mg, 0.24 mmol, 1.1 Äq.), EDC·HCl (46 mg, 0.24 mmol, 1.1 Äq.) und 4-DMAP (6 mg, 0.05 mmol, 0.22 Äq.) nach Reinigung per semi-präparativer HPLC (C18-P_[B] H₂O:CH₃CN = 90:10 {10 min}, Gradient H₂O:CH₃CN = 90:10 → 0:100 {70 min}, H₂O:CH₃CN = 0:100 {10 min}, 2.5 mL/min) SNAC-Thioester **136a** und **136b** (11 mg, 0.03 mmol, 15% über zwei Stufen) als farbloses Öle erhalten.

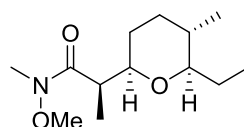
Diastereomer 1: t_R : 44 min; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.81 (dd, J = 1.4, 9.6 Hz, 1H, CCHCH), 5.90 (bs, 1H, NH), 3.48 (q, J = 6.0 Hz, 2H, NHCH₂), 3.21-3.15 (m, 1H, CHCHCHO), 3.12-3.06 (m, 2H, CH₂S), 2.80 (dt, J = 2.4, 9.1 Hz, 1H, CH₂CHO), 2.64-2.55 (m, 1H, CHCHCHO), 1.99 (s, 3H, CH₃CO), 1.90 (d, J = 1.4 Hz, 3H, CH₃CCH), 1.72-1.63 (m, 2H, CHCH₂CH₂, CH₂CHCH₃), 1.39-1.11 (m, 5H, CHCH₂CH₂, CHCH₂CH₂, CH₂CHCH₃, CH₂CH₃), 1.06 (d, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃CHCHC), 0.94 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.82 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH₂CHCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 194.5 (q, SCO), 170.3 (q, CH₃CO), 145.6 (t, CCHCH), 135.3 (q, CCHCH), 84.8 (t, CH₂CHO), 80.8 (t, CHCHCHO), 40.0 (t, CHCHCHO), 39.1 (s, NHCH₂), 34.8 (s, CHCH₂CH₂), 33.0 (s, CHCH₂CH₂), 29.9 (s, CH₂S), 28.4 (t, CH₂CHCH₃), 26.0 (s, CH₂CH₃), 23.3 (p, CH₃CO), 17.7 (p, CH₂CHCH₃), 16.0 (p, CH₃CCH), 12.7 (p, CH₃CHCHC), 9.8 (p, CH₂CH₃), **HRMS** (ESI): m/z für C₁₈H₃₁NO₃S [M+H]⁺: berechnet 342.2103, gefunden 342.2101.

Diastereomer 2: t_R : 45 min; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.62 (dd, J = 1.2, 10.1 Hz, 1H, CCHCH), 5.88 (bs, 1H, NH), 3.48 (q, J = 6.1 Hz, 2H, NHCH₂), 3.15-3.06 (m, 3H, CHCHCHO, CH₂S), 2.82 (dt, J = 2.4, 9.2 Hz, 1H, CH₂CHO), 2.68-2.57 (m, 1H, CHCHCHO), 1.99 (s, 3H, CH₃CO), 1.92 (d, J = 1.4 Hz, 3H, CH₃CCH), 1.81-1.68 (m, 2H, CHCH₂CH₂, CH₂CH₃), 1.63-1.52 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 1.43-1.13 (m, 3H, CHCH₂CH₂, CH₂CHCH₃, CH₂CH₃), 1.12 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH₃CHCHC), 0.99 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.82 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH₂CHCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 144.0 (t, CCHCH), 135.4 (q, CCHCH), 85.1 (t, CH₂CHO), 80.6 (t,

CHCHCHO), 39.9 (t, CHCHCHO), 39.6 (s, NHCH₂), 35.3 (s, CHCH₂CH₂), 33.0 (s, CHCH₂CH₂), 30.3 (s, CH₂S), 28.5 (t, CH₂CHCH₃), 26.2 (s, CH₂CH₃), 23.3 (p, CH₃CO), 17.8 (p, CH₂CHCH₃), 16.0 (p, CH₃CCH), 12.8 (p, CH₃CHCHC), 10.1 (p, CH₂CH₃); **HRMS** (ESI): *m/z* für C₁₈H₃₁NO₃S [M+H]⁺: berechnet 342.2103, gefunden 342.2102.

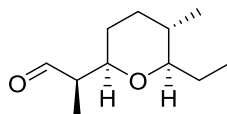
Diastereomerenreine Synthese der Substrate 134a und 135a

(*R*)-2-((2*R*,5*S*,6*R*)-6-Ethyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-*N*-methoxy-*N*-methylpropanamid (**148**)

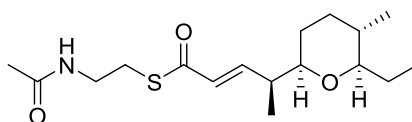


SNAC-Ester **99** (100 mg, 0.33 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem THF (5 mL) gelöst und nach Zugabe von *N,O*-Dimethylhydroxylamin·HCl (97 mg, 0.99 mmol, 3.0 Äq.) auf -30 °C abgekühlt. Nach Zugabe von Isopropylmagnesiumchlorid (2.0 M in THF, 1 mL, 1.98 mmol, 5.98 Äq.) wurde die Reaktionslösung 1 h bei -30 °C und anschließend 5 h bei 0 °C gerührt. Durch Zugabe von gesättigter NH₄Cl-Lösung wurde die Reaktion beendet. Die wässrige Phase wurde mit Et₂O extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc /4:1) ergab Weinrebamid **148** (53 mg, 0.22 mmol, 66%) als farbloses Öl.

R_f (PE:EtOAc / 4:1): 0.35; [α]_D²³ = + 320.9 (c = 1.1, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.71 (s, 3H, CH₃ON), 3.49-3.42 (m, 1H, C(O)CHCH), 3.19 (s, 3H, CH₃N), 3.01-2.93 (m, 1H, C(O)CHCH₃), 2.79 (dt, *J* = 2.7, 9.0 Hz, 1H, CHCHOCH₂CH₃), 1.81-1.71 (m, 2H, 1x CH₂CH₂CHCH₃, 1x CH₂CH₂CHCH₃), 1.68-1.55 (m, 1H, 1x CH₂CH₃), 1.33-1.12 (m, 4H, 1x CH₂CH₂CHCH₃, 1x CH₂CH₂CHCH₃, CH₂CH₂CHCH₃, 1x CH₂CH₃), 1.02 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃CHCO), 0.85 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.77 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃CHCH₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 230.5 (q, NCO), 84.3 (t, CHCHOCH₂CH₃), 79.4 (t, C(O)CHCH), 61.3 (p, CH₃ON), 40.4 (t, C(O)CHCH₃), 34.9 (s, CH₂CH₂CHCH₃), 32.8 (t, CH₂CH₂CHCH₃), 29.3 (s, CH₂CH₂CHCH₃), 26.0 (s, CH₂CH₃), 17.7 (p, CH₃CHCH₂), 13.4 (p, CH₃CHCO), 9.6 (p, CH₂CH₃); **HRMS** (ESI): *m/z* für C₁₃H₂₅NO₃ [M+Na]⁺: berechnet 266.1732, gefunden 266.1731.

(R)-2-((2R,5S,6R)-6-Ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)propanal (138a)

Weinrebamid **148** (40 mg, 0.16 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem THF (2 mL) gelöst und auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. DIBAL-H (1.0 M in Hexan, 0.3 mL, 0.32 mmol, 2.0 Äq.) wurde langsam hinzugegeben und die Reaktionslösung 3 h bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Durch Zugabe von gesättigter Na,K-Tatrat-Lösung (5 mL) wurde die Reaktion beendet und anschließend 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wurde mit Et_2O extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der erhaltene Aldehyd **138a** wurde direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

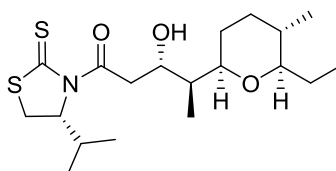
S-(2-Acetamidoethyl)-(S,E)-4-((2R,5S,6R)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)pent-2-enthioat (135a)

Der allgemeinen Vorschrift für WITTIG-Reaktionen folgend, wurde aus Aldehyd **138a** (15 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äq.) und Phosphoran **145** (78 mg, 0.19 mmol, 2.5 Äq.) nach Reinigung per semi-präparativer HPLC (C18-P_[B] H₂O:CH₃CN = 90:10 {10 min}, Gradient H₂O:CH₃CN = 90:10 → 0:100 {70 min}, H₂O:CH₃CN = 0:100 {10 min}, 2.5 mL/min) SNAC-Thioester **135a** (3 mg, 0.009 mmol, 12% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

t_R : 49.5 min; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.04 (dd, $J = 8.2, 16.4$ Hz, 1H, COCHCH), 6.13 (dd, $J = 1.0, 15.7$ Hz, 1H, COCHCH), 5.87 (bs, 1H, NH), 3.47 (q, $J = 6.1$ Hz, 2H, NHCH₂), 3.17-3.06 (m, 3H, CHCHCHO, CH₂S), 2.77 (dt, $J = 2.8, 9.0$ Hz, 1H, CH₂CHO), 2.42-2.32 (m, 1H, CHCHCHO), 1.96 (s, 3H, CH₃CO), 1.82-1.74 (m, 1H, CHCH₂CH₂), 1.73-1.51 (m, 3H, 1x CHCH₂CH₂, 1x CHCH₂CH₂, 1x CH₂CH₃), 1.39-1.11 (m, 4H, 1x CHCH₂CH₂, CH₂CHCH₃, 1x CH₂CH₃), 1.07 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃CHCHCH), 0.93 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.80 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH₂CHCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 190.8 (q, SCO), 170.4 (q, CH₃CO), 149.8 (t, COCHCH), 127.8 (t, COCHCH), 84.9 (t, CH₂CHO), 80.4 (t, CHCHCHO), 42.1 (t, CHCHCHO), 40.0 (s, NHCH₂), 35.0 (s, CHCH₂CH₂), 33.0 (s, CHCH₂CH₂), 29.8 (t, CH₂CHCH₃), 28.3 (s, CH₂S), 26.1 (s,

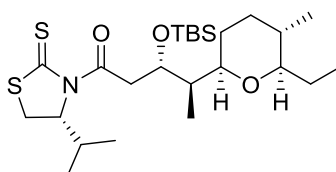
CH₂CH₃), 23.3 (p, CH₃CO), 17.7 (p, CH₂CHCH₃), 15.6 (p, CH₃CHCHCH), 10.0 (p, CH₂CH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₁₇H₂₉NO₃S [M+H]⁺: berechnet 328.1946, gefunden 328.1945.

(3S,4S)-4-((2R,5S,6R)-6-Ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-3-hydroxy-1-((R)-4-isopropyl-2-thioxothiazolidin-3-yl)pentan-1-on (211a)



Acetyliertes (4R)-NAGAO-Auxiliar (**142**) (141 mg, 0.69 mmol, 1.7 Äq.) wurde in trockenem CH₂Cl₂ (5 mL) gelöst, auf -40 °C abgekühlt und TiCl₄ (1.0 M in CH₂Cl₂, 1.3 mL, 1.25 mmol, 1.8 Äq.) und DIPEA (0.2 mL, 1.25 mmol, 1.8 Äq.) wurden nacheinander tropfenweise hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 2 h bei -40 °C gerührt und anschließend auf -78 °C abgekühlt. Aldehyd **138a** (75 mg, 0.41 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem CH₂Cl₂ (1 mL) gelöst und über 30 min zur Reaktionslösung getropft. Nach 30 min bei -78 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter NH₄Cl (6 mL) und Phosphatpuffer (pH 7.4, 4 mL) beendet, auf Raumtemperatur erwärmt und 1 h gerührt. Die Phasen wurden getrennt, die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Das erhaltene Aldol-Produkt **211a** wurde direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

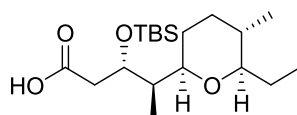
(3S,4R)-3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-4-((2R,5S,6R)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)-1-((R)-4-isopropyl-2-thioxothiazolidin-3-yl)pentan-1-on (141a)



Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Schutzung folgend, wurde aus Aldol-Produkt **211a** (158 mg, 0.41 mmol, 1.0 Äq.), 2,6-Lutidin (0.07 mL, 0.61 mmol, 1.5 Äq.) und TBSOTf (0.14 mL, 0.61 mmol, 1.5 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 99:1 → 39:1) das TBS-geschützte Aldol-Produkt **141a** (91 mg, 0.18 mmol, 45% über drei Stufen) als farbloser Feststoff erhalten.

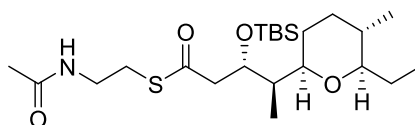
R_f (PE:EtOAc / 39:1): 0.47; $[\alpha]_D^{25} = -18.8$ ($c = 1.5$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.07-5.01 (m, 1H, CHN), 4.81-4.75 (m, 1H, CHOTBS), 3.56 (dd, $J = 9.6, 17.1$ Hz, 1H, CHCHOTBS), 3.45 (dd, $J = 7.9, 11.3$ Hz, 1H, 1 x CH_2S), 3.03-2.98 (m, 1H, 1 x CH_2S), 2.69 (dt, $J = 2.7, 9.2$ Hz, 1H, CH_2CHO), 2.46-2.34 (m, 1H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.81-1.58 (m, 4H, COCH_2 , CHCH_2CH_2 , CH_2CH_3), 1.37-1.08 (m, 5H, CHCH_2CH_2 , CHCH_2CH_2 , CH_2CHCH_3 , CH_2CH_3), 1.06 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.096 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.93-0.87 (m, 6H, $\text{CH}_3\text{CHCHOTBS}$, CH_2CH_3), 0.87-0.80 (m, 9H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 0.77 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_2CHCH_3), 0.09 (s, 3H, OSiCH_3), 0.02 (s, 3H, OSiCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 203.0 (q, SCS), 172.6 (q, NCO), 84.6 (t, CH_2CHO), 79.7 (t, CHCHCHO), 71.7 (t, CHN), 68.9 (t, CHOTBS), 44.6 (s, COCH_2), 40.5 (t, $\text{CH}_3\text{CHCHOTBS}$), 35.1 (s, CHCH_2CH_2), 33.2 (t, CH_2CHCH_3), 31.0 (s, CH_2S), 30.8 (t, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 30.5 (t, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 26.1 (s, CH_2CH_3), 25.9 (p, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 19.1 (p, $\text{CH}_3\text{CHCHOTBS}$), 18.1 (q, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 18.0 (p, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 17.8 (p, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 10.2 (p, CH_2CHCH_3), 10.0 (p, CH_2CH_3), -4.7 (p, OSiCH_3), -4.7 (p, OSiCH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $\text{C}_{25}\text{H}_{47}\text{NO}_3\text{S}_2\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 524.2662, gefunden 524.2661.

(3S,4R)-3-((tert-Butyldimethylsilyloxy)-4-((2R,5S,6R)-6-ethyl-5-methyltetrahydro-2H-pyran-2-yl)pentansäure (212a)



Das TBS-geschützte Aldol-Produkt **141a** (91 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.) wurde in THF/ H_2O (1.6 mL, 3:1) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von H_2O_2 (35%ig, 79 μL , 0.91 mmol, 5.0 Äq.) und $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (10 mg, 0.23 mmol, 1.25 Äq.) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und 24 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von NaHSO_3 (1.5 M, 2 mL) beendet, THF *in vacuo* entfernt und der Rückstand in EtOAc aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Die erhaltene Säure wurde direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

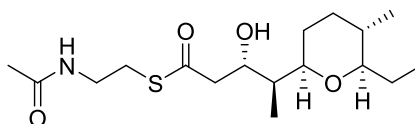
S-(2-Acetamidoethyl)-(3S,4R)-3-((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)-4-((2R,5S,6R)-6-ethyl-5-methyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)pentanthioat (213a)



Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von *N*-Acetylcysteaminestern folgend, wurde aus der freien Säure **212a** (65 mg, 0.18 mmol, 1.0 Äq.), *N*-Acetylcysteamin (24 mg, 0.20 mmol, 1.1 Äq.), EDC·HCl (38 mg, 0.20 mmol, 1.1 Äq.) und 4-DMAP (5 mg, 0.04 mmol, 0.22 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 4:1 → 2:1 → 1:1) SNAC-Thioester **213a** (37 mg, 0.03 mmol, 45% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 1:1): 0.21; $[\alpha]_D^{25} = -18.8$ ($c = 1.5$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.87 (bs, 1H, NH), 4.70 (m, 1H, CHOTBS), 3.49-3.35 (m, 2H, NHCH₂), 3.07-2.93 (m, 2H, CH₂S), 2.92-2.85 (m, 1H, CHCHCHO), 2.74-2.57 (m, 3H, COCH₂, CH₂CHO), 1.95 (s, 3H, CH₃CO), 1.62-1.39 (m, 4H, CHCHCHO, CH₂CH₃), 1.39-1.04 (m, 5H, CHCH₂CH₂, CHCH₂CH₂, CH₂CHCH₃), 0.96 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.87-0.81 (m, 12H, OSi(CH₃)₃, CH₃CHCHOTBS), 0.78 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH₂CHCH₃), 0.04 (s, 3H, OSiCH₃), -0.01 (s, 3H, OSiCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 199.1 (q, SCO), 170.2 (q, CH₃CO), 84.8 (t, CH₂CHO), 79.4 (t, CHCHCHO), 69.4 (t, CHOTBS), 46.8 (s, COCH₂), 44.7 (t, CHCHCHO), 39.8 (s, NHCH₂), 35.0 (s, CHCH₂CH₂), 33.1 (t, CH₂CHCH₃), 30.4 (s, CHCH₂CH₂), 28.6 (s, CH₂S), 26.1 (s, CH₂CH₃), 25.8 (p, OSi(CH₃)₃), 23.3 (p, CH₃CO), 18.1 (q, OSi(CH₃)₃), 17.8 (p, CH₂CHCH₃), 10.1 (p, CH₃CHCHOTBS), 9.7 (p, CH₂CH₃), -4.5 (p, OSiCH₃), -5.0 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₂₃H₄₅NO₄SSi [M+Na]⁺: berechnet 482.2736, gefunden 482.2736.

S-(2-Acetamidoethyl)-(3S,4R)-4-((2R,5S,6R)-6-ethyl-5-methyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-3-hydroxypentanthioat (134a)



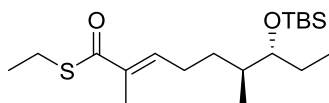
Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus SNAC-Thioester **213a** (18 mg, 0.04 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (49 mg, 0.20 mmol, 5.0 Äq.) nach 24 h bei 50 °C und anschließender Reinigung per semi-präparativer HPLC (C18-P_[B] H₂O:CH₃CN = 90:10 {10 min},

Gradient H₂O:CH₃CN = 90:10 → 0:100 {70 min}, H₂O:CH₃CN = 0:100 {10 min}, 2.5 mL/min)
SNAC-Thioester **134a** (10 mg, 0.03 mmol, 74%) als farbloses Öl erhalten.

t_R : 36.5 min; $[\alpha]_D^{25} = -8.0$ (c = 1.0, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.97 (bs, 1H, NH), 4.63 (bs, 1H, OH), 4.19-4.12 (m, 1H, CHOH), 3.51-3.40 (m, 2H, NHCH₂), 3.27-3.20 (m, 1H, CHCHCHO), 3.13-3.00 (m, 2H, CH₂S), 2.94-2.87 (m, 1H, CH₂CHO), 2.79 (dd, J = 3.1, 14.4 Hz, 1H, 1x COCH₂), 2.69 (dd, J = 9.2, 14.4 Hz, 1H, 1x COCH₂), 1.94 (s, 3H, CH₃CO), 1.83-1.75 (m, 2H, 1x CHCH₂CH₂, 1x CHCH₂CH₂), 1.74-1.62 (m, 2H, CHCHCHO, 1x CH₂CH₃), 1.45-1.08 (m, 4H, 1x CHCH₂CH₂, 1x CHCH₂CH₂, CH₂CHCH₃, 1x CH₂CH₃), 0.91 (t, J = 7.5 Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.82 (d, J = 3.8 Hz, 3H, CH₃CHCHOH), 0.80 (d, J = 3.7 Hz, 3H, CH₂CHCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 199.0 (q, SCO), 170-4 (q, CH₃CO), 85.2 (t, CH₃CO), 83.0 (t, CHCHCHO), 73.4 (t, CHOH), 49.3 (s, COCH₂), 43.6 (t, CHCHCHO), 39.5 (s, NHCH₂), 34.2 (s, CHCH₂CH₂), 32.7 (t, CH₂CHCH₃), 30.5 (s, CHCH₂CH₂), 28.8 (s, CH₂S), 25.7 (s, CH₂CH₃), 23.2 (p, CH₃CO), 17.7 (p, CH₂CHCH₃), 12.8 (p, CH₃CHCHOH), 9.8 (p, CH₂CH₃); HRMS (ESI): m/z für C₁₇H₃₁NO₄S [M+Na]⁺: berechnet 368.1872 gefunden 368.1871.

5.3.4 Verbindungen zur Untersuchung der Substrattoleranz von AmbDH3

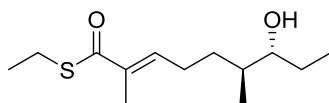
S-Ethyl-(6S,7R,E)-7-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnon-2-enthioat (**215**)



Der allgemeinen Vorschrift für WITTIG-Reaktionen folgend, wurde aus Aldehyd **117** (200 mg, 0.77 mmol, 1.0 Äq.) und Phosphoran **167** (585 mg, 1.55 mmol, 2.0 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) Thioester **215** (241 mg, 0.67 mmol, 87%) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 39:1): 0.59; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.72 (dt, $J = 1.4, 7.3$ Hz, 1H, CH_3CCH), 3.47-3.41 (m, 1H, CHOTBS), 2.91 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2S), 2.32-2.21 (m, 1H, 1x CCHCH_2), 2.19-2.08 (m, 1H, 1x CCHCH_2), 1.87 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H, CH_3CCH), 1.65-1.48 (m, 2H, 1x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 1.45-1.36 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.31-1.19 (m, 1H, 1x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 1.26 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S}$), 0.91-0.83 (m, 15H, CH_3CH , CH_2CH_3 , $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 0.04 (s, 3H, OSiCH_3), 0.03 (s, 3H, OSiCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 194.0 (q, SCO), 141.1 (t, CH_3CCH), 136.1 (q, CH_3CCH), 77.3 (t, CHOTBS), 37.5 (s, CH_2CH_3), 31.0 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 26.8 (t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 26.0 (p, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 25.3 (s, CCHCH_2), 23.3 (s, CH_2S), 18.2 (q, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 14.9 (p, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S}$), 14.8 (p, CH_3CH), 12.4 (p, CH_3CCH), 10.2 (p, CH_2CH_3), -4.3 (p, OSiCH_3), -4.4 (p, OSiCH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_2\text{SSi}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 381.2260, gefunden 381.2262.

S-Ethyl-(6S,7R,E)-7-hydroxy-2,6-dimethylnon-2-enthioat (**156**)

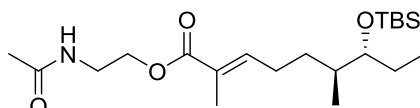


Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus Thioester **215** (200 mg, 0.56 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (700 mg, 2.79 mmol, 5.0 Äq.) nach 24 h bei 50 °C und säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) Thioester **156** (96 mg, 0.39 mmol, 70%) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 9:1): 0.26; $[\alpha]_D^{20} = -16.9$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 6.89-6.84 (m, 1H, CH_3CCH), 3.02-2.95 (m, 1H, CHOH), 2.83 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H, CH_2S), 2.02-1.77 (m, 2H, CCHCH_2), 1.86 (s, 3H, CH_3CCH), 1.44-1.32 (m, 1H, 1x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 1.30-1.13 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, CH_2CH_3), 1.10 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S}$), 1.08-0.97 (m, 1H, 1x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 0.85

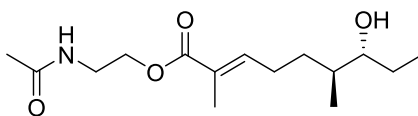
(t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.70 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3CH); ^{13}C NMR (100 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 190.6 (q, SCO), 141.0 (t, CH_3CCH), 136.5 (q, CH_3CCH), 76.9 (t, CHOH), 38.5 (t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 30.9 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 26.7 (s, CCHCH_2), 26.6 (s, CH_2CH_3), 23.4 (s, CH_2S), 15.4 (p, CH_3CH), 15.1 (p, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S}$), 12.6 (p, CH_3CCH), 10.5 (p, CH_2CH_3); HRMS (ESI): m/z für $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 267.1395, gefunden 267.1392.

2-Acetamidoethyl-(6*S*,7*R*,*E*)-7-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnon-2-enoat (**216**)



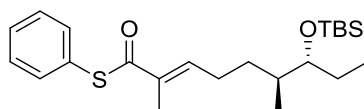
Die freie Carbonsäure (175 mg, 0.58 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem CH_2Cl_2 (6 mL) gelöst und auf 0°C abgekühlt. Nach Zugabe von *N*-Acetylethanolamin (0.06 mL, 0.64 mmol, 1.1 Äq.), EDC·HCl (123 mg, 0.64 mmol, 1.1 Äq.) und 4-DMAP (16 mg, 0.13 mmol, 0.2 Äq.) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Durch Zugabe von HCl (1 M, 6 mL) wurde die Reaktion beendet. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaHCO_3 - und NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc / 4:1 \rightarrow 1:1) ergab Ester **216** (35 mg, 0.09 mmol, 50% über zwei Stufen) als farbloses Öl.

R_f (PE:EtOAc / 1:1): 0.3; $[\alpha]_D^{24} = +10.2$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.77 (dt, $J = 1.0, 7.3$ Hz, 1H, CH_3CCH), 5.79 (bs, 1H, NH), 4.23 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H, CH_2O), 3.55 (q, $J = 5.5$ Hz, 2H, NHCH_2), 3.45-3.39 (m, 1H, CHOTBS), 2.30-2.19 (m, 1H, 1x CCHCH_2), 2.17-2.05 (m, 1H, 1x CCHCH_2), 1.99 (s, 3H, CH_3CO), 1.84 (d, $J = 0.7$ Hz, 3H, CH_3CCH), 1.62-1.46 (m, 2H, 1x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 1.44-1.36 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.28-1.17 (m, 1H, 1x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 0.90-0.82 (m, 15H, CH_3CH , CH_2CH_3 , $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 0.03 (s, 3H, OSiCH_3), 0.02 (s, 3H, OSiCH_3), ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 168.4 (q, CH_3CO), 143.8 (t, CH_3CCH), 127.2 (q, CH_3CCH), 77.2 (t, CHOTBS), 63.4 (s, CH_2O), 39.2 (s, NHCH_2), 37.5 (s, CH_2CH_3), 31.0 (s, 1x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 26.8 (t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 26.0 (s, CCHCH_2), 25.4 (p, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 23.3 (p, CH_3CO), 18.2 (q, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 15.0 (p, CH_3CH), 12.4 (p, CH_3CCH), 10.1 (p, CH_2CH_3), -4.3 (p, OSiCH_3), -4.5 (p, OSiCH_3); HRMS (ESI): m/z für $\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{NO}_4\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 422.2703, gefunden 422.2703.

2-Acetamidoethyl-(6*S*,7*R*,*E*)-7-hydroxy-2,6-dimethylnon-2-enoat (157)

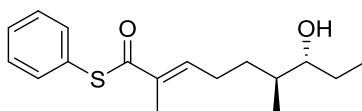
Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus Ester **216** (35 mg, 0.09 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (110 mg, 0.44 mmol, 5.0 Äq.) nach 24 bei 50 °C und säulenchromatographischer Reinigung (CH₂Cl₂:EtOAc / 2:1 → 1:1) Ester **157** (25 mg, 0.09 mmol, quant.) als farbloses Öl erhalten.

R_f (CH₂Cl₂:EtOAc / 1:1): 0.13; $[\alpha]_D^{23} = -7.2$ (c = 0.5, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.78 (dt, $J = 1.4, 7.5$ Hz, 1H, CH₃CCH), 5.96 (bs, 1H, NH), 4.21 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, CH₂O), 3.53 (q, $J = 5.5$ Hz, 2H, NHCH₂), 3.37-3.30 (m, 1H, CHOH), 2.32-2.21 (m, 1H, 1x CCHCH₂), 2.20-2.08 (m, 1H, 1x CCHCH₂), 1.98 (s, 3H, CH₃CO), 1.82 (d, $J = 0.7$ Hz, 3H, CH₃CCH), 1.79 (bs, 1H, OH), 1.70-1.60 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 1.60-1.47 (m, 2H, CH₂CH₂CH, 1 x CH₂CH₃), 1.44-1.33 (m, 1H, 1x CH₂CH₃), 1.33-1.21 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 0.96 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.91 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃CH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 170.4 (q, OCO), 168.3 (q, CH₃CO), 143.5 (t, CH₃CCH), 127.2 (q, CH₃CCH), 77.2 (t, CHOH), 63.3 (s, CH₂O), 39.1 (s, NHCH₂), 38.1 (s, CH₂CH₃), 30.8 (s, CH₂CH₂CH), 26.4 (t, CH₂CH₂CH), 26.4 (s, CCHCH₂), 23.2 (p, CH₃CO), 15.3 (p, CH₃CH), 12.4 (p, CH₃CCH), 10.3 (p, CH₂CH₃); HRMS (ESI): m/z für C₁₅H₂₇NO₄ [M+Na]⁺: berechnet 308.1838, gefunden 308.1842.

S-Phenyl-(6*S*,7*R*,*E*)-7-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnon-2-enthioat (217)

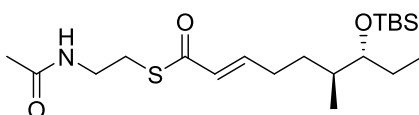
Der allgemeinen Vorschrift für WITTIG-Reaktionen folgend, wurde aus Aldehyd **117** (200 mg, 0.77 mmol, 1.0 Äq.) und Phosphoran **168** (666 mg, 1.55 mmol, 2.0 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) Thioester **217** (242 mg, 0.60 mmol) als farbloses Öl in ausreichender Reinheit erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

HRMS (ESI): m/z für C₂₃H₃₈O₂SSi [M+Na]⁺: berechnet 429.2256, gefunden 429.2260.

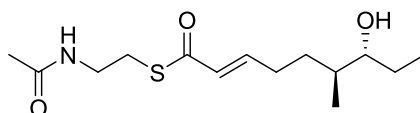
S-Phenyl-(6*S*,7*R*,*E*)-7-hydroxy-2,6-dimethylnon-2-enthioat (155)

Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus Thioester **217** (242 mg, 0.60 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (747 mg, 2.98 mmol, 5.0 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 9:1) Thioester **155** (91 mg, 0.31 mmol, 52% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 9:1): 0.16; $[\alpha]_D^{23} = -12.3$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 7.54-7.47 (m, 2H, Phenyl), 7.11-7.00 (m, 3H, Phenyl), 6.98-6.91 (m, 1H, CH_3CCH), 3.04-2.96 (m, 1H, CHOH), 2.04-1.92 (m, 1H, 1x CCHCH_2), 1.90-1.78 (m, 1H, 1x CCHCH_2), 1.83 (s, 3H, CH_3CCH), 1.47-1.35 (m, 1H, 1x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 1.33-1.10 (m, 3H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$, CH_2CH_3), 1.10-0.98 (m, 1H, 1x $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 0.86 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.72 (d, $J = 6.8$ Hz, CH_3CH); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, C_6D_6): δ [ppm] = 190.6 (q, SCO), 142.2 (t, CH_3CCH), 136.2 (q, CH_3CCH), 135.6 (t, Ph), 129.3 (t, Ph), 129.2 (q, Ph), 76.9 (t, CHOH), 38.5 (t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 30.8 (s, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 26.8 (s, CCHCH_2), 26.7 (s, CH_2CH_3), 15.5 (p, CH_3CH), 12.7 (p, CH_3CCH), 10.5 (p, CH_2CH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: berechnet 293.1575, gefunden 293.1575.

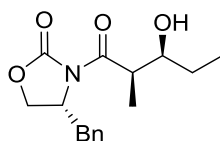
S-(2-Acetamidoethyl)-(6*S*,7*R*,*E*)-7-((*tert*-butyldimethylsilyloxy)-6-methylnon-2-enthioat (218)

Der allgemeinen Vorschrift für WITTIG-Reaktionen folgend, wurde aus Aldehyd **117** (0.50 g, 1.95 mmol, 1.0 Äq.) und Phosphoran **145** (1.15 mg, 2.73 mmol, 1.4 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (CH_2Cl_2 :EtOAc / 1:1) SNAC-Thioester **218** als gelbes Öl in ausreichender Reinheit erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

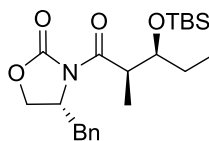
S-(2-Acetamidoethyl)-(6S,7R,E)-7-hydroxy-6-methylnon-2-enthioat (158)

Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus SNAC-Thioester **218** (85 mg, 0.21 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (265 mg, 1.06 mmol, 5.0 Äq.) nach 24 h bei 50 °C und anschließender Reinigung per präparativer HPLC (C-18 ISIS-SP) (H₂O:CH₃CN = 95:5 {10 min}, Gradient H₂O:CH₃CN 95:5 → 0:100 {70 min}, H₂O:CH₃CN = 0:100 {10 min}, 15 mL/min) Produkt **158** (8 mg, 0.04 mmol, 2% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

t_R : 46.5 min; $[\alpha]_D^{22} = +8.9$ (c = 1.5, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 6.96 (t, J = 6.8 Hz, 0.5x COCHCH), 6.92 (t, J = 7.0 Hz, 0.5x COCHCH), 6.17 (t, J = 1.5 Hz, 0.5x COCHCH), 6.13 (t, J = 1.5 Hz, 0.5x COCHCH), 5.85 (bs, 1H, NH), 3.46 (q, J = 6.0 Hz, 2H, NHCH₂), 3.39-3.32 (m, 1H, CHOH), 3.09 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH₂S), 2.39-2.28 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 2.23-2.11 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 1.97 (s, 3H, CH₃CO), 1.75-1.65 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 1.61-1.49 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 1.46-1.22 (m, 3H, 1x CH₂CH₂CH, CH₂CH₃), 0.97 (t, J = 7.3 Hz, 3H, CH₃CH₂), 0.91 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃CH); ¹³C NMR (100 MHz, C₆D₆): δ [ppm] = 190.5 (q, SCO), 146.7 (t, COCHCH), 128.4 (t, COCHCH), 82.7 (t, CHOH), 39.9 (s, NHCH₂), 38.0 (t, CH₂CH₂CH), 30.1 (s, CH₂CH₂CH), 30.0 (s, CH₂CH₂CH), 28.3 (s, CH₂S), 26.3 (s, CH₂CH₃), 23.3 (p, CH₃CO), 15.4 (p, CH₃CH), 10.3 (p, CH₃CH₂); HRMS (ESI): m/z für C₁₄H₂₅NO₃S [M+Na]⁺: berechnet 310.1453, gefunden 310.1455.

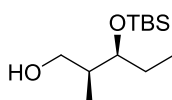
(4R)-4-Benzyl-3[(2R,3S)-(3-hydroxy-2-methylpentanoyl)]oxazolidin-2-on (219)

Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von EVANS-Aldol Produkten folgend, wurde aus dem (4R)-EVANS-Auxiliar (**111b**) (1.0 g, 4.29 mmol, 1.0 Äq.), nBu₂BOTf (1.0 M in CH₂Cl₂, 4.7 mL, 4.72 mmol, 1.1 Äq.), DIPEA (1.1 mL, 6.00 mmol, 1.4 Äq.) und Propionaldehyd (0.40 mL, 5.57 mmol, 2.0 Äq.) Aldol-Produkt **219** erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

(4R)-4-Benzyl-3-[(2R,3S)-3-((tert-butyl)dimethylsilyloxy)-2-methyl-pentanoyl]-oxazolidin-2-on (220)

Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Schätzung folgend, wurde aus Aldol-Produkt **219** (1.25 g, 4.29 mmol, 1.0 Äq.), 2,6-Lutidin (0.75 mL, 6.43 mmol, 1.5 Äq.) und TBSOTf (1.5 mL, 6.43 mmol, 1.5 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) das TBS-geschützte Produkt **220** (1.04 g, 2.56 mmol, 60% über zwei Stufen) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 39:1): 0.16; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.36 -7.24 (m, 3H, Bn), 7.24-7.20 (m, 2H, Bn), 4.63-4.56 (m, 1H, CHBn), 4.19-4.13 (m, 2H, OCH_2CHBn), 3.96 (q, $J = 5.7$ Hz, 1H, $\text{CH}(\text{OTBS})\text{CH}_2$), 3.92-3.84 (m, 1H, $\text{C}(\text{O})\text{CHCH}_3$), 3.30 (dd, $J = 3.2, 13.3$ Hz, 1H, BnCH_2), 2.76 (dd, $J = 3.6, 9.7$ Hz, 1H, BnCH_2), 1.59-1.51 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.20 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3CH), 0.92-0.85 (m, 12H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$, CH_2CH_3), 0.03 (s, 3H, OSiCH_3), -0.01 (s, 3H, OSiCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 175.4 (q, OCO), 153.1 (q, NCOCH), 135.4 (q, Bn), 129.50 (t, Bn), 128.9 (t, Bn), 127.4 (t, Bn), 73.8 (t, $\text{CH}(\text{OTBS})\text{CH}_2$), 66.0 (s, OCH_2CHBn), 55.9 (t, CHBn), 42.3 (t, $\text{C}(\text{O})\text{CHCH}_3$), 37.6 (s, BnCH_2), 28.2 (s, CH_2CH_3), 25.9 (p, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 18.1 (q, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 11.5 (p, CH_3CH), 9.4 (p, CH_2CH_3), -4.1 (p, OSiCH_3), -4.8 (p, OSiCH_3).

(2S,3S)-3-[(tert-Butyl)dimethylsilyloxy]-2-methylpentan-1-ol (221)

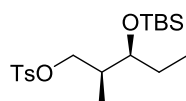
Der allgemeinen Vorschrift zur reduktiven Abspaltung folgend, wurde aus dem TBS-geschütztem Aldol-Produkt **220** (1.03g, 2.54 mmol, 1.0 Äq.) und LiBH_4 (82 mg, 3.81 mmol, 1.5 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (CH_2Cl_2 : Et_2O / 99:1) der primäre Alkohol **221** (0.405 g, 1.74 mmol, 69%) als farbloses Öl erhalten.

R_f (CH_2Cl_2 : Et_2O /99:1): 0.44; $[\alpha]_D^{26} = -3.8$ (c = 1.0, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 3.73-3.66 (m, 2H, OHCH_2), 3.56-3.49 (m, 1H, CHOTBS), 2.60 (dd, $J = 3.8, 6.5$ Hz, 1H, OH), 2.02-1.92 (m, 1H, CH_3CH), 1.51 (quin., $J = 7.3$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 0.93-0.86 (m, 12H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$,

CH_2CH_3), 0.81 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3CH), 0.09 (s, 3H, OSiCH_3), 0.07 (s, 3H, OSiCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 77.3 (t, CHOTBS), 66.2 (s, OHCH_2), 39.3 (t, CH_3CH), 25.9 (s, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 25.2 (s, CH_2CH_3), 18.1 (q, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 11.9 (p, CH_3CH), 10.8 (p, CH_2CH_3), -4.3 (p, OSiCH_3), -4.5 (p, OSiCH_3).

Das Produkt konnte massenspektrometrisch nicht charakterisiert werden.

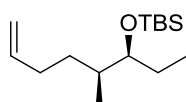
(2S,3S)-3-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-2-methylpentyl-4-methylbenzen-sulfonat (**222**)



Der allgemeinen Vorschrift zur Tosylierung folgend, wurde aus dem primären Alkohol **221** (405 mg, 1.74 mmol, 1.0 Äq.), Pyridin (0.2 mL, 2.61 mmol, 1.5 Äq.) und TsCl (398 mg, 2.09 mmol, 1.2 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) Tosylat **222** (589 mg, 1.52 mmol, 88%) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc/39:1): 0.32; $[\alpha]_D^{24} = -6.8$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 7.78 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, Ts aromatisch), 7.33 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, Ts aromatisch), 4.00 (dd, $J = 6.4$, 9.3 Hz, 1H, 1x TsOCH_2), 3.84 (dd, $J = 7.5$, 9.2 Hz, 1H, 1x TsOCH_2), 3.59-3.54 (m, 1H, CHOTBS), 2.44 (s, 3H, TsMe), 1.97-1.87 (m, 1H, CH_3CH), 1.49-1.29 (m, 2H, CH_2CH_3), 0.84-0.75 (m, 15H, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$, CH_2CH_3 , CH_3CH), 0.00 (s, 3H, OSiCH_3), -0.06 (s, 3H, OSiCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 144.8 (q, Ts aromatisch), 133.2 (q, Ts aromatisch), 129.9 (t, Ts aromatisch), 128.1 (t, Ts aromatisch), 73.3 (t, CHOTBS), 73.2 (s, TsOCH_2), 37.0 (t, CH_3CH), 26.7 (s, CH_2CH_3), 25.9 (p, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 21.7 (p, TsMe), 18.1 (q, $\text{OSiC}(\text{CH}_3)_3$), 10.5 (p, CH_3CH), 10.2 (p, CH_2CH_3), -4.1 (p, OSiCH_3), -4.7 (p, OSiCH_3); HRMS (ESI): m/z für $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{SSi}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 387.2025, gefunden 387.2025.

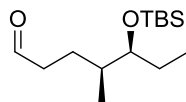
tert-Butyldimethyl[[(3S,4S)-4-methyloct-7-en-3-yl]oxy]silan (**223**)



Der allgemeinen Vorschrift zur Substitution folgend, wurde aus Tosylat **222** (0.589 g, 1.52 mmol, 1.0 Äq.) und Allylmagnesiumbromid (1.0 M in Et_2O , 6.1 mL, 6.09 mmol, 4.0 Äq.)

nach einer kurzen Filtersäule (purer PE) das terminale Alken **223** als farbloses Öl erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

(4S,5S)-5-[(*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy]-4-methylheptanal (164**)**

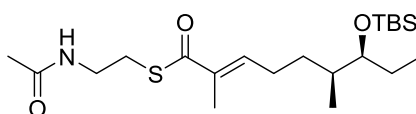


Der allgemeinen Ozonolyse Vorschrift folgend, wurde aus dem terminalen Alken **223** (198 mg, 0.77 mmol, 1.0 Äq.) und PPh₃ (222 mg, 0.85 mmol, 1.1 Äq.) nach säulen-chromatographischer Reinigung (PE:Et₂O / 39:1) Aldehyd **164** (155 mg, 0.60 mmol, 78% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:Et₂O / 39:1): 0.24; $[\alpha]_D^{27} = -17.0$ (c = 0.3, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.76 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H, HCO), 3.48-3.43 (m, 1H, CHOTBS), 2.52-2.35 (m, 2H, COCH₂), 1.88-1.77 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 1.60-1.50 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 1.48-1.36 (m, 3H, CH₂CH₂CH, CH₂CH₃), 0.90-0.81 (m, 15H, OSi(CH₃)₃, CH₂CH₃, CH₃CH), 0.04 (s, 3H, OSiCH₃), 0.02 (s, 3H, OSiCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 203.1 (t, HCO), 77.1 (t, CHOTBS), 42.5 (t, CH₂CH₂CH), 37.2 (s, CH₂CH₂CH), 26.1 (s, COCH₂), 26.0 (p, OSi(CH₃)₃), 25.0 (s, CH₂CH₃), 18.3 (q, OSi(CH₃)₃), 14.3 (p, CH₃CH), 10.5 (p, CH₂CH₃), -4.1 (p, OSiCH₃), -4.3 (p, OSiCH₃).

Das Produkt konnte massenspektrometrisch nicht charakterisiert werden.

(6S,7S,E)-S-(2-Acetamidoethyl)-7-[(*tert*-butyldimethylsilyl)oxy]-2,6-dimethylnon-2-enthioat (224**)**

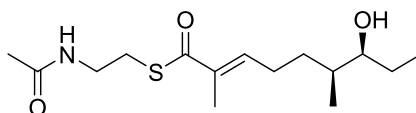


SNAC-Phosphonat **123** (0.246 g, 0.73 mmol, 1.2 Äq.) wurde in trockenem THF (5 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von DBU (0.3 mL, 1.81 mmol, 3.0 Äq.) wurde 30 min bei 0 °C gerührt und anschließend Aldehyd **164** (0.155 g, 0.60 mmol, 1.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 48 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter NH₄Cl-Lösung (5 mL) beendet. THF wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in*

vacuo entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc / 1:1) ergab SNAC-Thioester **224** (90 mg, 0.22 mmol, 36%) als farbloses Öl.

R_f (PE:EtOAc / 1:1): 0.20; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.73 (dt, $J = 1.2, 7.3$ Hz, 1H, CCHCH₂), 6.14 (bs, 1H, NH), 3.41 (m, 3H, NHCH₂, CHOTBS), 3.03 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H, CH₂S), 2.28-2.09 (m, 2H, CH₂CH₂CH), 1.93 (s, 3H, CH₃CO), 1.84 (s, 3H, CH₃CCH), 1.65-1.48 (m, 2H, CH₂CH₂CH), 1.45-1.28 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.26-1.15 (m, 1H, CH₂CH₂CH), 0.85-0.82 (m, 15H, OSiC(CH₃)₃, CH₂CH₃, CH₃CH), 0.01 (s, 3H, OSiCH₃), 0.00 (s, 3H, OSiCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 193.9 (q, SCO), 170.4 (q, CH₃CO), 142.3 (t, CCHCH₂), 135.7 (q, CCHCH₂), 77.0 (t, CHOTBS), 39.8 (s, NHCH₂), 37.3 (s, CH₂CH₂CH), 30.9 (t, CH₂CH₂CH), 28.3 (s, CH₂S), 26.9 (s, CH₂CH₂CH), 25.9 (p, OSiC(CH₃)₃), 25.8 (s, CH₂CH₃), 23.2 (p, CH₃CO), 18.1 (q, OSiC(CH₃)₃), 14.4 (p, CH₃CH), 12.4 (p, CH₃CCH), 10.4 (p, CH₂CH₃), -4.3 (p, OSiCH₃), -4.4 (p, OSiCH₃).

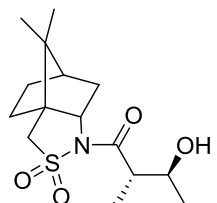
(6R,7R,E)-S-(2-Acetamidoethyl)-7-hydroxy-2,6-dimethylnon-2-enthioat (154)



Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus SNAC-Thioester **224** (90 mg, 0.22 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (272 mg, 1.08 mmol, 5.0 Äq.) nach 24 h bei 50 °C und säulenchromatographischer Reinigung (CH_2Cl_2 :EtOAc / 1:1) SNAC-Thioester **154** (17 mg, 0.06 mmol, 26%) als farbloses Öl erhalten.

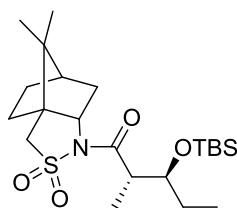
R_f (CH_2Cl_2 :EtOAc / 1:1): 0.07; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 6.75 (td, $J = 7.3$ Hz, 1H, CCHCH₂), 6.04 (bs, 1H, NH), 3.46-3.38 (m, 3H, CHOH, NHCH₂), 3.04 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH₂S), 2.33-2.14 (m, 2H, CH₂CH₂CH), 1.94 (s, 3H, CH₃CO), 1.86 (s, 3H, CH₃CCH), 1.66-1.29 (m, 5H, CH₂CH₂CH, CH₂CH₂CH, CH₂CH₃), 0.94 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.88 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃CH); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 194.0 (q, SCO), 170.3 (q, CH₃CO), 142.2 (t, CCHCH₂), 135.6 (q, CCHCH₂), 76.4 (t, CHOH), 39.9 (s, NHCH₂), 37.6 (s, CH₂CH₂CH), 32.1 (t, CH₂CH₂CH), 29.7 (s, CH₂S), 28.5 (s, CH₂CH₂CH), 26.7 (s, CH₂CH₃), 23.3 (p, CH₃CO), 13.4 (p, CH₃CCH), 12.5 (p, CH₃CCH), 10.7 (p, CH₂CH₃); HRMS (ESI): m/z für $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_3\text{S}$ [$\text{M}+\text{Na}$]⁺: berechnet 324.1609, gefunden 324.1609.

(2S,3S)-1-((3aR,6R)-8,8-Dimethyl-2,2-dioxidotetrahydro-3H-3a,6-methano-benzo[c]-isothiazol-1(4H)-yl)-3-hydroxy-2-methylpentan-1-on (225)



Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von MUKUIYAMA-Aldol-Produkten folgend, wurde aus dem propionierten OPPOLZER-Auxiliar (**110b**) (5.0 g, 18.39 mmol, 1.0 Äq.), DIPEA (4.7 mL, 27.59 mmol, 1.5 Äq.), TMSOTf (5.9 mL, 33.10 mmol, 1.8 Äq.), TiCl₄ (1.0 M in CH₂Cl₂, 27.6 mL, 27.59 mmol, 1.8 Äq.) und Propionaldehyd (2.0 mL, 27.59 mmol, 1.5 Äq.) das Aldol-Produkt **225** erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

(2S,3S)-3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-1-((3aR,6R)-8,8-dimethyl-2,2-dioxidotetrahydro-3H-3a,6-methanobenzo[c]isothiazol-1(4H)-yl)-2-methylpentan-1-on (226)

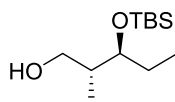


Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Schätzung folgend, wurde aus Aldol-Produkt **225** (6.06 g, 18.39 mmol, 1.0 Äq.), 2,6-Lutidin (3.2 mL, 27.59 mmol, 1.5 Äq.) und TBSOTf (6.3 mL, 27.59 mmol, 1.5 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) das TBS-geschützte Aldol-Produkt **226** (5.89 g, 13.29 mmol, 72% über zwei Stufen, *d.r.* > 10:1) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 39:1): 0.37; $[\alpha]_D^{23} = -18.1$ ($c = 1.0$, CH₂Cl₂); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.09-4.03 (m, 1H, CHOTBS), 3.88 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, CCHN), 3.51-3.39 (m, 2H, CH₂SO₂), 3.29 (quin, $J = 6.6$ Hz, 1H, CH₃CH), 2.12-1.96 (m, 2H, CHCH₂CH), 1.95-1.77 (m, 3H, CH₂CHCH₂, CH₂CH₂CH), 1.53-1.24 (m, 4H, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH), 1.15 (s, 3H, CCH₃) 1.11 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH₃CH), 0.96 (s, 3H, CCH₃), 0.93-0.84 (m, 14H, OSiC(CH₃)₃, CH₂CH₃), 0.09 (s, 3H, OSiCH₃) 0.07 (s, 3H, OSiCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 174.3 (q, NCO), 74.0 (t, CHOTBS), 65.4 (t, CCHN), 53.2 (t, CH₂SO₂), 48.2 (q, C(CH₃)₂), 47.8 (q, CCH₂SO₂), 46.0 (t, CH₃CH), 44.7 (t, CH₂CHCH₂), 38.6 (s, CHCH₂CH), 32.9 (s, CH₂CH₂CH), 26.5 (s, CH₂CH₂CH), 26.0 (p, OSiC(CH₃)₃),

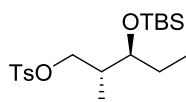
25.1 (s, CH₂CH₃), 20.8 (p, CCH₃), 19.9 (p, CCH₃), 18.2 (q, OSiC(CH₃)₃), 10.8 (p, CH₃CH), 9.3 (p, CH₂CH₃), -4.3 (p, OSiCH₃), -5.0 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₂₂H₄₁NO₄SSi [M+Na]⁺: berechnet 466.2421, gefunden 466.2423.

(2R,3S)-3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylpentan-1-ol (227)



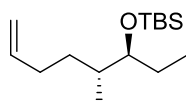
Der allgemeinen Vorschrift zur reduktiven Abspaltung folgend, wurde aus dem TBS-geschützten Aldol-Produkt **226** (5.89 g, 13.29 mmol, 1.0 Äq.) und LiBH₄ (0.430 g, 19.94 mmol, 1.5 Äq.) Alkohol **227** erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

(2R,3S)-3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylpentyl-4-methylbenzensulfonat (228)

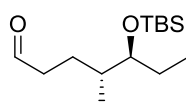


Der allgemeinen Vorschrift zur Tosylierung folgend, wurde aus dem primären Alkohol **227** (4.88 mg, 20.99 mmol, 1.0 Äq.), Pyridin (2.5 mL, 31.49 mmol, 1.5 Äq.) und TsCl (4.40 g, 23.09 mmol, 1.1 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) Tosylat **228** (2.65 g, 6.85 mmol, 33% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 39:1): 0.28; $[\alpha]_D^{22} = +14.6$ (c = 1.0, CH₂Cl₂); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.81-7.76 (m, 2H, Ts aromatisch), 7.36-7.31 (m, 2H, Ts aromatisch.), 4.07 (dd, $J = 4.9, 9.3$ Hz, 1H, 1x TsOCH₂), 3.86 (dd, $J = 7.3, 9.3$ Hz, 1H, 1x TsOCH₂), 3.49 (q, $J = 5.5$ Hz, 1H, CHOTBS), 2.44 (s, 3H, TsMe), 2.00-1.88 (m, 1H, CH₃CH), 1.49-1.31 (m, 2H, CH₂CH₃), 0.85 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃CH), 0.83-0.78 (m, 12H, CH₃CH₂, OSiC(CH₃)₃), 0.00 (s, 3H, OSiCH₃), -0.04 (s, 3H, OSiCH₃); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 144.6 (q, Ts aromatisch), 133.1 (q, Ts aromatisch), 129.8 (t, Ts aromatisch), 128.0 (t, Ts aromatisch), 74.1 (t, CHOTBS), 72.8 (s, TsOCH₂), 37.0 (t, CH₃CH), 26.3 (s, CH₂CH₃), 25.8 (p, OSiC(CH₃)₃), 21.7 (p, TsMe), 18.0 (q, OSiC(CH₃)₃), 13.5 (p, CH₃CH), 8.7 (p, CH₃CH₂), -4.3 (p, OSiCH₃), -4.8 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₁₉H₃₄O₄SSi [M+Na]⁺: berechnet 409.1845, gefunden 409.1848.

tert-Butyldimethyl(((3S,4R)-4-methyloct-7-en-3-yl)oxy)silan (229)

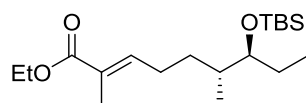
Der allgemeinen Vorschrift zur Substitution folgend, wurde aus Tosylat **228** (2.65 g, 6.85 mmol, 1.0 Äq.) und Allylmagnesiumbromid (1.0 M in Et₂O, 27.4 mL, 27.4 mmol, 4.0 Äq.) nach einer kurzen Filtersäule (purer PE) das terminale Alken **229** als farbloses Öl erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

(4R,5S)-5-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-4-methylheptanal (163)

Der allgemeinen Ozonolyse Vorschrift folgend, wurde aus dem terminalen Alken **229** (2.14 g, 8.18 mmol, 1.0 Äq.) und PPh₃ (2.36 g, 9.00 mmol, 1.1 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) Aldehyd **163** (1.92 g, 7.43 mmol, 91% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 39:1): 0.60; $[\alpha]_D^{27} = -34.6$ ($c = 1.0$, CH₂Cl₂); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.76 (t, $J = 1.8$ Hz, 1H, HCO), 3.46-3.40 (m, 1H, CHOTBS), 2.55-2.43 (m, 1H, 1x CH(O)CH₂), 2.42-2.32 (m, 1H, 1x CH(O)CH₂), 1.81-1.71 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 1.63-1.52 (m, 1H, 1x CH₂CH₃), 1.47-1.32 (m, 3H, CHCH₃, 1x CH₂CH₃, 1x CH₂CH₂CH), 0.90-0.82 (m, 15H, CH₃CH, CH₂CH₃, OSi(CH₃)₃), 0.03 (s, 3H, OSiCH₃), 0.02 (s, 3H, OSiCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 203.0 (t, HCO), 77.2 (s, CHOTBS), 42.2 (t, CHCH₃), 37.1 (s, CH₂CH₂CH), 26.0 (p, OSi(CH₃)₃), 25.6 (s, CH(O)CH₂), 24.3 (s, CH₂CH₃), 18.2 (q, OSi(CH₃)₃), 15.0 (p, CH₃CH), 9.9 (p, CH₂CH₃), -4.3 (p, OSiCH₃), -4.5 (p, OSiCH₃).

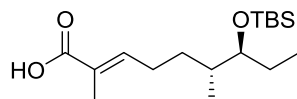
Das Produkt konnte massenspektrometrisch nicht charakterisiert werden.

Ethyl-(6R,7S,E)-7-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnon-2-enoat (230)

Der allgemeinen Vorschrift für WITTIG-Reaktionen folgend, wurde aus Aldehyd **163** (1.91 g, 7.39 mmol, 1.0 Äq.) und Phosphoran **147** (6.69 g, 18.46 mmol, 2.5 Äq.) nach

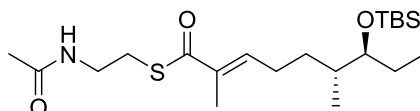
säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) Ester **230** (1.88 g, 5.48 mmol, 30%) als farbloses Öl erhalten.

(6R,7S,E)-7-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnon-2-ensäure (231)



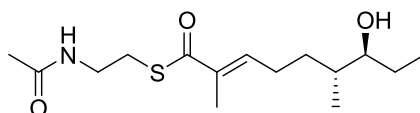
Der allgemeinen Vorschrift zur Verseifung von Ethylestern folgend, wurde aus Ethylester **230** (1.88mg, 5.48 mmol, 1.0 Äq.) und LiOH·H₂O (1.15 g, 27.41 mmol, 5.0 Äq.) die freie Säure **231** erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

S-(2-Acetamidoethyl)-(6R,7S,E)-7-((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)-2,6-dimethylnon-2-enthioat (232)



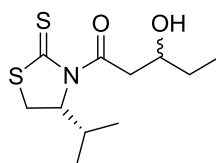
Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von *N*-Acetylcysteaminestern folgend, wurde aus der freien Säure **231** (1.65 g, 5.49 mmol, 1.0 Äq.), *N*-Acetylcysteamin (0.72 g, 6.05 mmol, 1.1 Äq.), EDC·HCl (1.159 g, 6.05 mmol, 1.1 Äq.) und 4-DMAP (0.134 g, 0.02 mmol, 0.22 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 2:1 → 1:1) SNAC-Thioester **232** (1.05 g, 2.53 mmol, 46% über zwei Stufen) erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 1:1): 0.35; $[\alpha]_D^{27} = -32.6$ ($c = 1.0$, CH₂Cl₂); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.76 (dt, $J = 1.0, 7.3$ Hz, 1H, CCHCH₂), 5.88 (bs, 1H, NH), 3.48-3.41 (m, 3H, NHCH₂, CHOTBS), 3.07 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, CH₂S), 2.35-2.22 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 2.21-.208 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 1.97 (s, 3H, CH₃CO), 1.88 (d, $J = 0.7$ Hz, 3H, CH₃CCH), 1.64-1.48 (m, 2H, 1x CH₂CH₂CH, 1x CH₂CH₃), 1.46-1.36 (m, 2H, CH₂CH₂CH, 1x CH₂CH₃), 1.31-1.19 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 0.91-0.82 (m, 15H, OSi(CH₃)₃, CH₂CH₃, CH₃CH), 0.04 (s, 3H, OSiCH₃), 0.03 (s, 3H, OSiCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 194.1 (q, SCO), 170.4 (q, CH₃CO), 142.5 (t, CCHCH₂), 135.8 (q, CCHCH₂), 40.0 (s, NHCH₂), 37.5 (t, CH₂CH₂CH), 30.9 (s, CH₂CH₂CH), 28.4 (s, CH₂S), 26.9 (s, CH₂CH₂CH), 26.0 (p, OSi(CH₃)₃), 25.4 (s, CH₂CH₃), 23.3 (p, CH₃CO), 18.2 (q, OSi(CH₃)₃), 15.0 (p, CH₃CH), 12.5 (p, CH₃CCH), 10.2 (p, CH₂CH₃), -4.3 (p, OSiCH₃), -4.4 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₂₁H₄₁NO₃SSi [M+Na]⁺: berechnet 438.2474, gefunden 438.2469.

S-(2-Acetamidoethyl)-(6R,7S,E)-7-hydroxy-2,6-dimethylnon-2-enthioat (153)

Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus SNAC-Thioester **232** (1.05 g, 2.53 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (3.173 g, 12.63 mmol, 5.0 Äq.) nach 24 h bei 50 °C und säulenchromatographischer Reinigung (CH₂Cl₂:EtOAc / 1:1) SNAC-Thioester **153** (0.621 g, 2.06 mmol, 81%) als farbloses Öl erhalten.

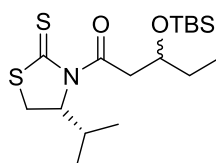
R_f (CH₂Cl₂:EtOAc / 1:1): 0.15; $[\alpha]_D^{23} = +11.8$ ($c = 1.0$, CH₂Cl₂); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.79 (dt, $J = 1.4, 7.3$ Hz, 1H, CCHCH₂), 5.88 (bs, 1H, NH), 3.47 (q, $J = 6.3$ Hz, 2H, NHCH₂), 3.42-3.36 (m, 1H, CHOH), 3.09 (t, $J = 6.3$ Hz, CH₂S), 2.40-2.29 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 2.26-2.14 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 1.99 (s, 3H, CH₃CO), 1.90 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H, CH₃CCH), 1.76-1.65 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 1.64-1.50 (m, 1H, 1x CH₂CH₃), 1.49-1.26 (m, 3H, 1x CH₂CH₂CH, CH₂CH₂CH, 1x CH₂CH₃), 0.99 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH₂CH₃), 0.96 (d, $J = 6.8$ Hz, CH₃CH); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 194.0 (q, SCO), 170.3 (q, CH₃CO), 142.2 (t, CCHCH₂), 135.9 (q, CCHCH₂), 77.3 (t, CHOH), 39.9 (s, NHCH₂), 38.2 (t, CH₂CH₂CH), 30.7 (s, CH₂CH₂CH), 28.5 (s, CH₂S), 26.6 (s, CH₂CH₂CH), 26.6 (s, CH₂CH₃), 23.3 (p, CH₃CO), 15.4 (p, CH₃CCH), 12.5 (p, CH₃CCH), 10.3 (p, CH₂CH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₁₅H₂₇NO₃S [M+Na]⁺: berechnet 324.1609, gefunden 324.1607.

3-Hydroxy-1-((S)-4-isopropyl-2-thioxothiazolidin-3-yl)pentan-1-on (233a/b)

Acetyliertes NAGAO-Auxliar **142** (2.0 g, 9.84 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem CH₂Cl₂ (50 mL) gelöst und auf -40 °C abgekühlt. TiCl₄ (1.0 M in CH₂Cl₂, 9.5 mL, 9.48 mmol, 1.0 Äq.) und DIPEA (2.0 mL, 11.81 mmol, 1.2 Äq.) wurden nacheinander langsam hinzugegeben und die Reaktionslösung 2 h bei -40 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktion auf -78 °C abgekühlt und Propionaldehyd (1.1 mL, 14.76 mmol, 1.5 Äq.) über 30 min hinzugetropft. Die Reaktion wurde nach 30 min bei -78 °C durch Zugabe von gesättigter NH₄Cl-Lösung (60 mL) und Phosphatpuffer (pH 7.4, 40 mL) beendet, auf 0 °C erwärmt und 30 min gerührt. Die

wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das erhaltene Aldol-Produkt ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

**3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy-1-((*S*)-4-isopropyl-2-thioxothiazolidin-3-yl)pentan-1-on
(234a/b)**



Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Schätzung folgend, wurde aus Aldol-Produkt **233a/b** (2.57 g, 9.84 mmol, 1.0 Äq.), 2,6-Lutidin (1.4 mL, 14.76 mmol, 1.5 Äq.) und TBSOTf (4.2 mL, 14.76 mmol, 1.5 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 9:1) das TBS-geschützte Aldol-Produkt **234a/b** (Diastereomerenmischung 2.04 g, 5.38 mmol, 55% über zwei Stufen) als farbloser Feststoff erhalten.

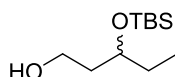
Zur Charakterisierung der erhaltenen Diastereomere wurde eine kleine Menge des erhaltenen Produkts erneut säulenchromatographisch (PE:EtOAc / 9:1) gereinigt. Die nachfolgenden Reaktionen wurden mit dem Diastereomerenmischung durchgeführt.

Diastereomer 1: R_f (PE:EtOAc / 9:1): 0.62; $[\alpha]_D^{23} = -209.8$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.08-5.02 (m, 1H, NCH), 4.31-4.21 (m, 1H, CHOTBS), 3.57 (dd, $J = 8.0$, 16.9 Hz, 1H, 1x C(O)CH_2), 3.47 (dd, $J = 7.7$, 11.4 Hz, 1H, 1x CH_2S), 3.11 (dd, $J = 3.9$, 16.9 Hz, 1H, 1x C(O)CH_2), 3.04-2.99 (m, 1H, 1x CH_2S), 2.44-2.33 (m, 1H, CH-Isopropyl), 1.60-1.47 (m, 2H, CH_2CH_3), 1.06 (d, $J = 7.8$ Hz, 3H, Isopropyl), 0.97 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, Isopropyl), 0.93-0.80 (m, 12H, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$, CH_2CH_3), 0.07 (s, 3H, OSiCH_3), 0.03 (s, 3H, OSiCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 202.9 (q, SCS), 172.3 (q, NCO), 71.7 (t, NCH), 70.3 (q, CHOTBS), 44.9 (s, C(O)CH_2), 31.0 (s, CH_2S), 30.8 (t, CH-Isopropyl), 30.4 (s, CH_2CH_3), 25.9 (p, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 19.2 (p, Isopropyl), 18.1 (q, $\text{OSi}(\text{CH}_3)_3$), 17.9 (p, Isopropyl), 9.3 (p, CH_2CH_3), -4.5 (p, OSiCH_3), -4.6 (p, OSiCH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{NO}_2\text{S}_2\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: berechnet 398.1620, gefunden 398.1620.

Diastereomer 2: R_f (PE:EtOAc / 9:1): 0.52; $[\alpha]_D^{23} = -220.3$ ($c = 1.3$, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.16-5.09 (m, 1H, NCH), 4.25-4.17 (m, 1H, CHOTBS), 3.52 (dd, $J = 5.6$,

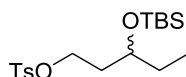
16.6 Hz, 1H, 1x C(O)CH₂), 3.47 (dd, *J* = 7.3, 10.8 Hz, 1H, 1x CH₂S), 3.37 (dd, *J* = 6.5, 16.7 Hz, 1H, 1x C(O)CH₂), 3.04-2.98 (m, 1H, 1x CH₂S), 2.44-2.30 (m, 1H, CH-Isopropyl), 1.62-1.40 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.05 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, Isopropyl), 0.97 (d, *J* = 7.9 Hz, 3H, Isopropyl), 0.94-0.83 (m, 12H, OSiC(CH₃)₃, CH₂CH₃), 0.07 (s, 3H, OSiCH₃), 0.05 (s, 3H, OSiCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 202.7 (q, SCS), 171.9 (q, NCO), 71.7 (t, NCH), 70.0 (t, CHOTBS), 45.5 (s, C(O)CH₂), 30.9 (s, CH₂S), 30.3 (t, CH-Isopropyl), 30.2 (s, CH₂CH₃), 25.9 (p, OSiC(CH₃)₃), 19.2 (p, Isopropyl), 18.1 (q, OSiC(CH₃)₃), 17.7 (p, Isopropyl), 9.3 (p, CH₂CH₃), -4.5 (p, OSiCH₃), -4.6 (p, OSiCH₃); HRMS (ESI): *m/z* für C₁₇H₃₃NO₂S₂Si [M+Na]⁺: berechnet 398.1620, gefunden 398.1620.

3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)pentan-1-ol (235)



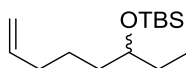
Der allgemeinen Vorschrift zur reduktiven Abspaltung folgend, wurde aus dem TBS-geschützten Aldol-Produkt **234a/b** (0.646 g, 1.46 mmol, 1.0 Äq.) und LiBH₄ (47 mg, 2.19 mmol, 1.5 Äq.) Alkohol **235** erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)pentyl-4-methylbenzensulfonat (236)

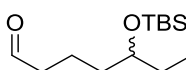


Der allgemeinen Vorschrift zur Tosylierung folgend, wurde aus dem primären Alkohol **235** (0.362 g, 1.66 mmol, 1.0 Äq.), Pyridin (0.2 mL, 2.49 mmol, 1.5 Äq.) und TsCl (0.347 g, 1.83 mmol, 1.1 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1 → 19:1) Tosylat **236** (0.344 g, 0.92 mmol, 56% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

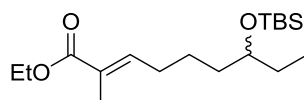
R_f (PE:EtOAc / 19:1): 0.30; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.81-7.77 (m, 2H, Ts aromatisch), 7.36-7.31 (m, 2H, Ts aromatisch), 4.14-4.07 (m, 2H, TsOCH₂), 3.73-3.65 (m, 1H, CHOTBS), 2.45 (s, 3H, TsMe), 1.84-1.65 (m, 2H, CH₂CH₂CH), 1.47-1.37 (m, 2H, CH₂CH₃), 0.85-0.78 (m, 12H, OSiC(CH₃)₃, CH₂CH₃), 0.01 (s, 3H, OSiCH₃), -0.04 (s, 3H, OSiCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 144.7 (q, Ts aromatisch), 129.9 (t, Ts aromatisch), 128.0 (t, Ts aromatisch), 69.6 (t, CHOTBS), 68.0 (s, TsOCH₂), 35.4 (s, CH₂CH₂CH), 30.0 (s, CH₂CH₃), 25.8 (p, OSiC(CH₃)₃), 21.7 (p, Ts-Me), 18.0 (q, OSiC(CH₃)₃), 9.2 (p, CH₂CH₃), -4.4 (p, OSiCH₃), -4.8 (p, OSiCH₃); HRMS (ESI): *m/z* für C₁₈H₃₂OSSi [M+H]⁺: berechnet 373.1869, gefunden 373.1868.

***tert*-Butyldimethyl(oct-7-en-3-yloxy)silan (237)**

Der allgemeinen Vorschrift zur Substitution folgend, wurde aus Tosylat **236** (0.473 g, 1.27 mmol, 1.0 Äq.) und Allylmagnesiumbromid (1.0 M in Et₂O, 5.1 mL, 5.08 mmol, 4.0 Äq.) nach einer kurzen Filtersäule (purer PE) das terminale Alken **237** als farbloses Öl erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

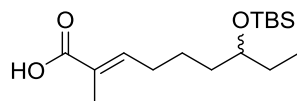
5-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)heptanal (166)

Der allgemeinen Ozonolyse Vorschrift folgend, wurde aus dem terminalen Alken **237** (0.243 g, 1.00 mmol, 1.0 Äq.) und PPh₃ (0.289 g, 1.10 mmol, 1.1 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) Aldehyd **166** (0.183 g, 0.75 mmol) als farbloses Öl in hinreichender Reinheit erhalten.

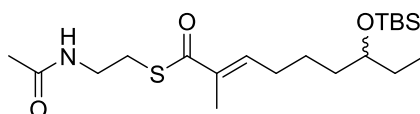
Ethyl-(*E*)-7-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylnon-2-enoat (238)

Der allgemeinen Vorschrift für WITTIG-Reaktionen folgend, wurde aus Aldehyd **166** (183 mg, 0.75 mmol, 1.0 Äq.) und Phosphoran **147** (678 mg, 1.87 mmol, 2.5 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 39:1) Ester **238** (217 mg, 0.66 mmol, 52% über drei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 39:1): 0.38; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.78-6.72 (m, 1H, CCHCH₂), 4.18 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₃CH₂O), 3.62-3.55 (m, 1H, CHOTBS), 2.21-2.12 (m, 2H, CH₂CH₂CH), 1.82 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H, CH₃CCH), 1.54-1.39 (m, 6H, CH₂CH₂CH, CH₂CH₂CH, CH₂CH₃), 1.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃CH₂O), 0.91-0.82 (m, 12H, CH₂CH₃, OSiC(CH₃)₃), 0.05-0.02 (m, 6H, OSiCH₃); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 168.3 (q, OCO), 142.3 (t, CCHCH₂), 127.9 (q, CCHCH₂), 73.2 (t, CHOTBS), 60.4 (s, CH₃CH₂O), 36.2 (s, CH₂CH₂CH), 29.8 (s, CH₂CH₂CH), 28.9 (s, CH₂CH₂CH), 26.0 (p, OSiC(CH₃)₃), 24.3 (s, CH₂CH₃), 18.2 (q, OSiC(CH₃)₃), 14.3 (p, CH₃CH₂O), 12.4 (p, CH₃CCH), 9.7 (p, CH₂CH₃), -4.4 (p, OSiCH₃), -4.4 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): *m/z* für C₁₈H₃₆O₃Si [M+Na]⁺: berechnet 351.2331, gefunden 351.2331.

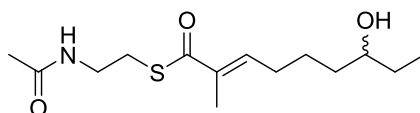
(E)-7-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylnon-2-ensäure (239)

Der allgemeinen Vorschrift zur Verseifung von Ethylestern folgend, wurde aus Ethylester **238** (217 mg, 0.66 mmol, 1.0 Äq.) und LiOH·H₂O (138 mg, 3.30 mmol, 5.0 Äq.) die freie Säure **239** erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-7-((tert-butyl(dimethyl)silyloxy)non-2-enthioat (240)

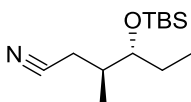
Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von *N*-Acetylcysteaminestern folgend, wurde aus der freien Säure **239** (0.198 g, 0.66 mmol, 1.0 Äq.), *N*-Acetylcysteamin (87 mg, 0.73 mmol, 1.1 Äq.), EDC·HCl (140 mg, 0.73 mmol, 1.1 Äq.) und 4-DMAP (17 mg, 0.15 mmol, 0.22 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 1:1) SNAC-Thioester **240** (128 mg, 0.32 mmol, 48% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 1:1): 0.19; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.79-6.73 (m, 1H, CCHCH₂), 5.87 (bs, 1H, NH), 3.63-3.56 (m, 1H, CHOTBS), 3.45 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H, NHCH₂), 3.07 (t, *J* = 6.4 Hz, CH₂S), 2.25-2.17 (m, 2H, CH₂CH₂CH), 1.96 (s, 3H, CH₃CO), 1.87 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H, CH₃CCH), 1.63-1.40 (m, 6H, CH₂CH₂CH, CH₂CH₂CH, CH₂CH₃), 0.90-0.78 (m, 12H, CH₂CH₃, OSiC(CH₃)₃), 0.05-0.03 (m, 6H, 2x OSiCH₃); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 194.1 (q, SCO), 170.3 (q, CH₃CO), 142.1 (t, CCHCH₂), 135.9 (q, CCHCH₂), 73.1 (t, CHOTBS), 39.9 (s, NHCH₂), 36.1 (s, CH₂CH₂CH), 29.7 (s, CH₂CH₂CH), 29.0 (s, CH₂CH₂CH), 28.5 (s, CH₂S), 26.0 (p, OSiC(CH₃)₃), 24.2 (s, CH₂CH₃), 23.3 (p, CH₃CO), 18.2 (q, OSiC(CH₃)₃), 12.5 (p, CH₃CCH), 9.7 (p, CH₂CH₃), -4.4 (p, OSiCH₃), -4.4 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): *m/z* für C₂₀H₃₉NO₃SSi [M+H]⁺: berechnet 402.2498, gefunden 402.2499.

S-(2-Acetamidoethyl)-(E)-7-hydroxy-2-methylnon-2-enthioat (159)

Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus SNAC-Thioester **240** (128 mg, 0.32 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (400 mg, 1.60 mmol, 5.0 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (CH₂Cl₂:EtOAc / 1:1) SNAC-Thioester **159** (70 mg, 0.24 mmol, 76%) als farbloses Öl erhalten.

R_f (CH₂Cl₂:EtOAc / 1:1): 0.12; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.75 (dt, *J* = 1.0, 6.6 Hz, 1H, CCHCH₂), 6.05 (bs, 1H, NH), 3.56-3.48 (m, 1H, CHOH), 3.42 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H, NHCH₂), 3.04 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H, CH₂S), 2.29-2.15 (m, 2H, CH₂CH₂CH), 1.95 (s, 3H, CH₃CO), 1.85 (s, 3H, CH₃CCH), 1.71-1.58 (m, 1H, 1x CH₂CH₃), 1.58-1.35 (m, 5H, CH₂CH₂CH, CH₂CH₂CH, 1x CH₂CH₃), 0.93 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₂CH₃); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 194.0 (q, SCO), 170.4 (q, CH₃CO), 141.8 (t, CCHCH₂), 136.0 (q, CCHCH₂), 72.9 (t, CHOH), 39.8 (s, NHCH₂), 36.5 (s, CH₂CH₂CH), 30.3 (s, CH₂CH₂CH), 28.8 (s, CH₂S), 28.4 (s, CH₂CH₂CH), 24.7 (s, CH₂CH₃), 23.2 (p, CH₃CO), 12.5 (p, CH₃CCH), 9.9 (p, CH₂CH₃); **HRMS** (ESI): *m/z* für C₁₄H₂₅NO₃S [M+Na]⁺: berechnet 310.1453, gefunden 310.1448.

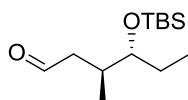
(3S,4R)-4-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-3-methylhexannitril (169)

Tosylat **115** (100 mg, 0.26 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem DMSO (4 mL) gelöst und NaCN (51 mg, 1.03 mmol, 4.0 Äq.) hinzugegeben. Nach 3.5 h Rühren bei 60 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von H₂O (50 mL) beendet. Die wässrige Phase wurde mit EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc / 20:1) ergab Nitril **169** (52 mg, 0.216 mmol, 84%) als farbloses Öl.

R_f (PE:EtOAc / 15:1): 0.45; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 3.51 (q, *J* = 5.5 Hz, 1H, CHOTBS), 2.42 (dd, *J* = 4.8, 16.7 Hz, 1H, 1x NCCH₂), 2.28 (dd, *J* = 8.2, 16.7 Hz, 1H, 1x NCCH₂), 2.04-1.93 (m, 1H, CHCH₃), 1.57-1.41 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.06 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃CH), 0.92-0.84 (m, 12H, CH₂CH₃, OSi(CH₃)₃), 0.07 (s, 6H, OSiCH₃); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] =

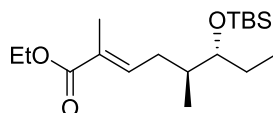
119.6 (q, NCCH₂), 75.5 (t, CHOTBS), 34.2 (t, CHCH₃), 26.6 (s, CH₂CH₃), 25.9 (p, OSiC(CH₃)₃), 20.0 (s, NCCH₂), 18.1 (q, OSiC(CH₃)₃), 16.5 (p, CH₃CH), 8.4 (p, CH₂CH₃), -4.2 (p, OSiCH₃), -4.7 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₁₃H₂₇NOSi [M+Na]⁺: berechnet 264.1760, gefunden 264.1760.

(3S,4R)-4-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-3-methylhexanal (241)



Nitril **169** (94 mg, 0.39 mmol, 1.0 Äq.) wurde in trockenem CH₂Cl₂ (4 mL) gelöst und auf -78 °C abgekühlt. DIBAL-H (1.0 M in Hexan, 1.9 mL, 1.94 mmol, 5.0 Äq.) wurde langsam hinzugeben und die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt. Die Reaktion wurde nach 30 min durch Zugabe von gesättigter Na,K-Tatrat-Lösung (10 mL) beendet und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Phase wurde mit Et₂O extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der erhaltene Aldehyd **241** wurde direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ethyl-(5S,6R,E)-6-((tert-butyl dimethylsilyl)oxy)-2,5-dimethyloct-2-enoat (170)

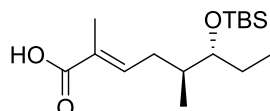


Der allgemeinen Vorschrift für WITTIG-Reaktionen folgend, wurde aus Aldehyd **241** (95 mg, 0.39 mmol, 1.0 Äq.) und Phosphoran **147** (352 mg, 0.97 mmol, 2.5 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 1:0 → 24:1) Ester **170** (57 mg, 0.17 mmol, 45% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 9:1): 0.6; **[α]_D²²** = -5.4 (c = 1.0, CH₂Cl₂); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.82-6.76 (m, 1H, CCHCH₂), 4.19 (q, J = 7.2 Hz, 2H, CH₃CH₂O), 3.45 (q, J = 5.4 Hz, 1H, CHOTBS), 2.33-2.23 (m, 1H, 1x CCHCH₂), 2.01-1.91 (m, 1H, 1x CCHCH₂), 1.82 (d, J = 1.0 Hz, 3H, CH₃CCH), 1.80-1.69 (m, 1H, CHCH₃), 1.51-1.40 (m, 2H, CH₂CH₃), 1.30 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃CH₂O), 0.91-0.89 (m, 15H, CH₃CH, CH₂CH₃, OSiC(CH₃)₃), 0.05 (s, 3H, OSiCH₃), 0.04 (s, 3H, OSiCH₃); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 168.3 (q, OCO), 141.8 (t, CCHCH₂), 128.3 (q, CCHCH₂), 77.3 (t, CHOTBS), 60.4 (s, CH₃CH₂O), 37.6 (t, CHCH₃), 31.4 (s, CCHCH₂), 26.0 (p, OSiC(CH₃)₃), 18.2 (q, OSiC(CH₃)₃), 15.6 (p, CH₃CH), 14.4 (p, CH₃CH₂O), 12.5 (p, CH₃CCH), 9.6 (p,

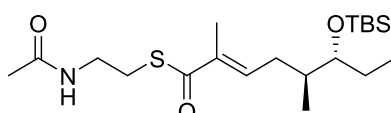
CH₂CH₃), -4.2 (p, OSiCH₃), -4.5 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₁₈H₃₆O₃Si [M+Na]⁺: berechnet 351.2331, gefunden 351.2327.

(5*S*,6*R*,*E*)-6-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-2,5-dimethyloct-2-ensäure (242)



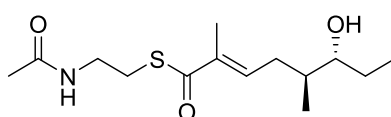
Der allgemeinen Vorschrift zur Verseifung von Ethylestern folgend, wurde aus Ethylester **170** (57 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äq.) und LiOH·H₂O (37 mg, 0.87 mmol, 5.0 Äq.) die freie Säure **242** erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

S-(2-Acetamidoethyl)-(5*S*,6*R*,*E*)-6-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2,5-dimethyloct-2-enthioat (243)



Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von *N*-Acetylcysteaminstern folgend, wurde aus der freien Säure **242** (60 mg, 0.20 mmol, 1.0 Äq.), *N*-Acetylcysteamin (26 mg, 0.22 mmol, 1.1 Äq.), EDC·HCl (42 mg, 0.22 mmol, 1.1 Äq.) und 4-DMAP (5 mg, 0.04 mmol, 0.22 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 9:1 → 1:1) SNAC-Thioester **243** in hinreichender Reinheit erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

S-(2-Acetamidoethyl)-(5*S*,6*R*,*E*)-6-hydroxy-2,5-dimethyloct-2-enthioat (161)

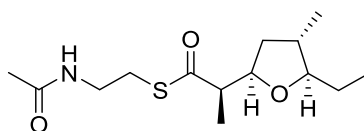


Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus SNAC-Thioester **243** (37 mg, 0.09 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (117 mg, 0.46 mmol, 5.0 Äq.) nach 24 h bei 50 °C und anschließender Reinigung per semi-präparativer HPLC (C18-P_[6] H₂O:CH₃CN = 90:10 {10 min}, Gradient H₂O:CH₃CN = 90:10 → 0:100 {70 min}, H₂O:CH₃CN = 0:100 {10 min}, 2.5 mL/min) SNAC-Thioester **161** (14 mg, 0.05 mmol, 24% über 3 Stufen) als farbloses Öl erhalten.

t_R: 28.5 min; **[α]_D²⁰** = -6.7 (c = 0.7, CH₂Cl₂); **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.85-6.79 (m, 1H, CCHCH₂), 5.87 (bs, 1H, NH), 3.45 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H, NHCH₂), 3.41-3.34 (m, 1H, CHOH),

3.07 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H, CH_2S), 2.48-2.39 (m, 1H, 1x CCHCH_2), 2.20-2.07 (m, 1H, 1x CCHCH_2), 1.96 (s, 3H, CH_3CO), 1.89 (d, $J = 0.7$ Hz, 3H, CH_3CCH), 1.81-1.68 (m, 1H, CHCH_3), 1.65-1.54 (m, 1H, 1x CH_2CH_3), 1.49-1.36 (m, 1H, 1x CH_2CH_3), 0.98 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 0.93 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3CH); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 194.0 (q, SCO), 170.3 (q, CH_3CO), 141.2 (t, CCHCH_2), 136.6 (q, CCHCH_2), 77.0 (t, CHOH), 39.9 (s, NHCH_2), 38.6 (t, CHCH_3), 31.4 (s, CCHCH_2), 28.5 (s, CH_2S), 27.1 (s, CH_2CH_3), 23.3 (p, CH_3CO), 16.2 (p, CH_3CH), 12.7 (p, CH_3CCH), 10.1 (p, CH_2CH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_3\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: berechnet 288.1633, gefunden 288.1634.

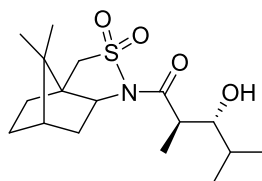
S-(2-Acetamidoethyl)-(R)-2-((2R,4S,5R)-5-ethyl-4-methyltetrahydrofuran-2-yl)propanthioat (175)



Das Produkt **175** wurde durch enzymatische Umsetzung von **161** mit His₆-AmbDH3 erhalten. Die Reinigung erfolgte anschließend mittels semi-präparativer HPLC (C18-P_[B]] $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} = 90:10$ {10 min}, Gradient $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} = 90:10 \rightarrow 0:100$ {70 min}, $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} = 0:100$ {10 min}, 2.5 mL/min).

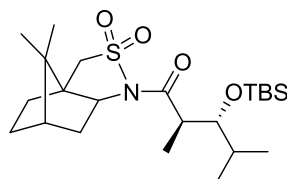
t_R : 33.5 min; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 5.95 (bs, 1H, NH), 4.15-4.08 (m, 1H, $\text{C}(\text{O})\text{CHCHO}$), 3.63-3.52 (m, 1H, 1x NHCH_2), 3.38-3.27 (m, 2H, 1x NHCH_2 , $\text{CH}_3\text{CHCHOCH}_2\text{CH}_3$), 3.17-3.09 (m, 1H, 1x CH_2S), 3.04-2.92 (m, 1H, 1x CH_2S), 2.75-2.66 (m, 1H, COCHCH_3), 1.94 (s, 3H, CH_3CO), 1.92-1.78 (m, 2H, 1x CHCHCH_2 , CH_2CHCH_3), 1.69-1.44 (m, 3H, 1x CHCHCH_2 , CH_2CH_3), 1.10 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH_3CHCO), 1.00 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH_3CHCH_2), 0.94 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H, CH_2CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 202.8 (q, SCO), 170.4 (q, CH_3CO), 87.9 (t, $\text{CH}_3\text{CHCHOCH}_2\text{CH}_3$), 79.5 (t, $\text{C}(\text{O})\text{CHCHO}$), 54.6 (t, COCHCH_3), 39.7 (s, NHCH_2), 37.7 (s, CHCHCH_2), 37.4 (t, CH_2CHCH_3), 28.4 (s, CH_2S), 27.5 (s, CH_2CH_3), 23.2 (p, CH_3CO), 17.9 (p, CH_3CHCH_2), 14.1 (p, CH_3CHCO), 10.3 (p, CH_2CH_3); **HRMS** (ESI): m/z für $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{NO}_3\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: berechnet 310.1453, gefunden 310.1451.

(2R,3R)-1-((3aR,6S)-8,8-Dimethyl-2,2-dioxidotetrahydro-3H-3a,6-methanobenzo[c]isothiazol-1(4H)-yl)-3-hydroxy-2,4-dimethylpentan-1-on (244)



Der allgemeinen Vorschrift zur Darstellung von MUKAIYAMA-Aldol-Produkten folgend, wurde aus dem propionierten OPPOLZER-Auxiliar **110b** (2.0 g, 7.36 mmol, 1.0 Äq.), NEt₃ (1.5 mL, 11.03 mmol, 1.5 Äq.), TMSOTf (2.4 mL, 13.2 mmol, 1.8 Äq.), TiCl₄ (1.0 M in CH₂Cl₂, 11.0 mL, 11.03 mmol, 1.8 Äq.) und Isobutyraldehyd (1.0 mL, 11.03 mmol, 1.5 Äq.) das Aldol-Produkt **244** erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

(2R,3R)-3-((tert-Butyldimethylsilyloxy)-1-((3aR,6S)-8,8-dimethyl-2,2-dioxido-tetrahydro-3H-3a,6-methanobenzo[c]isothiazol-1(4H)-yl)-2,4-dimethylpentan-1-on (245)

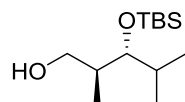


Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Schätzung folgend, wurde aus Aldol-Produkt **244** (2.52 g, 7.36 mmol, 1.0 Äq.), 2,6-Lutidin (1.3 mL, 11.04 mmol, 1.5 Äq.) und TBSOTf (2.5 mL, 11.04 mmol, 1.5 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 9:1) das TBS-geschützte Aldol-Produkt **245** (2.89 g, 6.32 mmol, 86% über zwei Stufen, *d.r.* > 10:1) als farbloser Feststoff erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 4:1): 0.45; $[\alpha]_D^{23} = +28.9$ ($c = 0.8$, CH₂Cl₂); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 4.16-4.10 (m, 1H, CHOTBS), 3.88 (dd, $J = 4.8, 7.5$ Hz, 1H, CCHN), 3.45 (q, $J = 13.1$ Hz, 2H, CH₂SO₂), 3.30 (quin., $J = 6.5$ Hz, 1H, COCHCH₃), 2.09-1.81 (m, 5H, CHCH₂CH, CH₂CHCH₂, CH₂CH₂CH), 1.54-1.16 (m, 3H, CH-Isopropyl, CH₂CH₂CH), 1.16 (s, 3H, CCH₃), 1.11 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH₃CHCO), 0.96 (s, 3H, CCH₃), 0.90-0.82 (m, 12H, OSi(CH₃)₃, Isopropyl), 0.09 (s, 3H, OSiCH₃), 0.06 (s, 3H, OSiCH₃); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 174.1 (q, NCO), 72.3 (t, CHOTBS), 65.4 (t, CCHN), 53.2 (s, CH₂SO₂), 48.1 (q, C(CH₃)₂), 47.8 (q, CCH₂SO₂), 46.4 (t, COCHCH₃), 44.7 (t, CH₂CHCH₂), 38.7 (s, CHCH₂CH), 34.5 (t, CH-Isopropyl), 32.9 (s, CH₂CH₂CH),

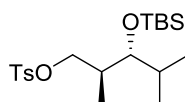
26.5 (s, CH₂CH₂CH), 25.9 (p, OSiC(CH₃)₃), 20.8 (p, CCH₃), 19.9 (p, CCH₃), 18.1 (p, Isopropyl), 18.1 (q, OSiC(CH₃)₃), 14.2 (p, Isopropyl), 10.3 (p, CH₃CHCO), -4.3 (p, OSiCH₃), -5.0 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₂₃H₄₃NO₄SSi [M+H]⁺: berechnet 458.2760, gefunden 458.2764.

(2S,3R)-3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-2,4-dimethylpentan-1-ol (246)



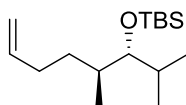
Der allgemeinen Vorschrift zur reduktiven Abspaltung folgend, wurde aus dem TBS-geschützten Aldol-Produkt **245** (2.89 g, 6.31 mmol, 1.0 Äq.) und LiBH₄ (0.343 g, 15.76 mmol, 1.5 Äq.) Alkohol **246** erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt

(2S,3R)-3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-2,4-dimethylpentyl-4-methylbenzensulfonat (247)

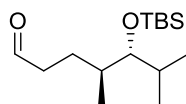


Der allgemeinen Vorschrift zur Tosylierung folgend, wurde aus dem primären Alkohol **246** (0.272 g, 1.11 mmol, 1.0 Äq.), Pyridin (0.13 mL, 1.66 mmol, 1.5 Äq.) und TsCl (0.231 g, 1.21 mmol, 1.1 Äq.) nach säulenchromatographischer Reinigung (PE:EtOAc / 19:1) Tosylat **247** (0.224 g, 0.56 mmol, 51% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 4:1): 0.75; $[\alpha]_D^{23} = -12.3$ (c = 1.0, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 7.81-7.75 (m, 2H, Ts aromatisch), 7.36-7.31 (m, 2H, Ts aromatisch), 4.05 (dd, J = 5.3, 9.4 Hz, 1H, 1x TsOCH₂), 3.84 (dd, J = 7.3, 9.4 Hz, 1H, 1x TsOCH₂), 3.58-3.51 (m, 1H, CHOTBS), 2.45 (s, 3H, TsMe), 1.99-1.88 (m, 1H, TsOCH₂CH), 1.44-1.15 (m, 1H, CH-Isopropyl), 0.90-0.77 (m, 15H, OSiC(CH₃)₃, CH₃CHCH₂, Isopropyl), 0.00 (s, 3H, OSiCH₃), -0.04 (s, 3H, OSiCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 144.7 (q, Ts aromatisch), 133.1 (q, Ts aromatisch), 129.8 (t, Ts aromatisch), 128.0 (t, Ts aromatisch), 73.0 (s, TsOCH₂), 72.7 (t, CHOTBS), 37.5 (t, TsOCH₂CH), 35.8 (t, CH-Isopropyl), 25.8 (p, OSiC(CH₃)₃), 21.7 (p, MeTs), 18.0 (q, OSiC(CH₃)₃), 17.8 (p, Isopropyl), 14.3 (p, Isopropyl), 13.3 (p, CH₃CHCH₂), -4.3 (p, OSiCH₃), -4.8 (p, OSiCH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₂₀H₃₆O₄SSi [M+Na]⁺: berechnet 423.2001, gefunden 423.2000.

***tert*-Butyl(((3*R*,4*S*)-2,4-dimethyloct-7-en-3-yl)oxy)dimethylsilan (**248**)**

Der allgemeinen Vorschrift zur Substitution folgend, wurde aus Tosylat **247** (224 mg, 0.56 mmol, 1.0 Äq.) und Allylmagnesiumbromid (1.0 M in Et₂O, 2.2 mL, 2.24 mmol, 4.0 Äq.) nach einer kurzen Filtersäule (purer PE) das terminale Alken **248** als farbloses Öl erhalten und direkt in der nächsten Stufe eingesetzt.

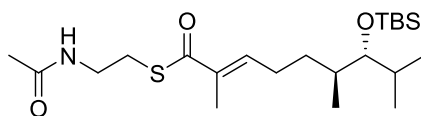
(4*S*,5*R*)-5-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-4,6-dimethylheptanal (165**)**

Der allgemeinen Ozonolyse Vorschrift folgend, wurde aus dem terminalen Alken **248** (1.24 g, 4.59 mmol, 1.0 Äq.) und PPh₃ (1.32 mg, 5.05 mmol, 1.1 Äq.) nach säulen-chromatographischer Reinigung (PE:Et₂O / 39:1) Aldehyd **165** (0.820 mg, 3.01 mmol, 66% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

R_f (PE:EtOAc / 49:1): 0.31; $[\alpha]_D^{22} = +3.3$ ($c = 1.1$, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 9.77 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H, HCO), 3.56-3.49 (m, 1H, CHOTBS), 2.54-2.44 (m, 1H, 1x CH(O)CH₂), 2.44-2.32 (m, 1H, 1x CH(O)CH₂), 1.80-1.68 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 1.63-1.50 (m, 1H, CH-Isopropyl), 1.46-1.18 (m, 2H, 1x CH₂CH₂CH, CH₂CH₂CH), 0.96-0.81 (m, 15H, OSiC(CH₃)₃, Isopropyl, CH₃CHCH₂), 0.03 (s, 3H, OSiCH₃), 0.02 (s, 3H, OSiCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 202.9 (q, HCO), 75.7 (t, CHOTBS), 42.2 (s, CH(O)CH₂), 37.7 (t, CH-Isopropyl), 35.0 (t, CH₂CH₂CH), 26.0 (p, OSiC(CH₃)₃), 24.4 (s, CH₂CH₂CH), 18.9 (p, Isopropyl), 18.2 (q, OSiC(CH₃)₃), 14.8 (p, Isopropyl), 14.4 (p, CH₃CHCH₂), -4.3 (p, OSiCH₃), -4.5 (p, OSiCH₃).

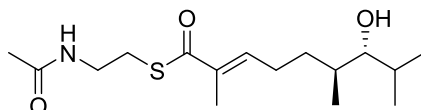
Das Produkt konnte massenspektrometrisch nicht charakterisiert werden.

S-(2-Acetamidoethyl)-(6S,7R,E)-7-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2,6,8-trimethyl-non-2-enthioat (249)



SNAC-Phosphonat **123** (181 mg, 0.53 mmol, 1.2 Äq.) wurde in trockenem THF (3 mL) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nach Zugabe von DBU (0.2 mL, 1.33 mmol, 3.0 Äq.) wurde 30 min bei 0 °C gerührt und anschließend Aldehyd **165** (121 mg, 0.44 mmol, 1.0 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 48 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von gesättigter NH₄Cl-Lösung (5 mL) beendet. THF wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in EtOAc aufgenommen und die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc / 9:1 → 1:1) ergab SNAC-Thioester **249** als farbloses, verunreinigtes Öl, welches direkt in der nächsten Stufe eingesetzt wurde.

S-(2-Acetamidoethyl)-(6S,7R,E)-7-hydroxy-2,6,8-trimethylnon-2-enthioat (160)

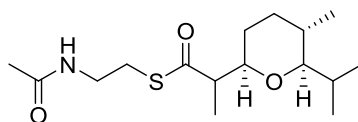


Der allgemeinen Vorschrift zur TBS-Entschützung folgend, wurde aus SNAC-Thioester **249** (0.506 g, 1.31 mmol, 1.0 Äq.) und PPTS (1.64 g, 6.52 mmol, 5.0 Äq.) nach 24 h bei 50 °C und anschließender säulenchromatographischer Reinigung (CH₂Cl₂:EtOAc / 1:1) SNAC-Thioester **160** (264 mg, 0.84 mmol, 64% über zwei Stufen) als farbloses Öl erhalten.

R_f (CH₂Cl₂:EtOAc / 4:1): 0.75; $[\alpha]_D^{22} = +7.3$ (c = 0.3, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 6.80-6.74 (m, 1H, CCHCH₂), 5.87 (bs, 1H, NH), 3.48-3.42 (m, 3H, CHOH, NHCH₂), 3.06 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH₂S), 2.37-2.26 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 2.26-2.11 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 19.6 (s, 3H, CH₃CO), 1.88 (d, J = 1.0 Hz, 3H, CH₃CCH), 1.71-1.23 (m, 5H, CH₂CH₂CH, CH₂CH₂CH, CH-Isopropyl), 0.96-0.91 (m, 6H, CH₃CHCH₂, Isopropyl); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 194.0 (q, SCO), 170.3 (q, CH₃CO), 142.2 (t, CCHCH₂), 135.9 (q, CCHCH₂), 75.6 (t, CHOH), 39.9 (s, NHCH₂), 38.6 (s, CH₂CH₂CH), 35.9 (s, CH₂CH₂CH), 30.7 (t, CH-Isopropyl), 28.5 (s, CH₂S), 26.6 (s, CH₂CH₂CH), 23.3 (p, CH₃CO), 19.2 (p, Isopropyl), 15.3 (p,

Isopropyl), 14.2 (p, CH₃CHCH₂), 12.5 (p, CH₃CCH); **HRMS** (ESI): m/z für C₁₆H₂₉NO₃S [M+H]⁺: berechnet 316.1939, gefunden 316.1941.

S-(2-Acetamidoethyl)-2-(2*R*,5*S*,6*R*)-6-isopropyl-5-methyltetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)propanthioat (174)



Das Produkt **160** wurde durch enzymatische Umsetzung von **174** mit His₆-AmbDH3 erhalten. Die Reinigung erfolgte anschließend mittels semi-präparativer HPLC (C18-P₁₈) H₂O:CH₃CN = 90:10 {10 min}, Gradient H₂O:CH₃CN = 90:10 → 0:100 {70 min}, H₂O:CH₃CN = 0:100 {10 min}, 2.5 mL/min).

t_R: 45.5 min; **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 5.85 (bs, 1H, NH), 3.51-3.36 (m, 3H, C(O)CHCH, NHCH₂), 3.08-2.94 (m, 2H, CH₂S), 2.89-2.81 (m, 1H, CHCH(CH₃)₂), 2.76-2.65 (m, 1H, C(O)CHCH₃), 1.96 (s, 3H, CH₃CO), 1.83-1.75 (m, 1H, 1x CH₂CHCH₃), 1.71-1.65 (m, 1H, 1x CH₂CH₂CH), 1.36-1.13 (m, 6H, 1x CH₂CHCH₃, 1x CH₂CH₂CH, CH₂CH₂CH, CH-Isopropyl), 1.09 (d, J = 7.2 Hz, 3H, C(O)CHCH₃), 0.84 (d, J = 7.4 Hz, 3H, Isopropyl), 0.79 (d, J = 6.5 Hz, 3H, CH₂CHCH₃); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 203.5 (q, SCO), 170.2 (q, CH₃CO), 83.1 (t, CHCH(CH₃)₂), 79.5 (t, C(O)CHCH), 54.3 (t, C(O)CHCH₃), 39.9 (s, NHCH₂), 35.4 (t, CH₂CH₂CH), 35.2 (t, CH-Isopropyl), 32.8 (s, CH₂CHCH₃), 29.1 (s, CH₂CH₂CH), 28.6 (s, CH₂S), 23.3 (p, CH₃CO), 18.5 (p, Isopropyl), 17.7 (p, CH₂CHCH₃), 14.0 (p, C(O)CHCH₃); **HRMS** (ESI): m/z für C₁₆H₂₉NO₃S [M+Na]⁺: berechnet 338.1766, gefunden 338.1760.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Kitsche, A.; Kalesse, M. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 851–861.
- (2) Staunton, J.; Weissman, K. J. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380–416.
- (3) Collie, J. N. *J. Chem. Soc.* **1907**, *1*, 1806–1813.
- (4) Birch, A. J.; Gager, F.; Mo, L.; Pelter, A.; Wright, J. J. *Aust. J. Chem.* **1955**, *22*, 539–544.
- (5) Collie, B. N.; Myers, W. S. *J. Chem. Soc.* **1893**, 122–128.
- (6) Weissman, K.; Leadley, P. F. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 925–936.
- (7) Walsh, C. T. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 124–134.
- (8) Kirschning, A.; Hahn, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4012–4022; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4086–4096.
- (9) Challis, G. L. *Microbiology* **2008**, *154*, 1555–1569.
- (10) Piel, J. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 996–1047.
- (11) Sattely, E. S.; Fischbach, M. A.; Walsh, C. T. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 757–793.
- (12) Lambalot, R. H.; Gehring, A. M.; Flugel, R. S.; Zuber, P.; LaCelle, M.; Marahiel, M. A.; Reid, R.; Khosla, C.; Walsh, C. T. *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 923–936.
- (13) Weissman, K. J.; Timoney, M.; Bycroft, M.; Grice, P.; Hanefeld, U.; Staunton, J.; Leadley, P. F. *Biochemistry* **1997**, *36*, 13849–13855.
- (14) Celmer, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1799–1801.
- (15) Beld, J.; Sonnenschein, E. C.; Vickery, C. R.; Noel, J. P.; Burkart, M. D. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 61–108.
- (16) Fischbach, M. A.; Walsh, C. T. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3468–3496.
- (17) Hertweck, C. *Trends Biochem. Sci.* **2015**, *40*, 189–199.
- (18) Keatinge-Clay, A. T. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1050–1073.
- (19) Crawford, J. M.; Townsend, C. A. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *8*, 879–889.
- (20) Scotti, C.; Piatti, M.; Cuzzoni, A.; Perani, P.; Tognoni, A.; Grandi, G.; Galizzi, A.; Albertini, A. M. *Gene* **1993**, *130*, 65–71.
- (21) Moldenhauer, J.; Chen, X. H.; Borriss, R.; Piel, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8195–8197; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8343–8345.
- (22) Erol, Ö.; Schäberle, T. F.; Schmitz, A.; Rachid, S.; Gurgui, C.; El Omari, M.; Lohr, F.; Kehraus, S.; Piel, J.; Müller, R.; König, G. M. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1253–1265.
- (23) Piel, J. *PNAS* **2002**, *99*, 14002–14007.
- (24) Partida-Martinez, L. P.; Hertweck, C. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 41–45.
- (25) Walsh, C. T. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 127–135.

- (26) Ringel, S. M.; Greenough, R. C.; Roemer, S.; Connor, D.; Gutt, A. L.; Blair, B.; Kanter, G.; Von Strandtmann, M. *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 371–375.
- (27) Connor, D. T.; Greenough, R. C.; Von Strandtmann, M. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3664–3669.
- (28) Barnes, N. J.; Davidson, A. H.; Hughes, L. R.; Procter, G.; Rajcoomar, V. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1751–1754.
- (29) Just, G.; Potvin, P. *Can. J. Chem.* **1980**, *58*, 2173–2177.
- (30) Höfle, G.; Steinmetz, H.; Gerth, K.; Reichenbach, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, *XLIV*, 941–945.
- (31) Julien, B.; Tian, Z.-Q.; Reid, R.; Reeves, C. D. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1277–1286.
- (32) Vetcher, L.; Menzella, H. G.; Kudo, T.; Motoyama, T.; Katz, L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3734–3736.
- (33) Kuhn, W.; Fiedler, H. P. *Sekundärmetabolismus bei Mikroorganismen*; Attempto Verlag: Tübingen, 1995.
- (34) Hansen, D. A.; Rath, C. M.; Eisman, E. B.; Narayan, A. R. H.; Kittendorf, J. D.; Mortison, J. D.; Yoon, Y. J.; Sherman, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11232–11238.
- (35) Wu, J.; Zaleski, T. J.; Valenzano, C.; Khosla, C.; Cane, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17393–17404.
- (36) Cortes, J.; Haydock, S. F.; Roberts, G. A.; Bevitt, D. J.; Leadlay, P. F. *Nature* **1990**, *348*, 176–178.
- (37) Donadio, S.; Staver, M. J.; McAlpine, J. B.; Swanson, S. J.; Katz, L. *Science* **1991**, *252*, 675–679.
- (38) Valenzano, C. R.; You, Y. O.; Garg, A.; Keatinge-Clay, A. T.; Khosla, C.; Cane, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14697–14699.
- (39) Castonguay, R.; He, W.; Chen, A. Y.; Khosla, C.; Cane, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13758–13769.
- (40) Castonguay, R.; Valenzano, C. R.; Chen, A. Y.; Keatinge-Clay, A. T.; Khosla, C.; Cane, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11598–11599.
- (41) Valenzano, C. R.; Lawson, R. J.; Chen, A. Y.; Khosla, C.; Cane, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 18501–18511.
- (42) Guo, X.; Liu, T.; Valenzano, C. R.; Deng, Z.; Cane, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14694–14696.
- (43) Domínguez de María, P.; van Gemert, R. W.; Straathof, A. J. J.; Hanefeld, U. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 370–392.
- (44) Nakata, T. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1955–1972.
- (45) Tichenor, M. S.; Boger, D. L. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 220–226.
- (46) Gallimore, A. R.; Stark, C. B. W.; Bhatt, A.; Harvey, B. M.; Demydchuk, Y.; Bolanos-Garcia, V.; Fowler, D. J.; Staunton, J.; Leadlay, P. F.; Spencer, J. B. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 453–460.
- (47) Day, L. E.; Chamberlin, J. W.; Gordee, E. Z.; Chen, S.; Gorman, M.; Hamill, R. L.; Ness, T.; Weeks, R. E.; Stroshane, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1973**, *4*, 410–414.

- (48) Cane, D. E.; Liang, T.-C.; Hasler, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7274–7281.
- (49) Bhatt, A.; Stark, C. B. W.; Harvey, B. M.; Gallimore, A. R.; Demydchuk, Y. A.; Spencer, J. B.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7075–7078; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7237–7240.
- (50) Irschik, H.; Kopp, M.; Weissman, K. J.; Buntin, K.; Piel, J.; Müller, R. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1840–1849.
- (51) Sudek, S.; Lopanik, N. B.; Waggoner, L. E.; Hildebrand, M.; Anderson, C.; Liu, H.; Patel, A.; Sherman, D. H.; Haygood, M. G. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 67–74.
- (52) Pöplau, P.; Frank, S.; Morinaka, B. I.; Piel, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13215–13218; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 13457–13460.
- (53) Luhavaya, H.; Dias, M. V. B.; Williams, S. R.; Hong, H.; De Oliveira, L. G.; Leadlay, P. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13622–13625; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 13826–13829.
- (54) Yurkovich, M. E.; Tyrakis, P. A.; Hong, H.; Sun, Y.; Samborsky, M.; Kamiya, K.; Leadlay, P. F. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 66–71.
- (55) Li, C.; Roegel, K. E.; Kelly, W. L. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1064–1072.
- (56) Taft, F.; Brünjes, M.; Knobloch, T.; Floss, H. G.; Kirschning, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3812–3813.
- (57) Kusebauch, B.; Busch, B.; Scherlach, K.; Roth, M.; Hertweck, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1460–1464; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5101–5104.
- (58) Moldenhauer, J.; Götz, D. C. G.; Albert, C. R.; Bischof, S. K.; Schneider, K.; Süßmuth, R. D.; Engeser, M.; Gross, H.; Bringmann, G.; Piel, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1465–1467; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1507–1509.
- (59) Gay, D. C.; Spear, P. J.; Keatinge-Clay, A. T. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 2374–2381.
- (60) Lohr, F.; Jenniches, I.; Frizler, M.; Meehan, M. J.; Sylvester, M.; Schmitz, A.; Gütschow, M.; Dorrestein, P. C.; König, G. M.; Schäberle, T. F. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 4175–4180.
- (61) Kaulmann, U.; Hertweck, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1866–1869; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1947–1950.
- (62) Moynié, L.; Leckie, S. M.; McMahon, S. A.; Duthie, F. G.; Koehnke, A.; Taylor, J. W.; Alphey, M. S.; Brenk, R.; Smith, A. D.; Naismith, J. H. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 365–377.
- (63) Metz, J. G.; Roessler, P.; Facciotti, D.; Levering, C.; Dittrich, F.; Lassner, M.; Valentine, R.; Lardizabal, K.; Domergue, F.; Yamada, A.; Yazawa, K.; Knauf, V.; Browse, J. *Science* **2001**, *293*, 290–292.
- (64) Tanner, M. E. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 237–246.
- (65) Garg, A.; Khosla, C.; Cane, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16324–16327.
- (66) Xie, X.; Garg, A.; Keatinge-Clay, A. T.; Khosla, C.; Cane, D. E. *Biochemistry* **2016**, *55*, 1179–1186.
- (67) Garg, A.; Xie, X.; Keatinge-Clay, A. T.; Khosla, C.; Cane, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 10190–10193.
- (68) Luo, L.; Kohli, R. M.; Onishi, M.; Linne, U.; Marahiel, M. A.; Walsh, C. T. *Biochemistry* **2002**, *41*,

- 9184–9196.
- (69) Linne, U.; Doekel, S.; Marahiel, M. A. *Biochemistry* **2001**, *40*, 15824–15834.
- (70) Quadri, L. E. N.; Keating-Clay, A. T.; Patel, H. M.; Walsh, C. T. *Biochemistry* **1999**, *38*, 14941–14954.
- (71) Gehring, A. M.; DeMoll, E.; Fetherston, J. D.; Mori, I.; Mayhew, G. F.; Blattner, F. R.; Walsh, C. T.; Perry, R. D. *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 573–586.
- (72) Gehring, A. M.; Mori, I.; Perry, R. D.; Walsh, C. T. *Biochemistry* **1998**, *37*, 11637–11650.
- (73) Patel, H. M.; Tao, J.; Walsh, C. T. *Biochemistry* **2003**, *42*, 10514–10527.
- (74) Bearden, S. W.; Fetherston, J. D.; Perry, R. D. *Infect. Immun.* **1997**, *65*, 1659–1668.
- (75) Carmi, R.; Carmeli, S. *J. Nat. Prod.* **1994**, *5*, 1200–1205.
- (76) Struck, A. W.; Thompson, M. L.; Wong, L. S.; Micklefield, J. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2642–2655.
- (77) Parveen, N.; Cornell, K. A. *Mol. Microbiol.* **2011**, *79*, 7–20.
- (78) Schubert, H. L.; Blumenthal, R. M.; Cheng, X. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 329–335.
- (79) Schmidberger, J. W.; James, A. B.; Edwards, R.; Naismith, J. H.; O'Hagan, D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3646–3648; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3728–3730.
- (80) Campbell, C. D.; Vederas, J. C. *Biopolymers* **2010**, *93*, 755–763.
- (81) Kennedy, J.; Auclair, K.; Kendrew, S. G.; Park, C.; Vederas, J. C.; Hutchinson, C. R. *Science* **1999**, *284*, 1368–1372.
- (82) Brady, S. F.; Simmons, L.; Kim, J. H.; Schmidt, E. W. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1488–1503.
- (83) Friedrich, S.; Hahn, F. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1473–1508.
- (84) Wong, C.-H.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4890–4899.
- (85) Won, S. J.; Soon, J. J.; Sung, R. P.; Cha, Y. C.; Byoung, C. P.; Je, W. P.; Yeo, J. Y. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 1972–1979.
- (86) Neumann, C. S.; Fujimori, D. G.; Walsh, C. T. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 99–109.
- (87) Yeh, E.; Cole, L. J.; Barr, E. W.; Bollinger, J. M.; Ballou, D. P.; Walsh, C. T. *Biochemistry* **2006**, *45*, 7904–7912.
- (88) Flecks, S.; Patallo, E. P.; Zhu, X.; Ernyei, A. J.; Seifert, G.; Schneider, A.; Dong, C.; Naismith, J. H.; Van Pée, K. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9533–9536; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9676–9679.
- (89) Frese, M.; Sewald, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 298–301; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 302–305.
- (90) Yeh, E.; Garneau, S.; Walsh, C. T. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 3960–3965.
- (91) Dong, C.; Flecks, S.; Unversucht, S.; Haupt, C.; van Pée, K.-H.; Naismith, J. H. *Science* **2005**, *309*, 2216–2219.

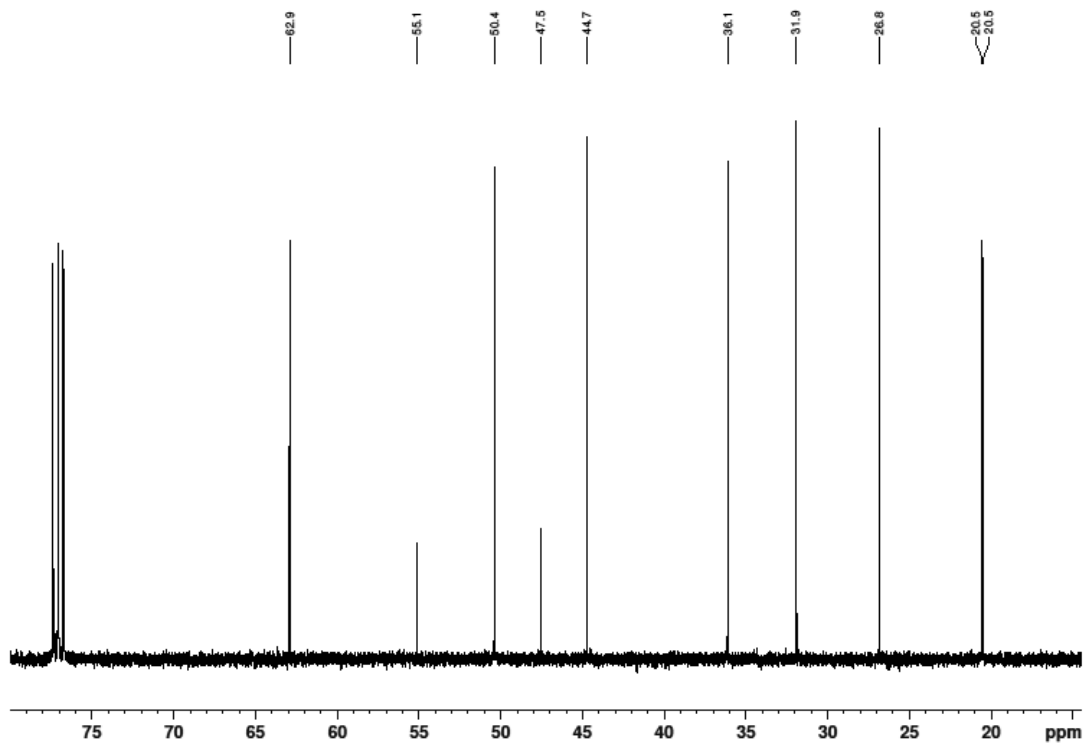
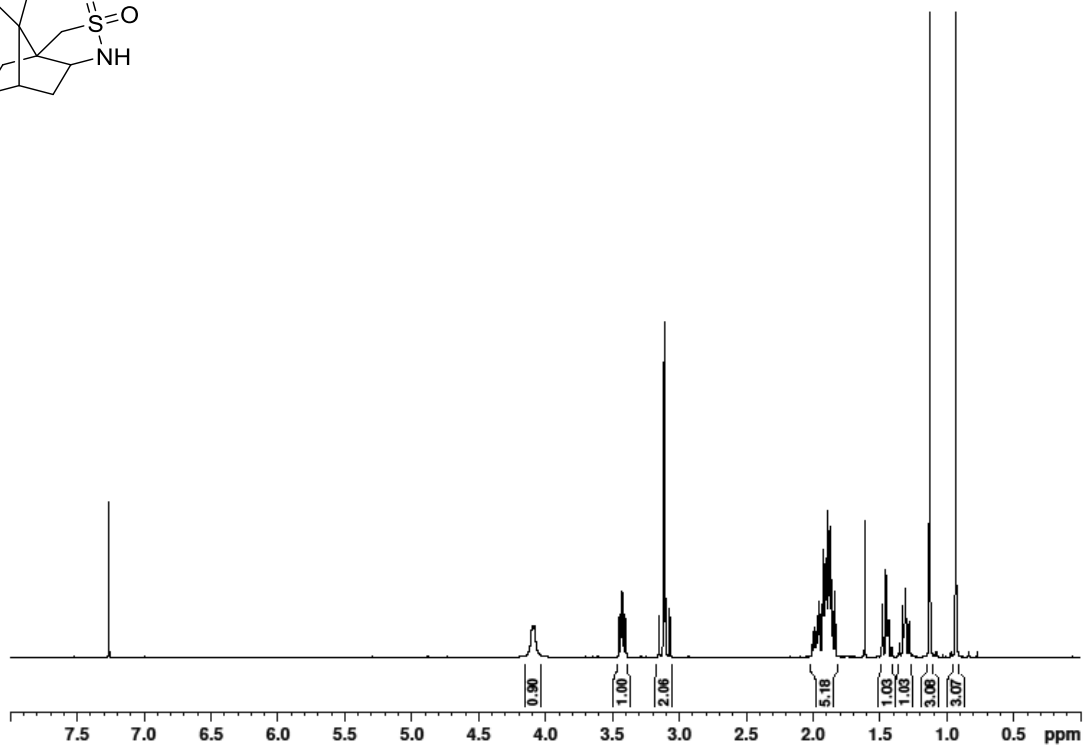
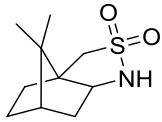
- (92) Zehner, S.; Kotsch, A.; Bister, B.; Süßmuth, R. D.; Méndez, C.; Salas, J. A.; Van Pée, K. H. *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 445–452.
- (93) Seibold, C.; Schnerr, H.; Rumpf, J.; Kunzendorf, A.; Hatscher, C.; Wage, T.; Ernyei, A. J.; Dong, C.; Naismith, J. H.; Van Pée, K.-H. *Biocatal. Biotransformation* **2006**, *24*, 401–408.
- (94) Keller, S.; Wage, T.; Hohaus, K.; Hölzer, M.; Eichhorn, E.; Pée, K. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2300–2302.
- (95) Payne, J. T.; Andorfer, M. C.; Lewis, J. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5271–5274; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 5379–5382.
- (96) Frese, M.; Guzowska, P. H.; Voß, H.; Sewald, N. *ChemCatChem* **2014**, *6*, 1270–1276.
- (97) Taylor, R. D.; Maccoss, M.; Lawson, A. D. G. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 5845–5859.
- (98) Berkhan, G.; Hahn, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14240–14244; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 14464–14468.
- (99) Caffrey, P. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 654–657.
- (100) Reid, R.; Piagentini, M.; Rodriguez, E.; Ashley, G.; Viswanathan, N.; Carney, J.; Santi, D. V.; Hutchinson, C. R.; McDaniel, R. *Biochemistry* **2003**, *42*, 72–79.
- (101) Zhang, H.; Wang, Y.; Wu, J.; Skalina, K.; Pfeifer, B. A. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 1232–1240.
- (102) Eddy, S. *Bioinformatics* **1998**, *14*, 755–763.
- (103) Evans, D. A.; Takacs, J. M.; McGee, L. R.; Ennis, M. D.; Mathre, D. J.; Bartroli, J. *Pure Appl. Chem.* **1981**, *53*, 1109–1127.
- (104) Oppolzer, W.; Rodriguez, I. *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 1275–1281.
- (105) Keatinge-Clay, A. T. *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 941–953.
- (106) Vergnolle, O.; Hahn, F.; Baerga-Ortiz, A.; Leadlay, P. F.; Andexer, J. N. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1011–1014.
- (107) Berkhan, G. *Masterarbeit - In vitro Studien zur Biosynthetischen Bildung des Ambruticin Ostfragments*; Leibniz Universität Hannover, 2013.
- (108) Kandziora, N.; Andexer, J. N.; Moss, S. J.; Wilkinson, B.; Leadlay, P. F.; Hahn, F. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3563.
- (109) Haydock, S. F.; Aparicio, J. F.; Molnár, I.; Schwecke, T.; Khaw, L. E.; König, A.; Marsden, A. F. A.; Galloway, I. S.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *FEBS Lett.* **1995**, *374*, 246–248.
- (110) Reeves, C. D.; Murli, S.; Ashley, G. W.; Piagentini, M.; Hutchinson, C. R.; McDaniel, R. *Biochemistry* **2001**, *40*, 15464–15470.
- (111) Olano, C.; Moss, S. J.; Braña, A. F.; Sheridan, R. M.; Math, V.; Weston, A. J.; Méndez, C.; Leadlay, P. F.; Wilkinson, B.; Salas, J. A. *Mol. Microbiol.* **2004**, *52*, 1745–1756.
- (112) Gay, D.; You, Y.; Keatinge-Clay, A. T.; Cane, D. E. *Biochemistry* **2013**, *52*, 8916–8928.
- (113) Crimmins, M. T.; Shamszad, M. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 149–152.
- (114) Ryu, I.; Murai, S.; Sonoda, N. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2391–2393.

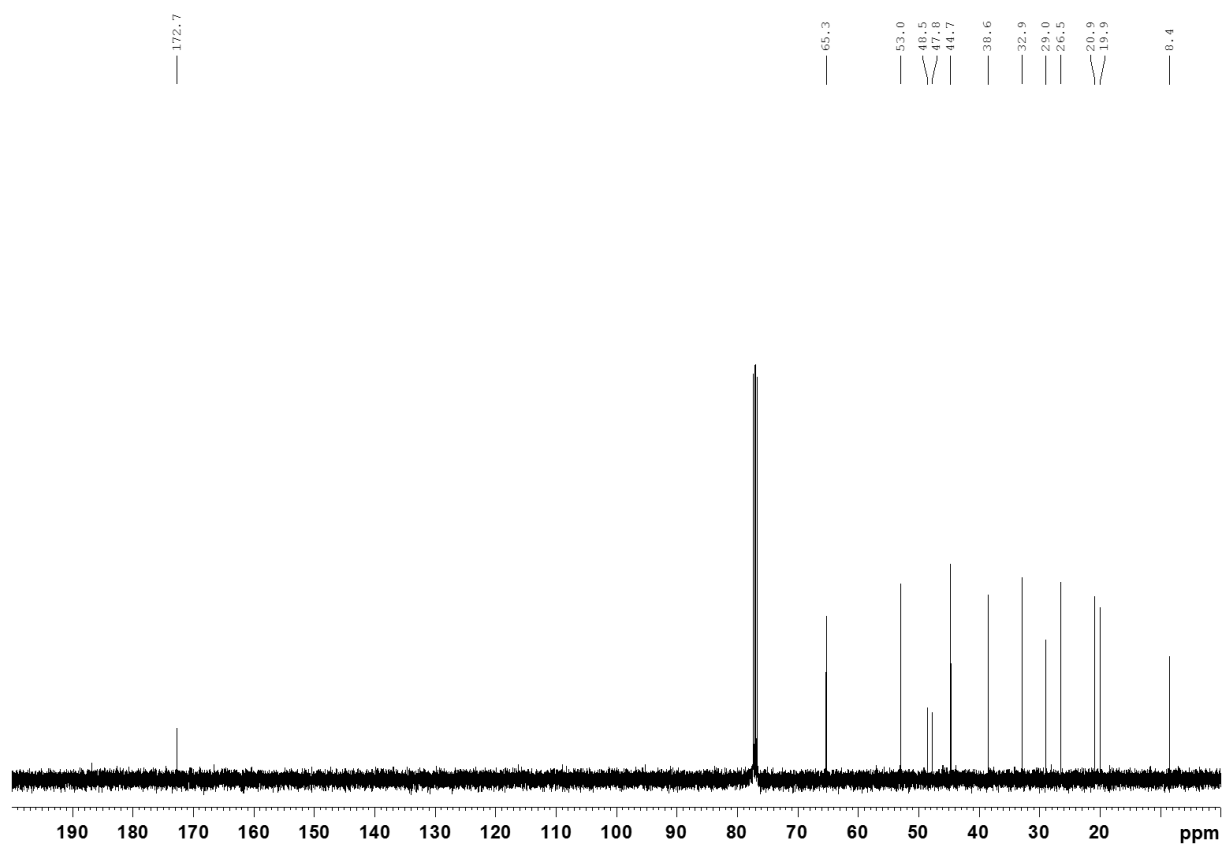
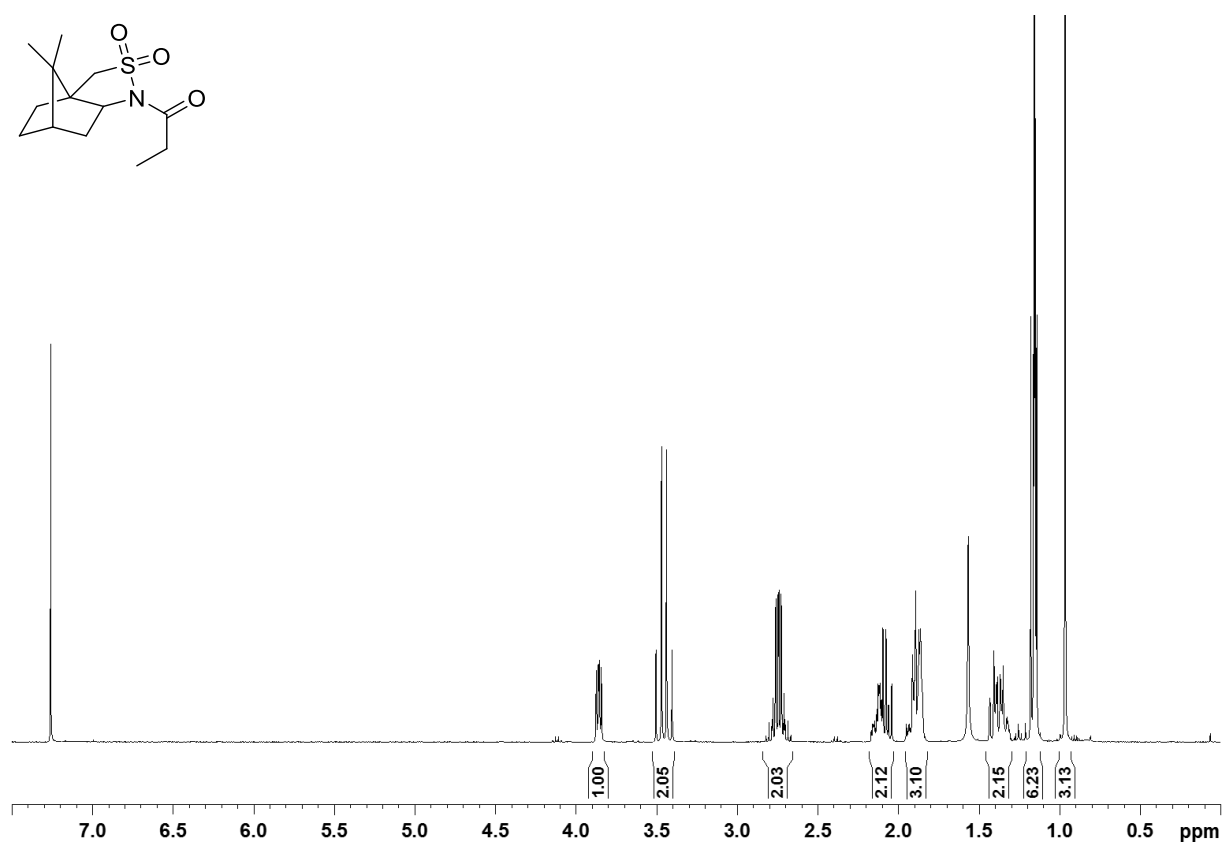
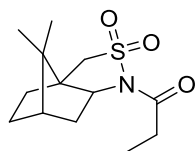
- (115) Nagao, Y. *J. Chem. Soc. Chem. Commun* **1985**, 65, 1418–1419.
- (116) Merten, C. *Dissertation - Untersuchung der molekularen Konformation und der intermolekularen Wechselwirkung chiraler Verbindungen mittels VCD-Spektroskopie*; Universität Bremen, 2010.
- (117) Holec, C. *Masterarbeit - In vitro Untersuchung der konservierten Tetrahydropyran-Bildung in den Biosynthesewegen der Ambruticine und Jernagolide*; Leibniz Universität Hannover, 2012.
- (118) Hansen, R.; Eriksen, N. T. *Process Biochem.* **2007**, 42, 1259–1263.
- (119) Kück, U. *Praktikum der Molekulargenetik*; 2005.
- (120) Thomas, J. G.; Ayling, A.; Baneyx, F. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1997**, 66, 197–238.
- (121) Markham, G. D.; Hafner, E. W.; Tabor, C. W.; Tabor, H. J. *Biol. Chem.* **1980**, 255, 9082–9092.
- (122) Fraser-Reid, B.; Tatsuta, K.; Thiem, J. *Glycoscience - Chemistry and Chemical Biology Volume 1*; 2nd Editio.; Springer: Heidelberg, 2008.
- (123) Bisswanger, H. *Enzyme: Struktur, Kinetik und Anwendung*; WILEY-VCH: Weinheim, 2015.
- (124) Dose, K. *Biochemie - Eine Einführung*; 4. Auflage.; Springer - Lehrbuch: Heidelberg, 1994.
- (125) Ebeling, W.; Hennrich, N.; Klockow, M.; Metz, H.; Orth, H. D.; Lang, H. *Eur. J. Biochem.* **1974**, 47, 91–97.
- (126) Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254.
- (127) Laemmli, U. K. *Nature* **1970**, 227, 680–688.
- (128) Capet, M.; David, F.; Bertin, L.; Hardy, J. C. *Synth. Commun.* **1995**, 25, 3323–3327.
- (129) Oppolzer, W.; Blagg, J.; Rodriguez, I.; Walther, E. J. *Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 2767–2772.
- (130) Matsuo, K.; Shindo, M. *Org. Lett.* **2010**, 12, 5346–5349.
- (131) Brünjes, M. *Dissertation - Studien zur chemoenzymatischen Synthese und Biosynthese von Maytansinoid-Analoga*; Leibniz Universität Hannover, 2006.

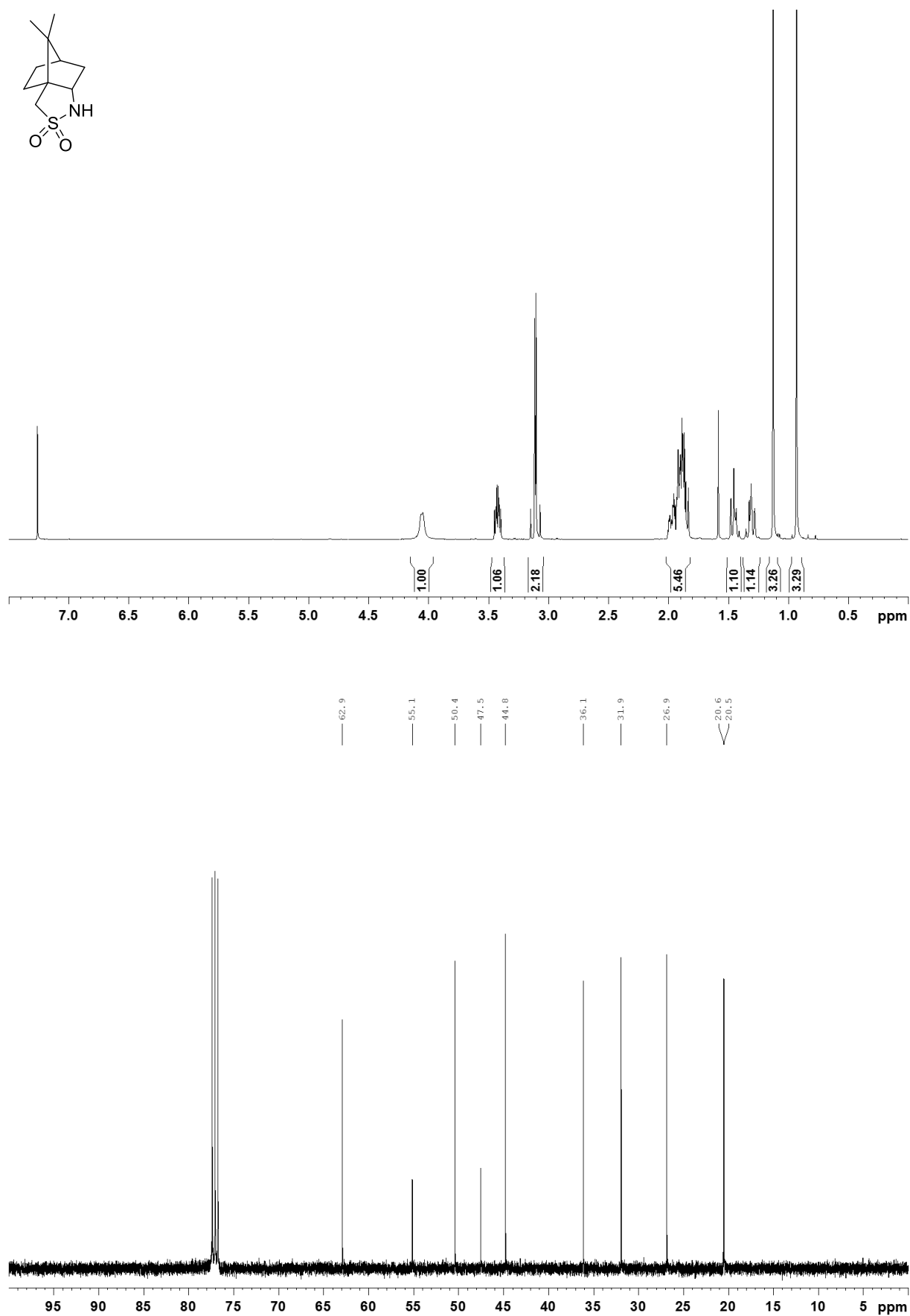
7 Anhang

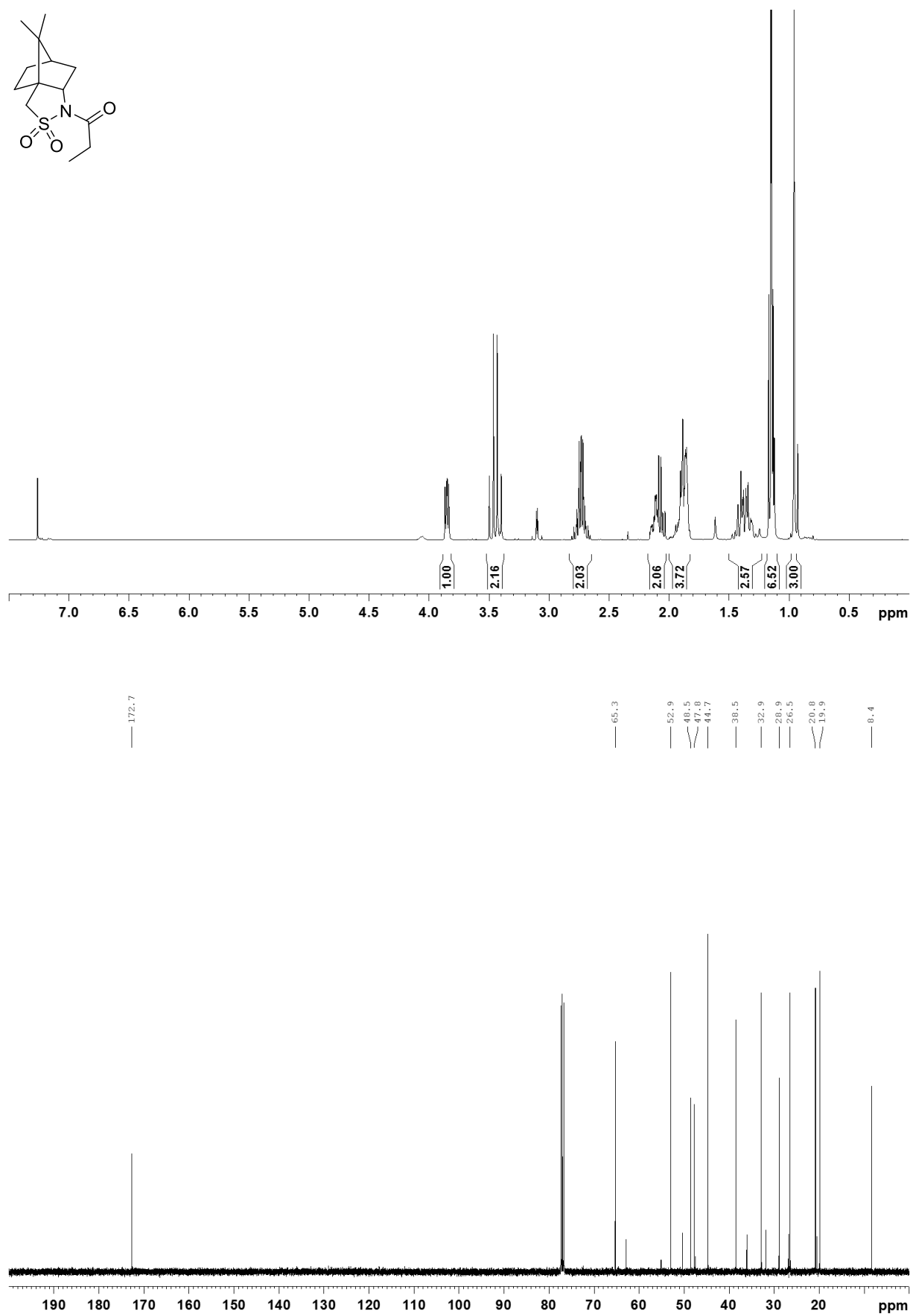
7.1 Spektrenanhang

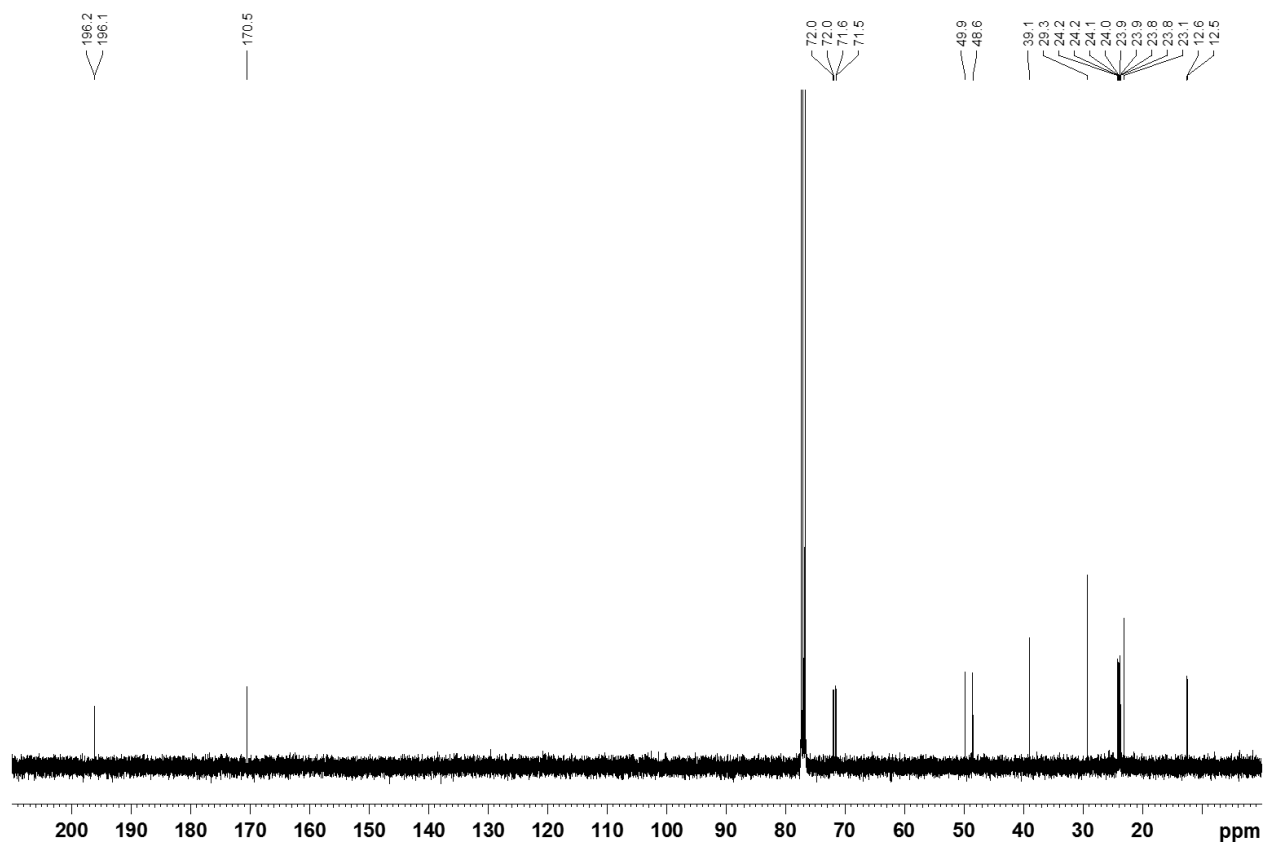
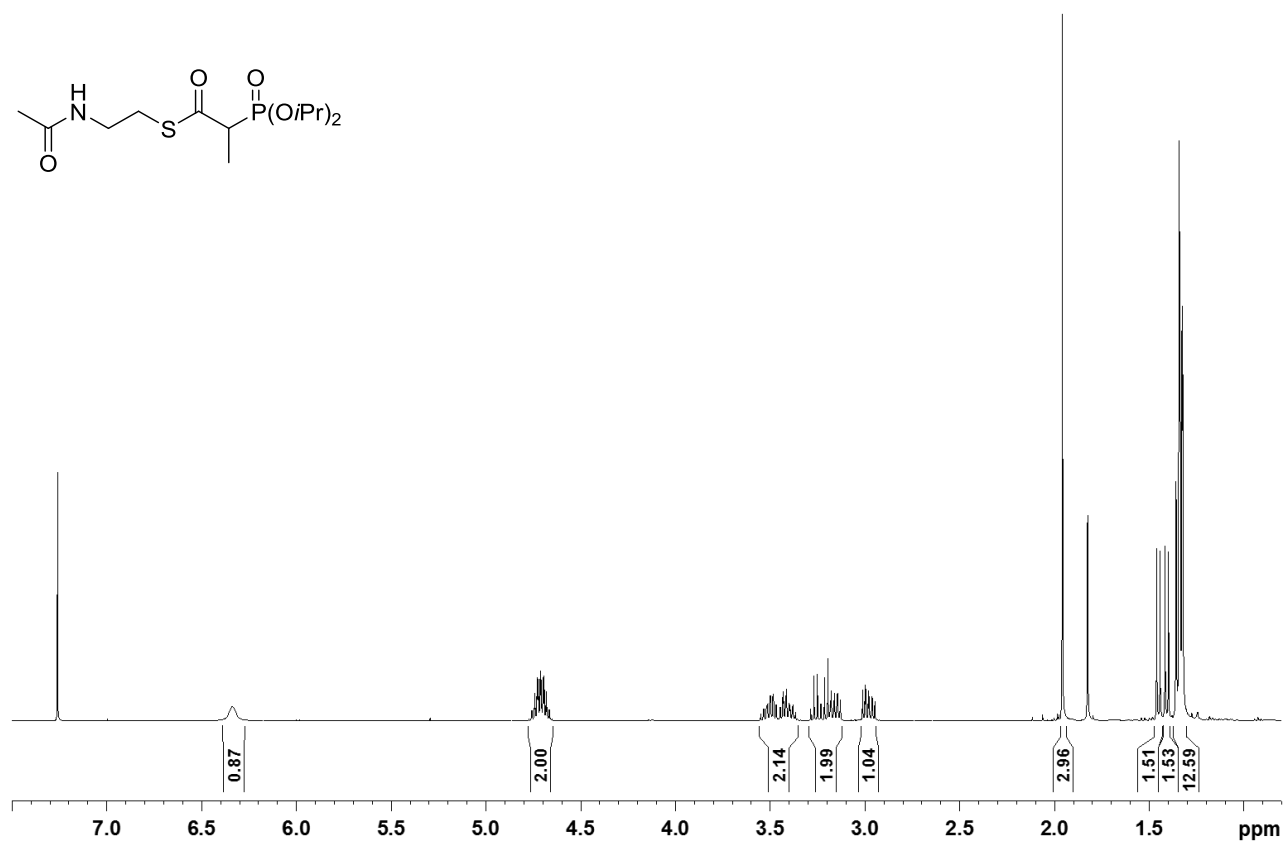
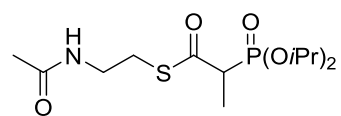
Die ^1H und ^{13}C NMR-Spektren wurden wenn nicht anders vermerkt bei 400 MHz bzw. 100 MHz in CDCl_3 aufgenommen.

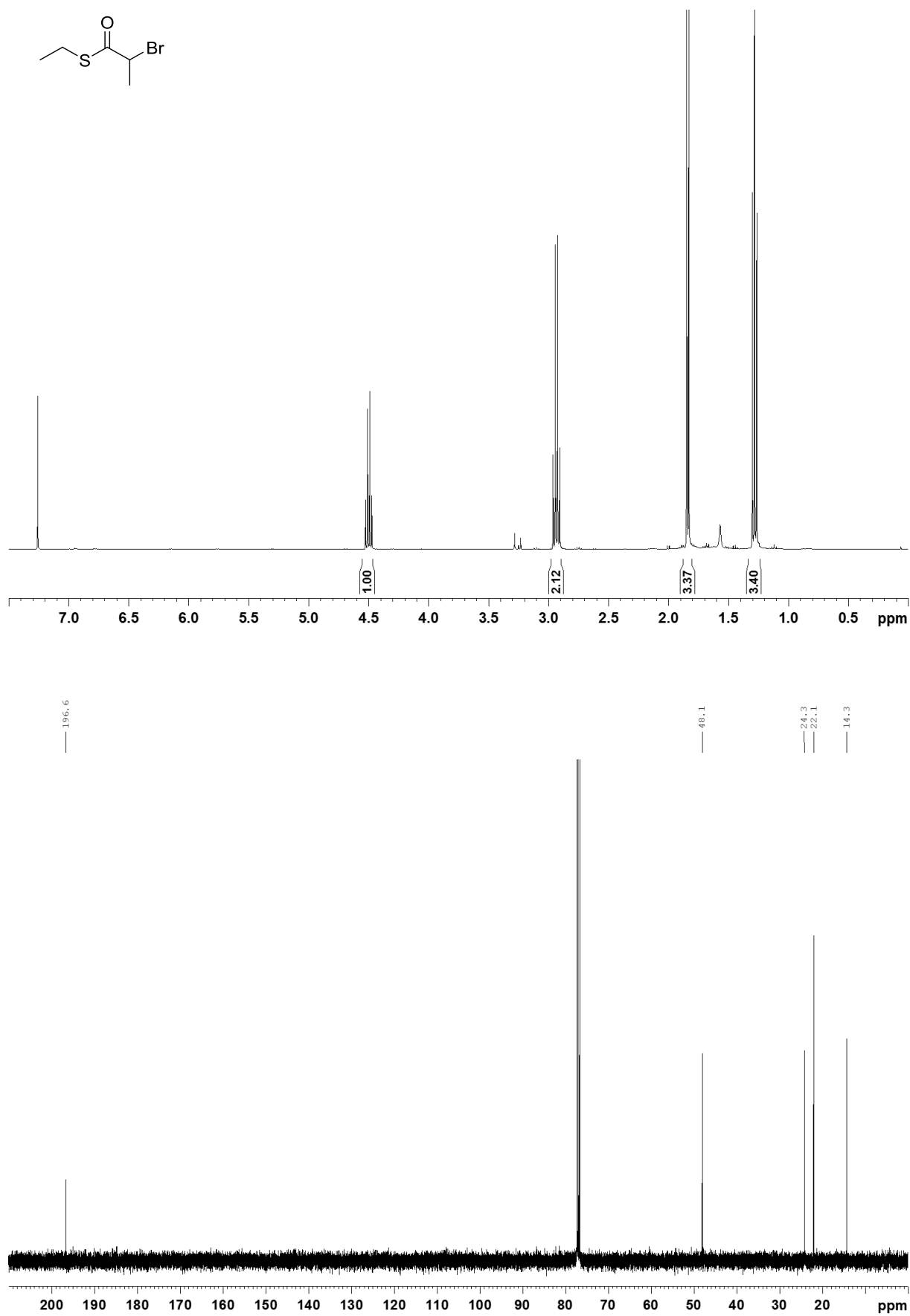


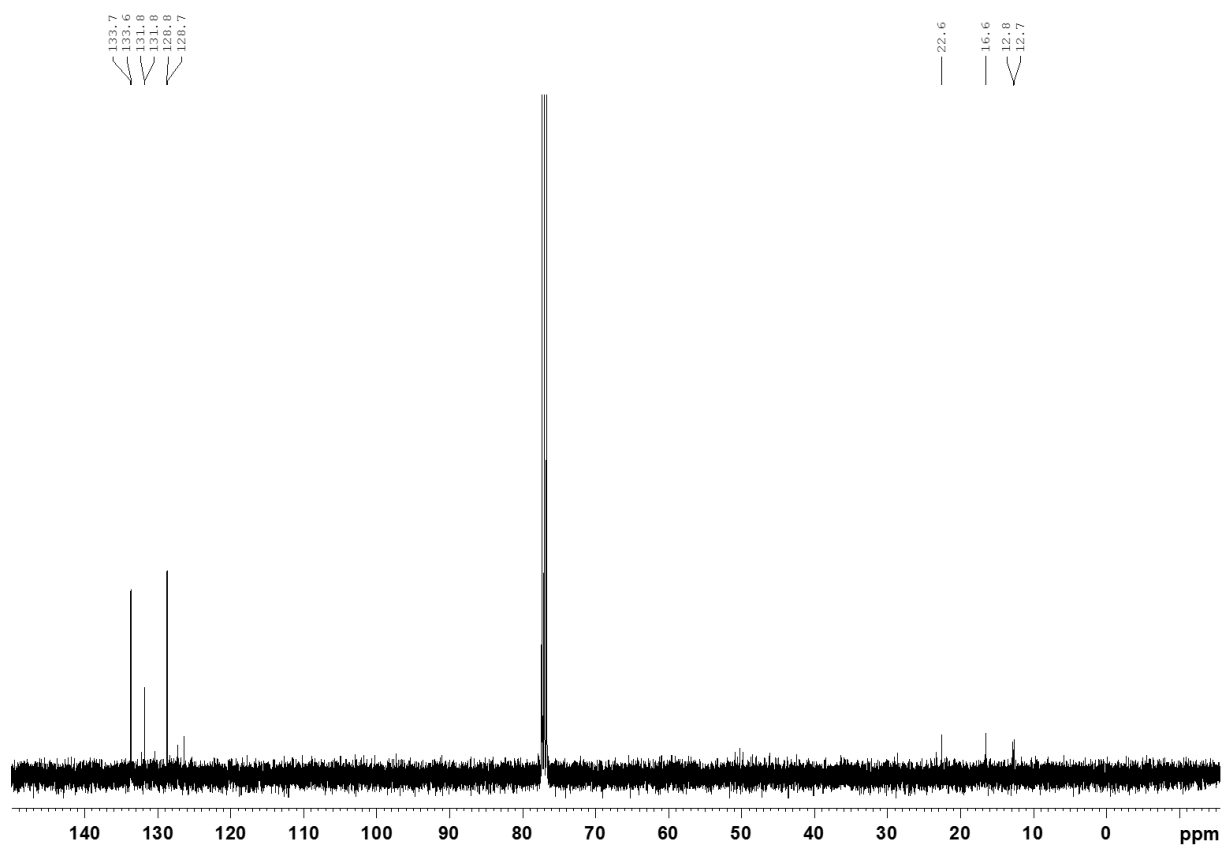
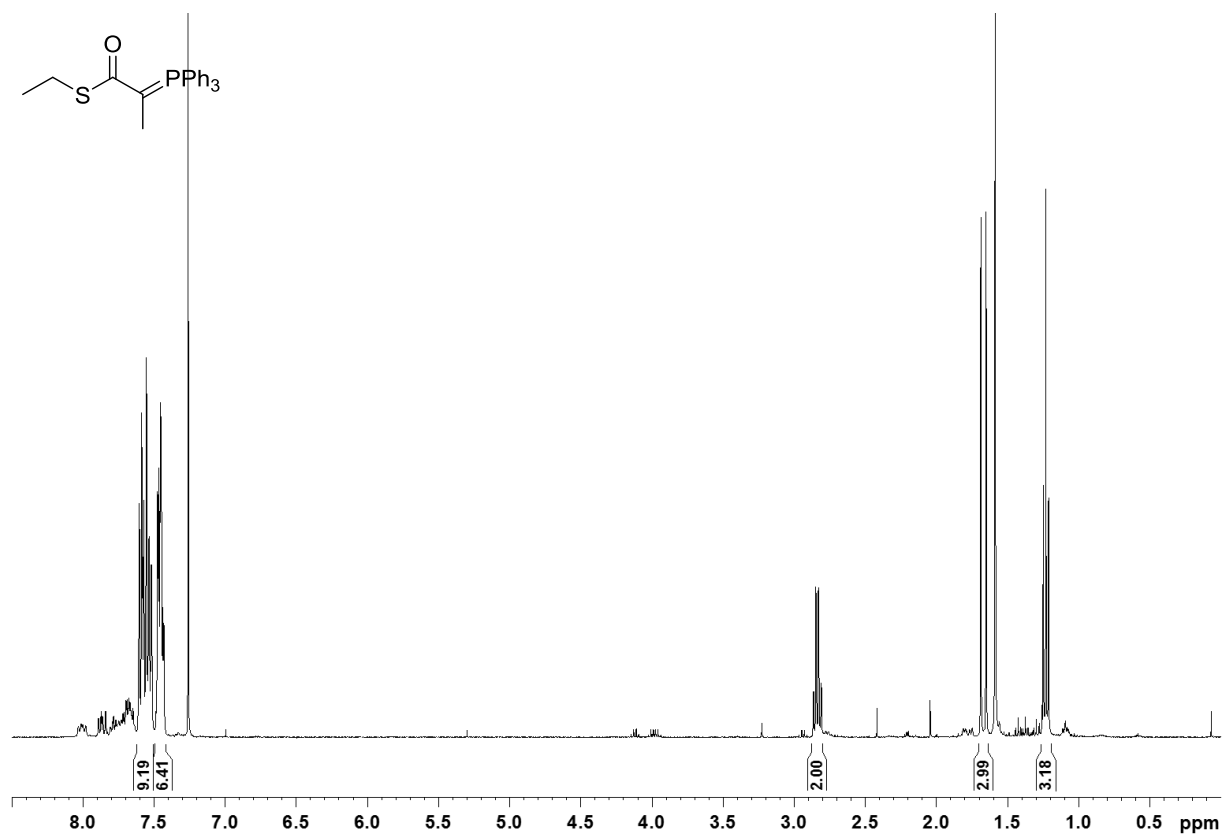


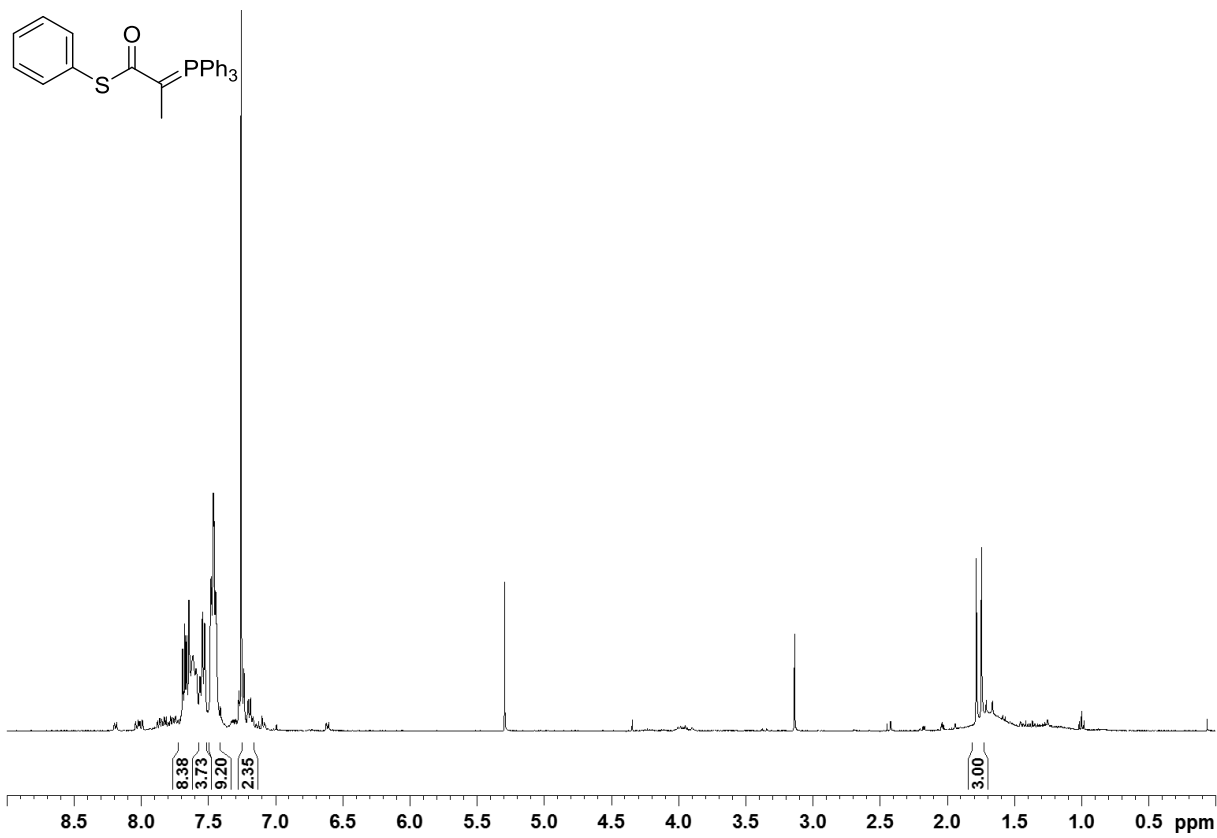


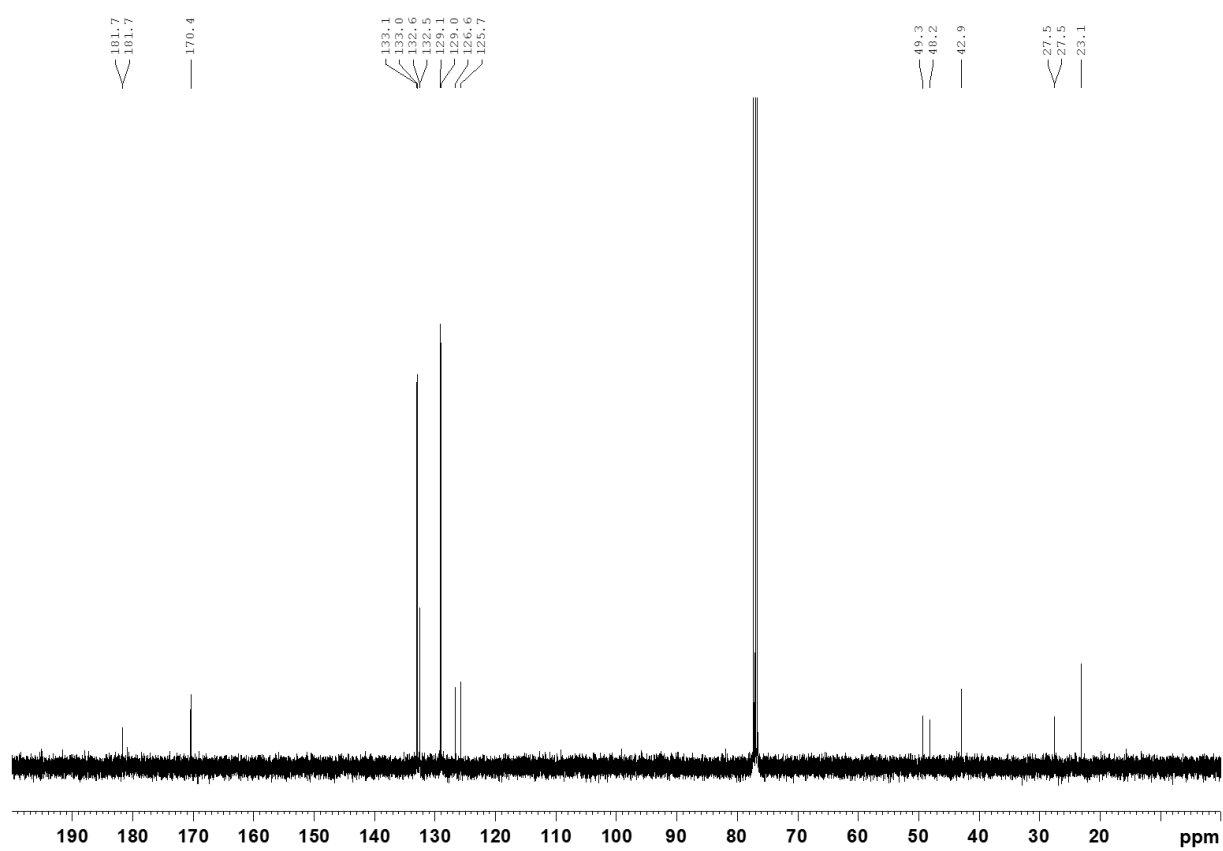
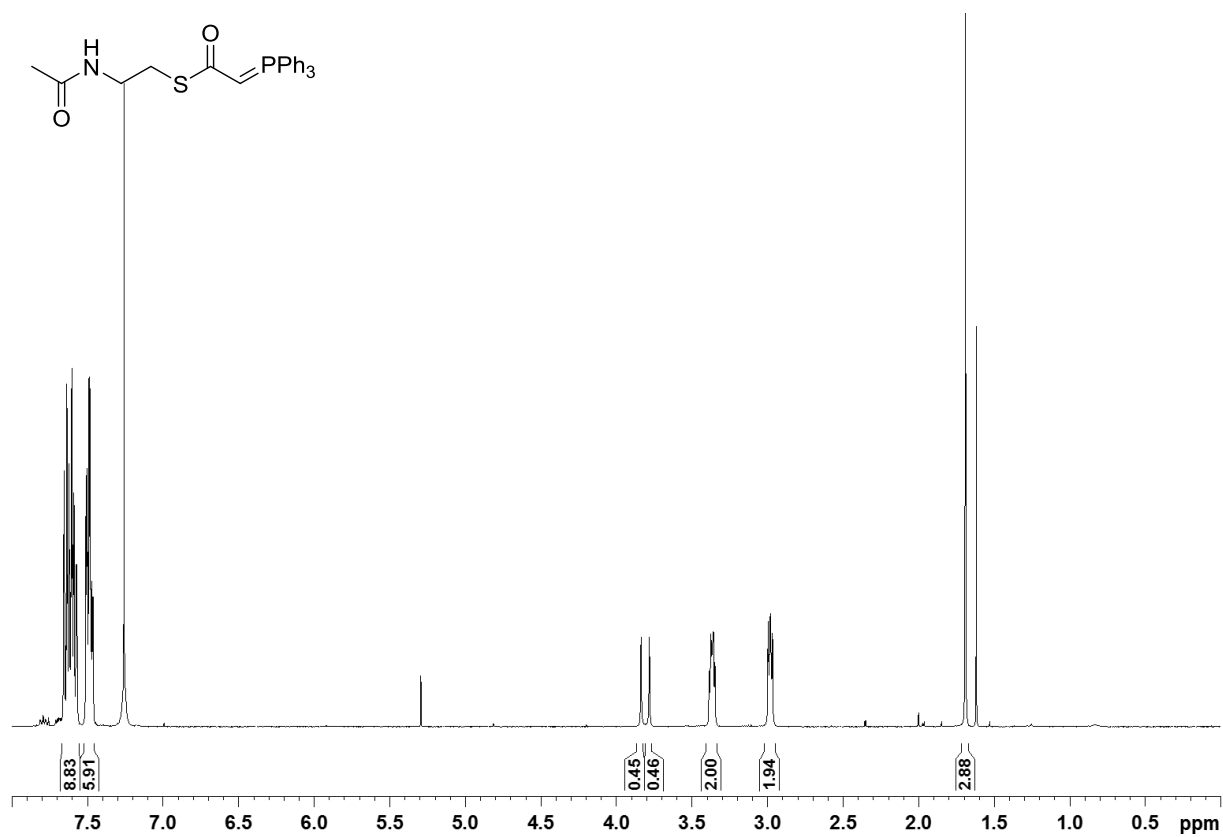


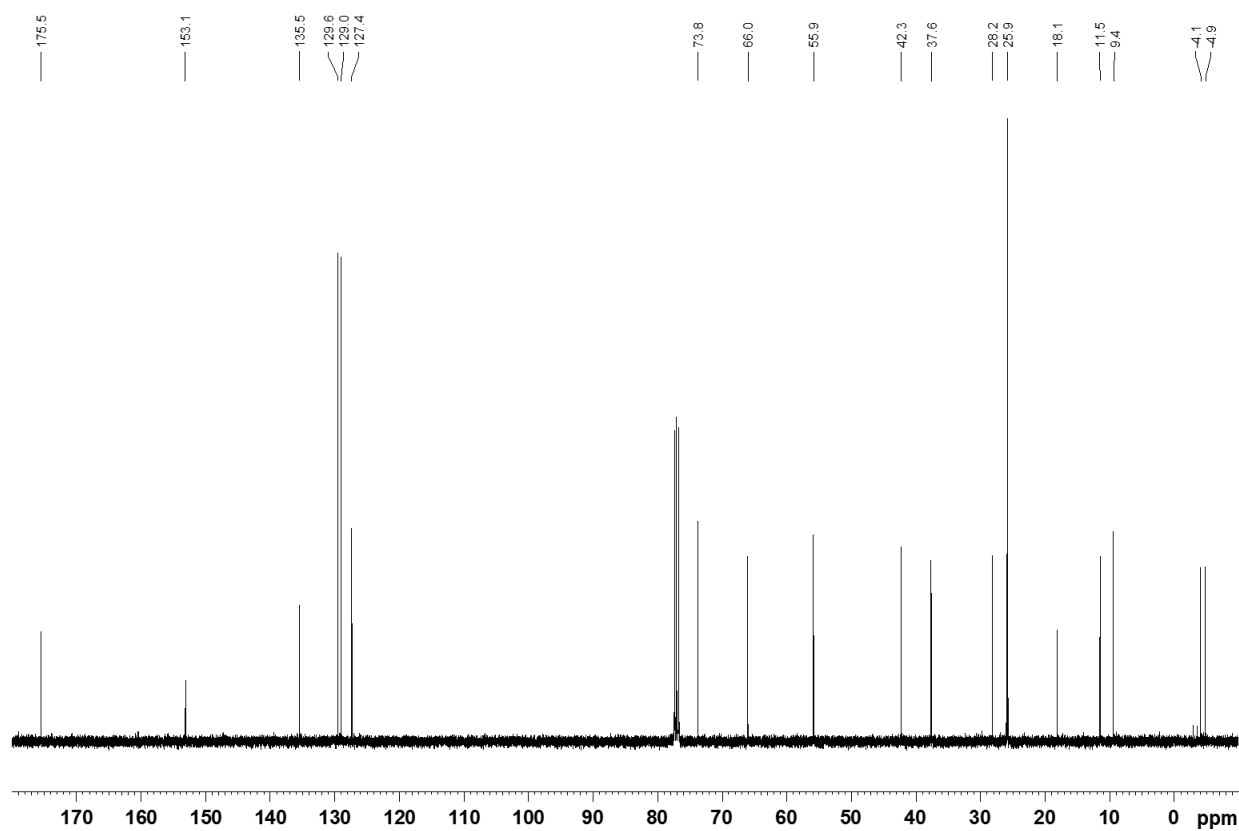
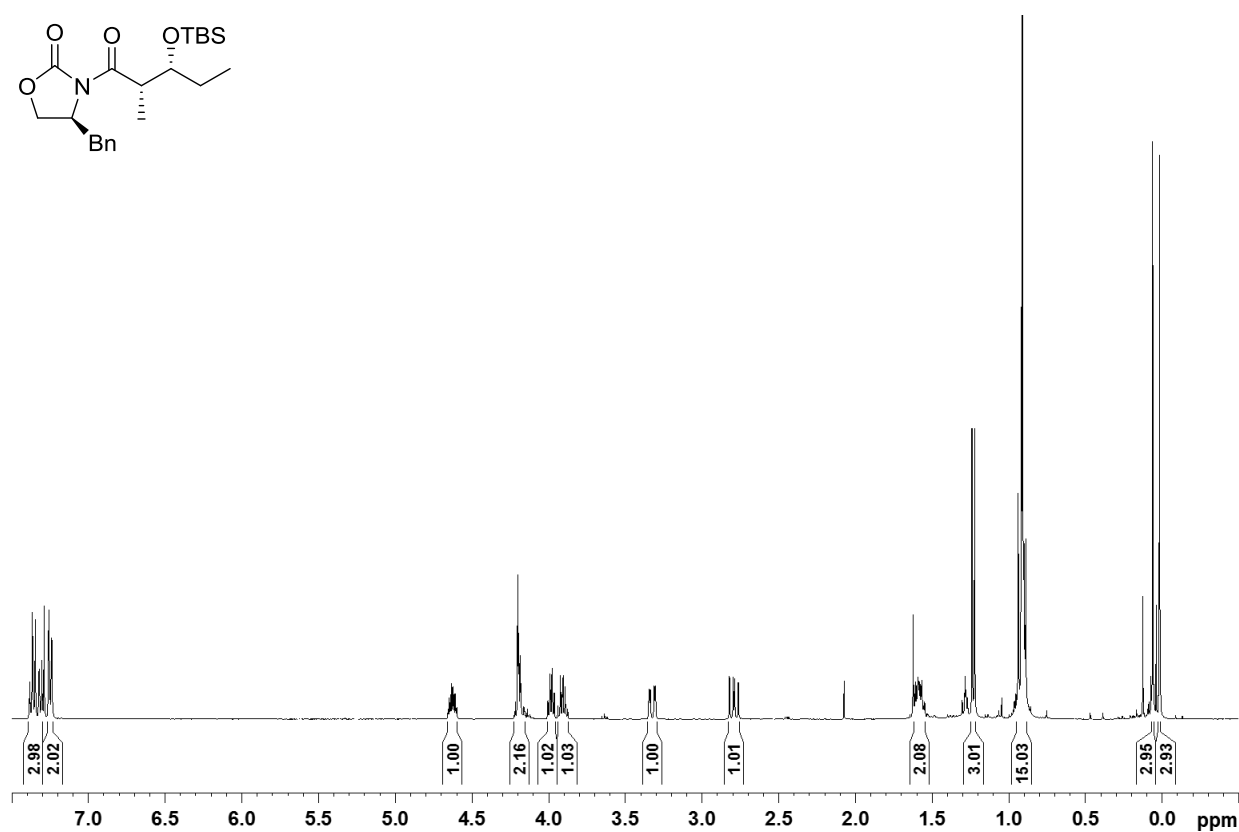
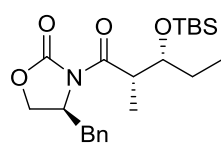


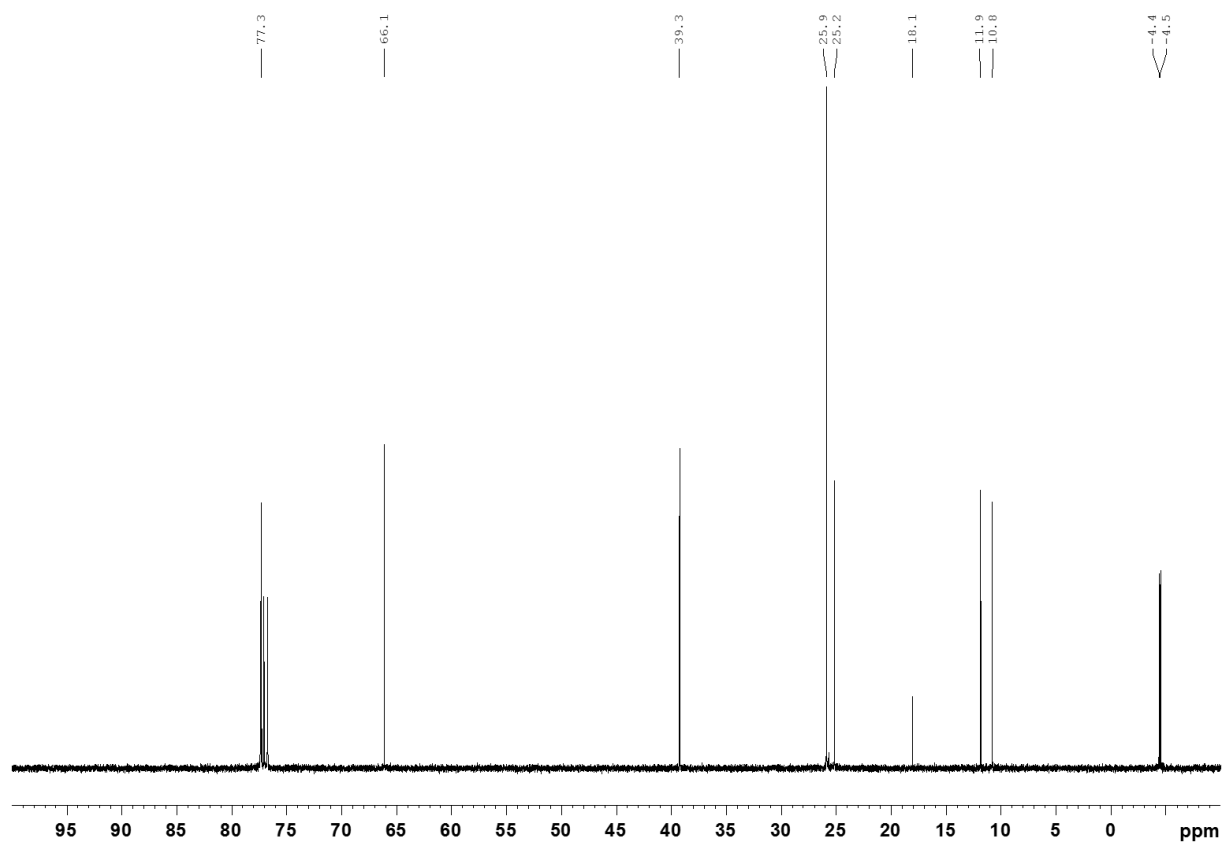
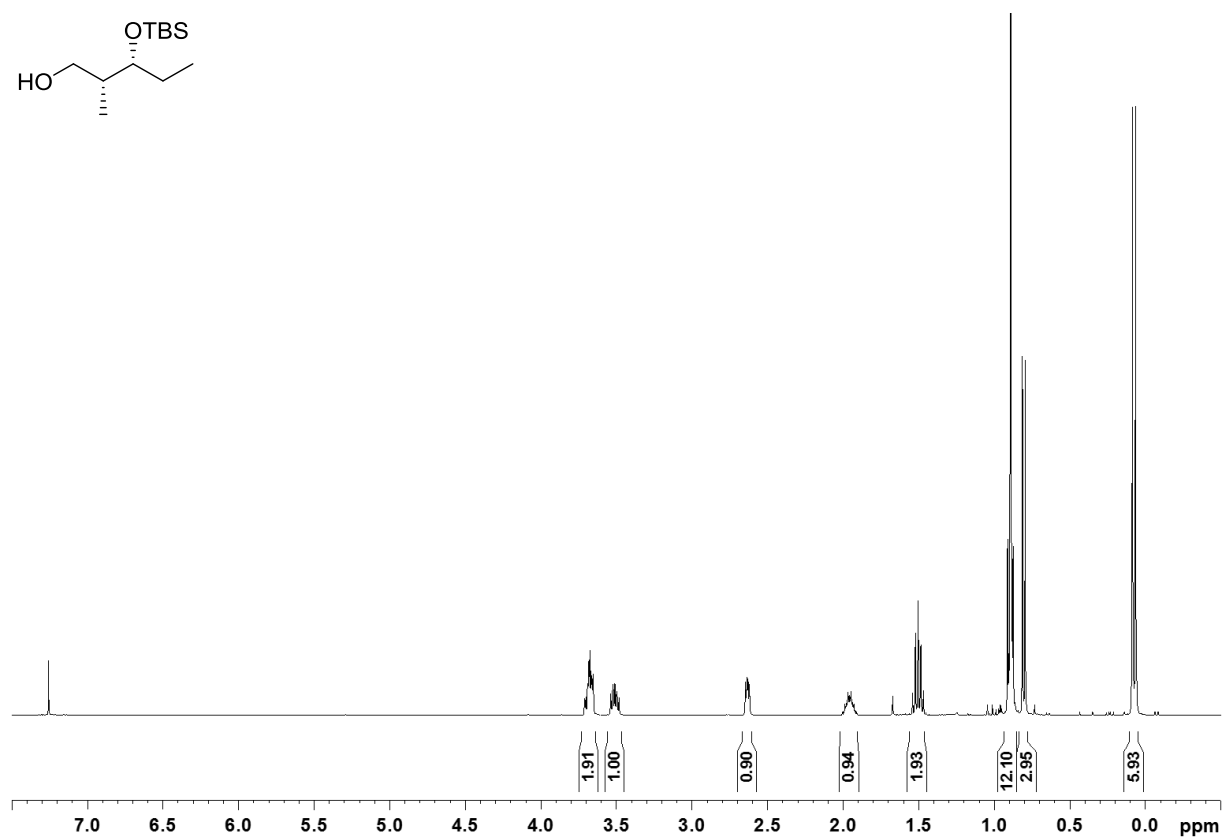
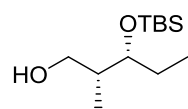


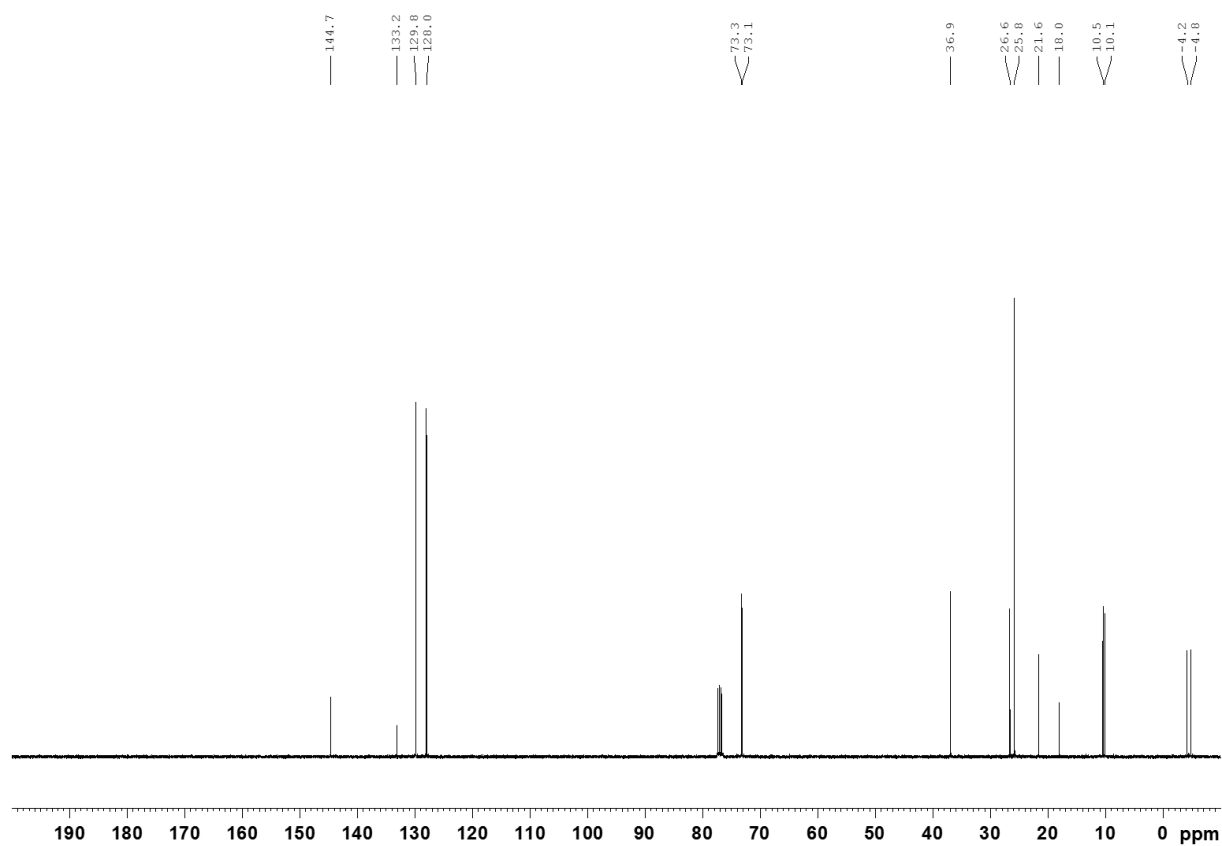
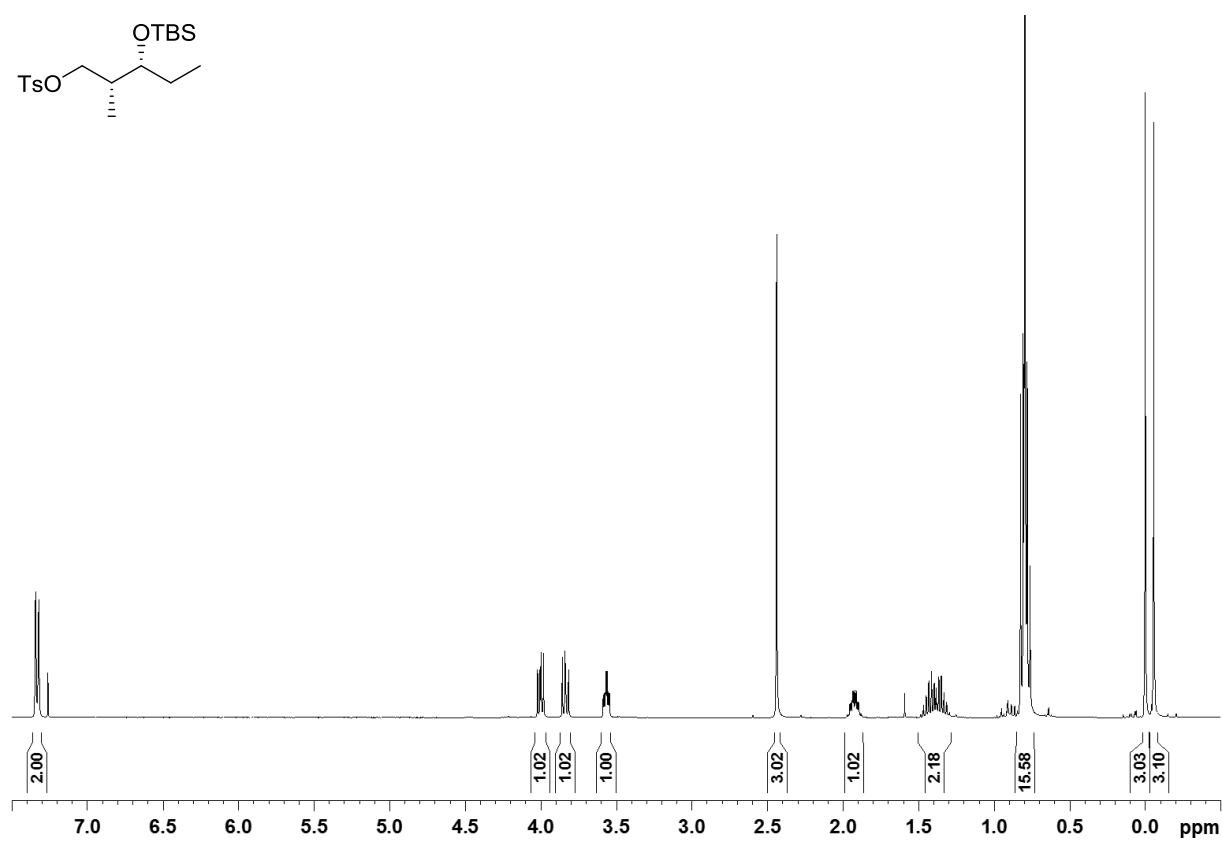
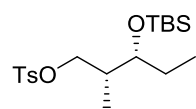


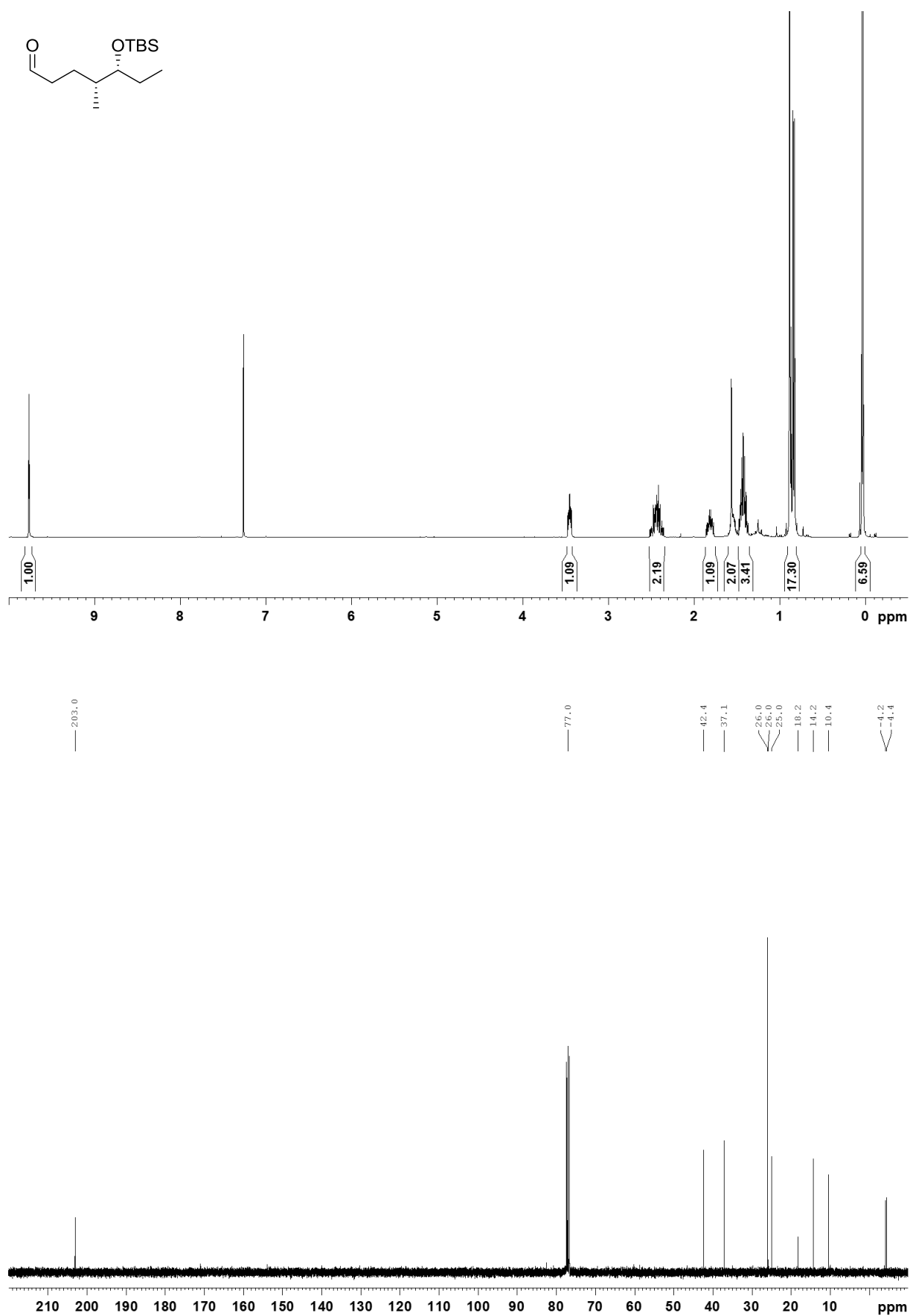


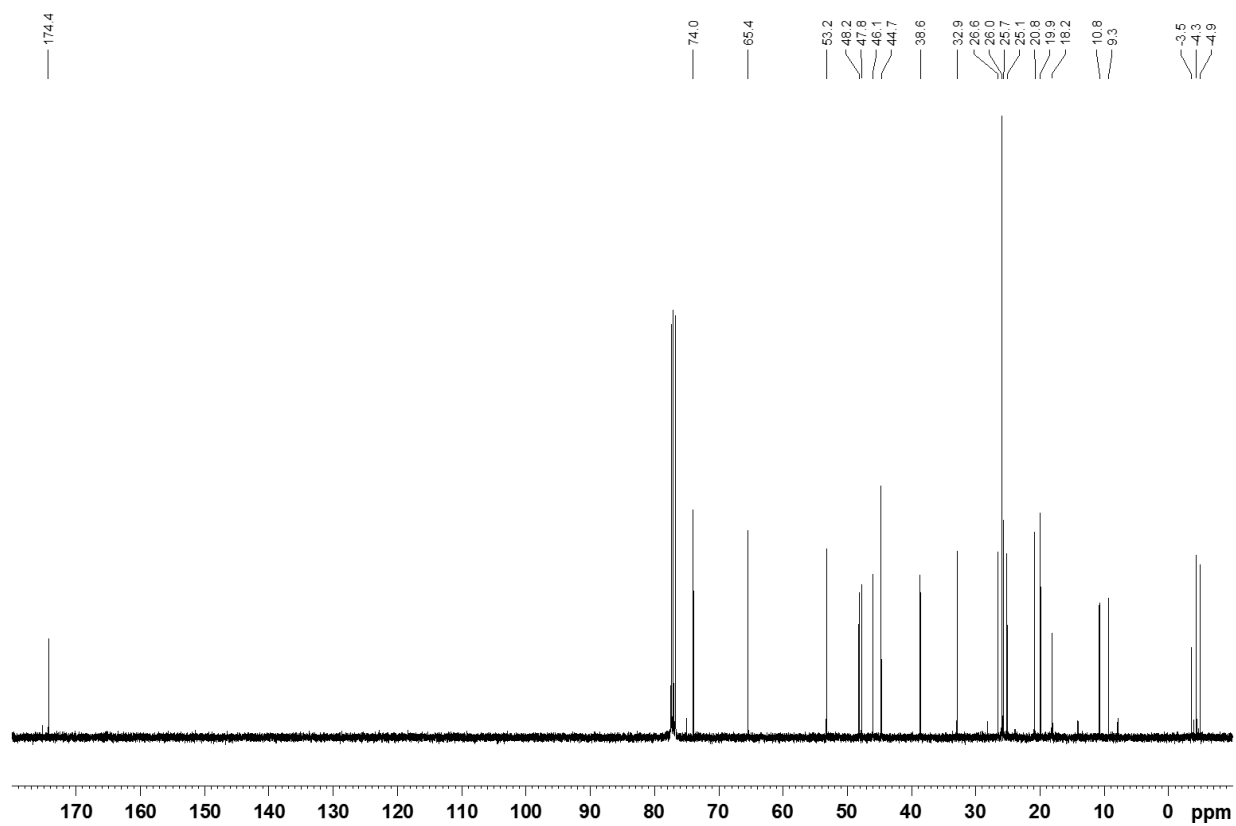
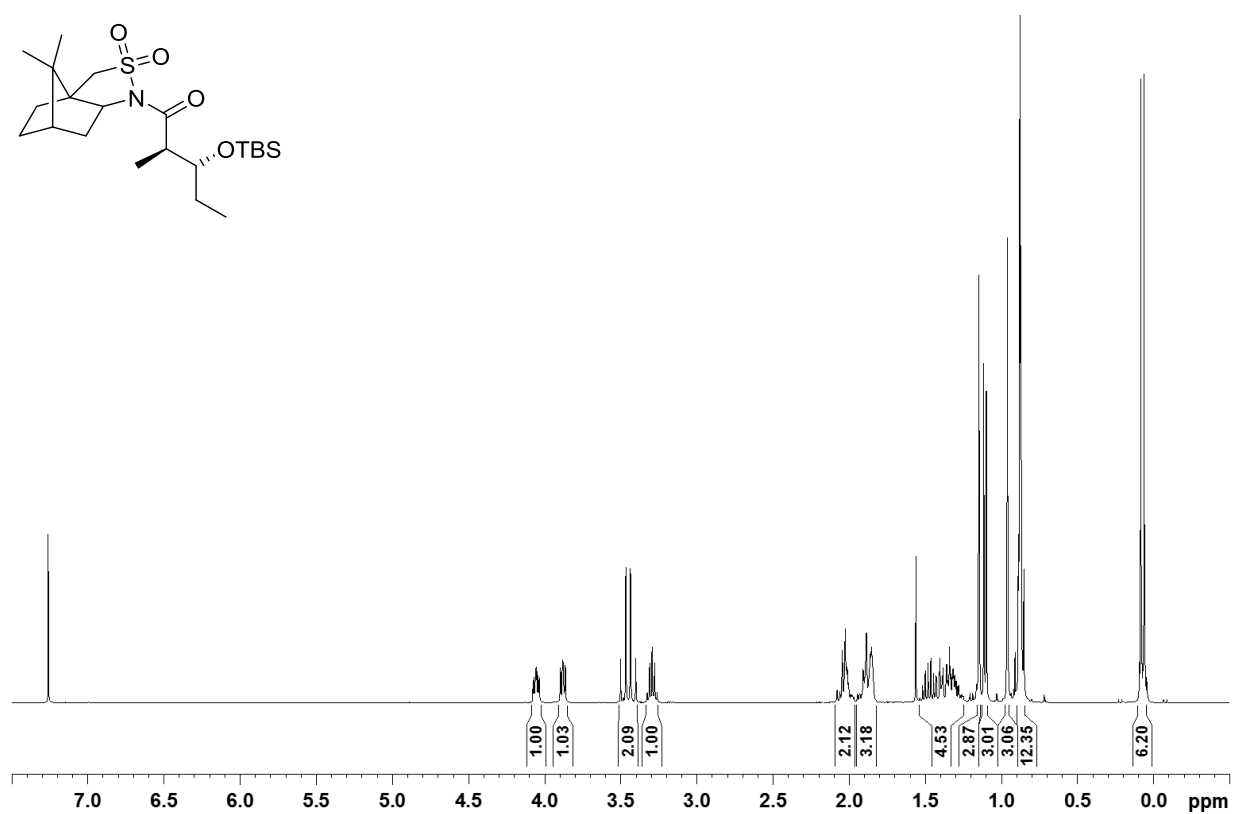
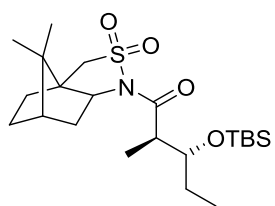


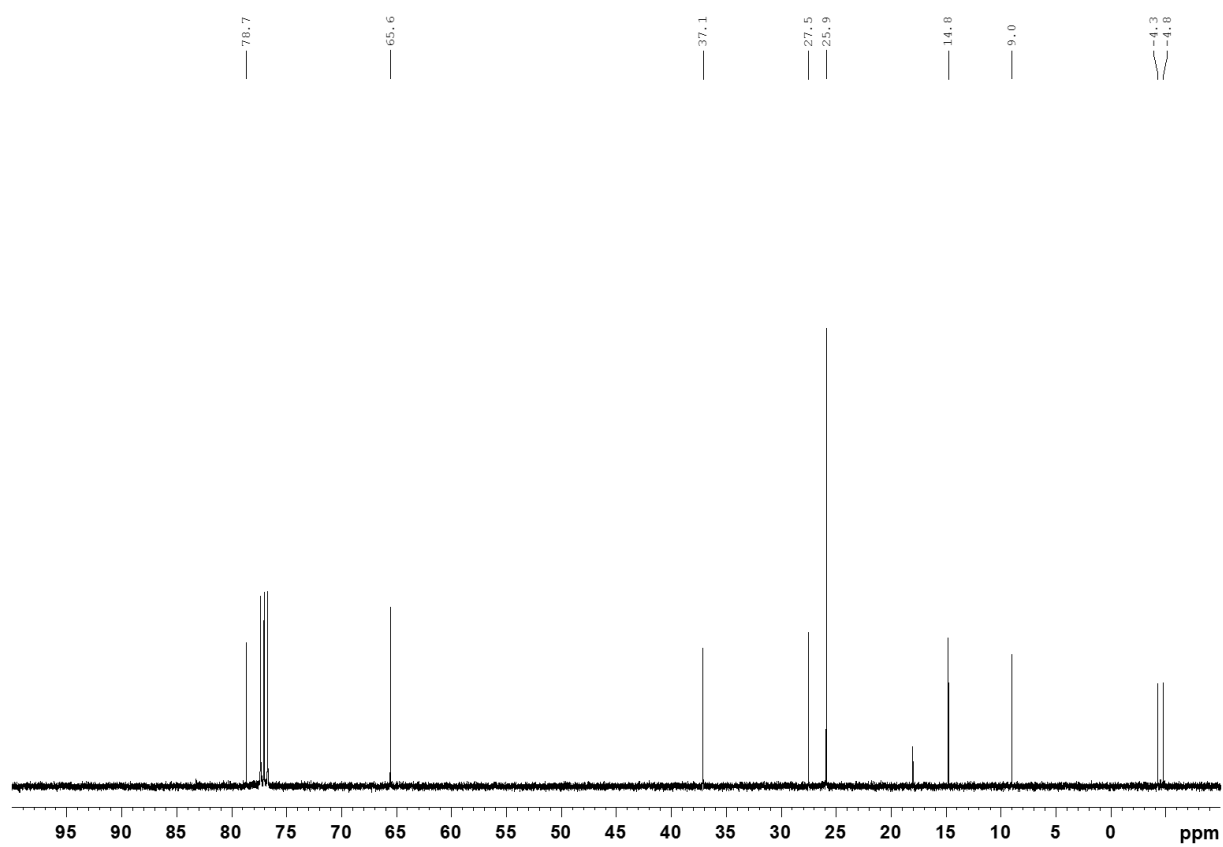
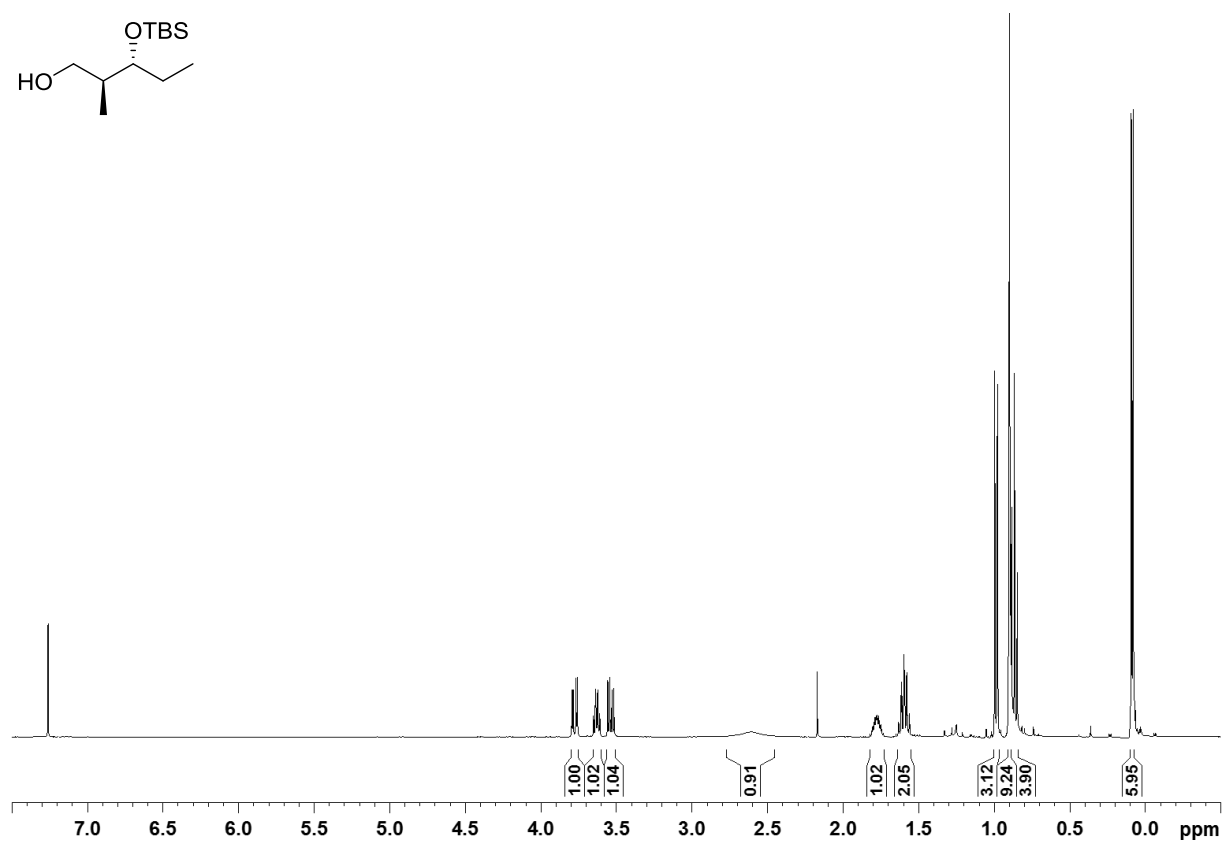
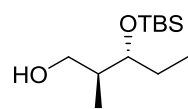


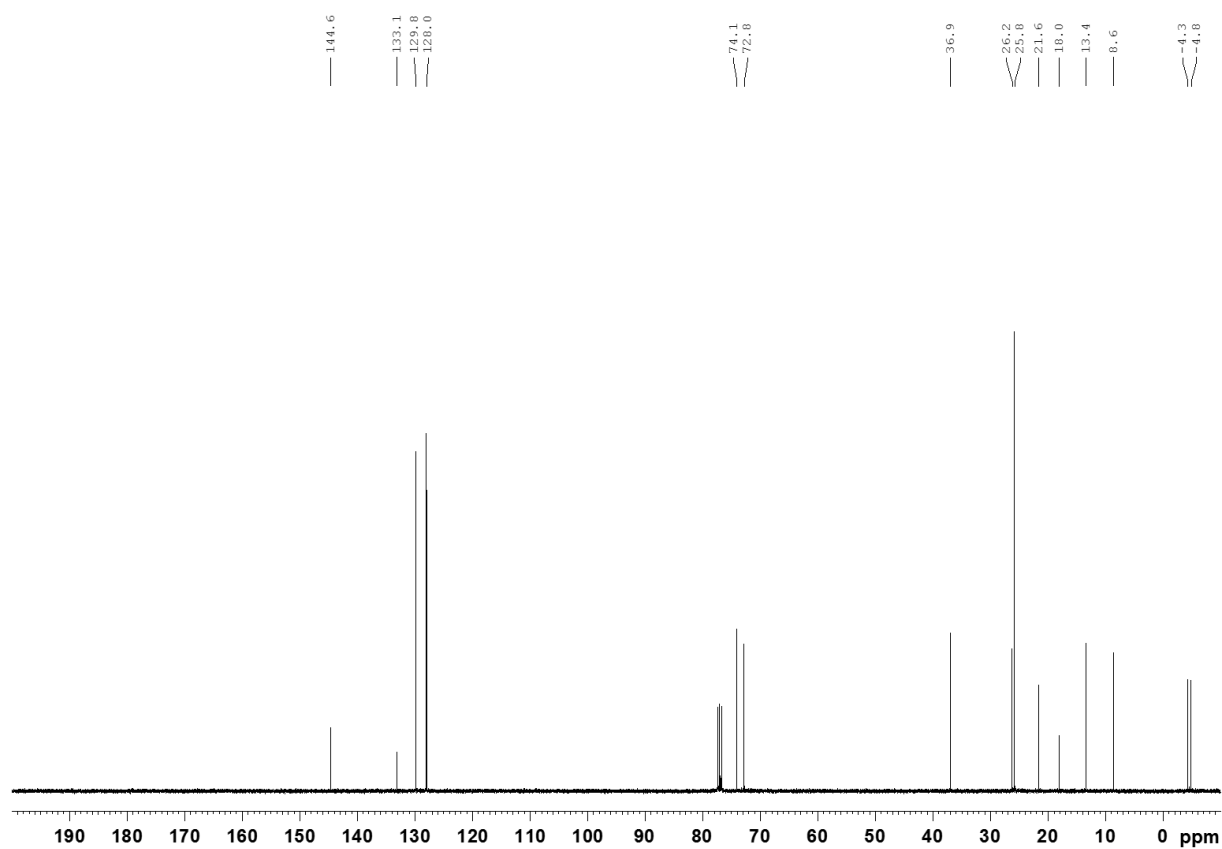
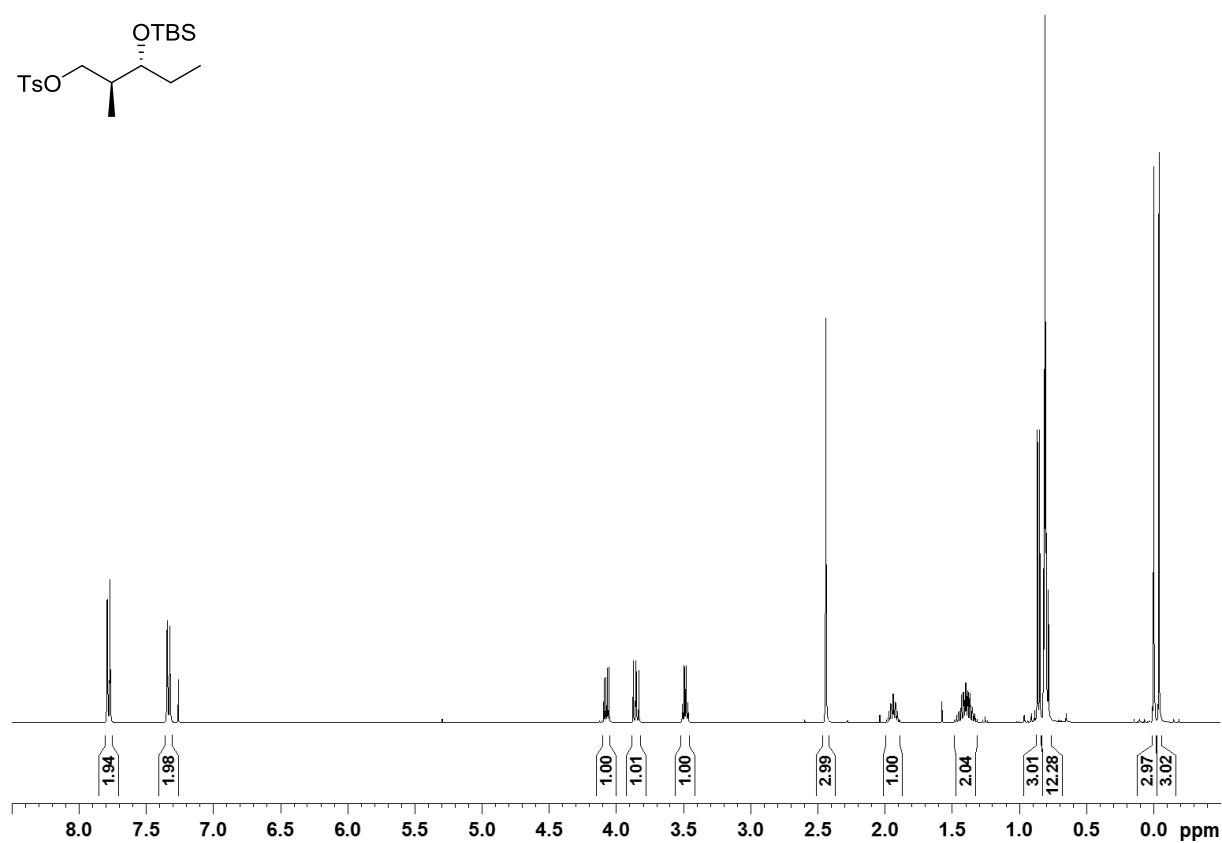
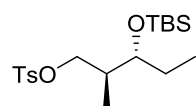


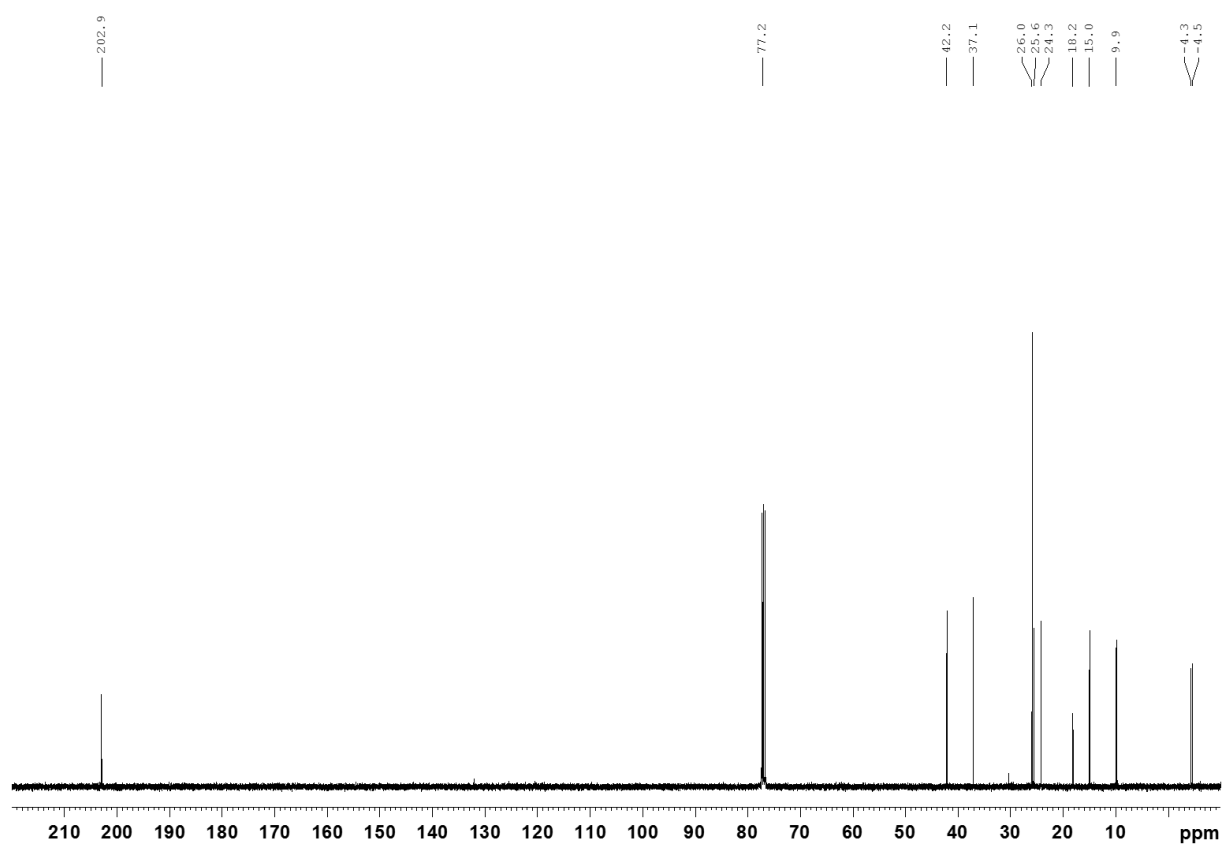
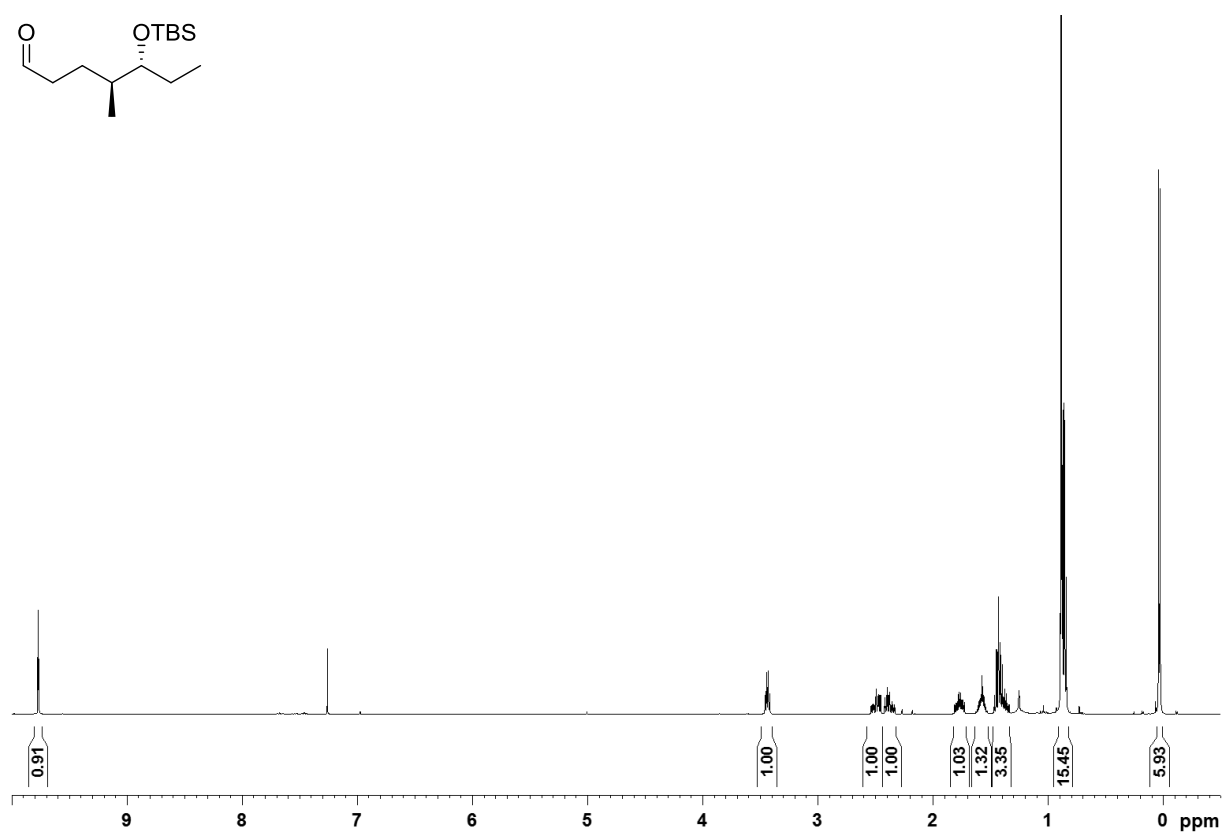
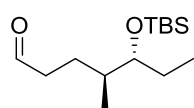


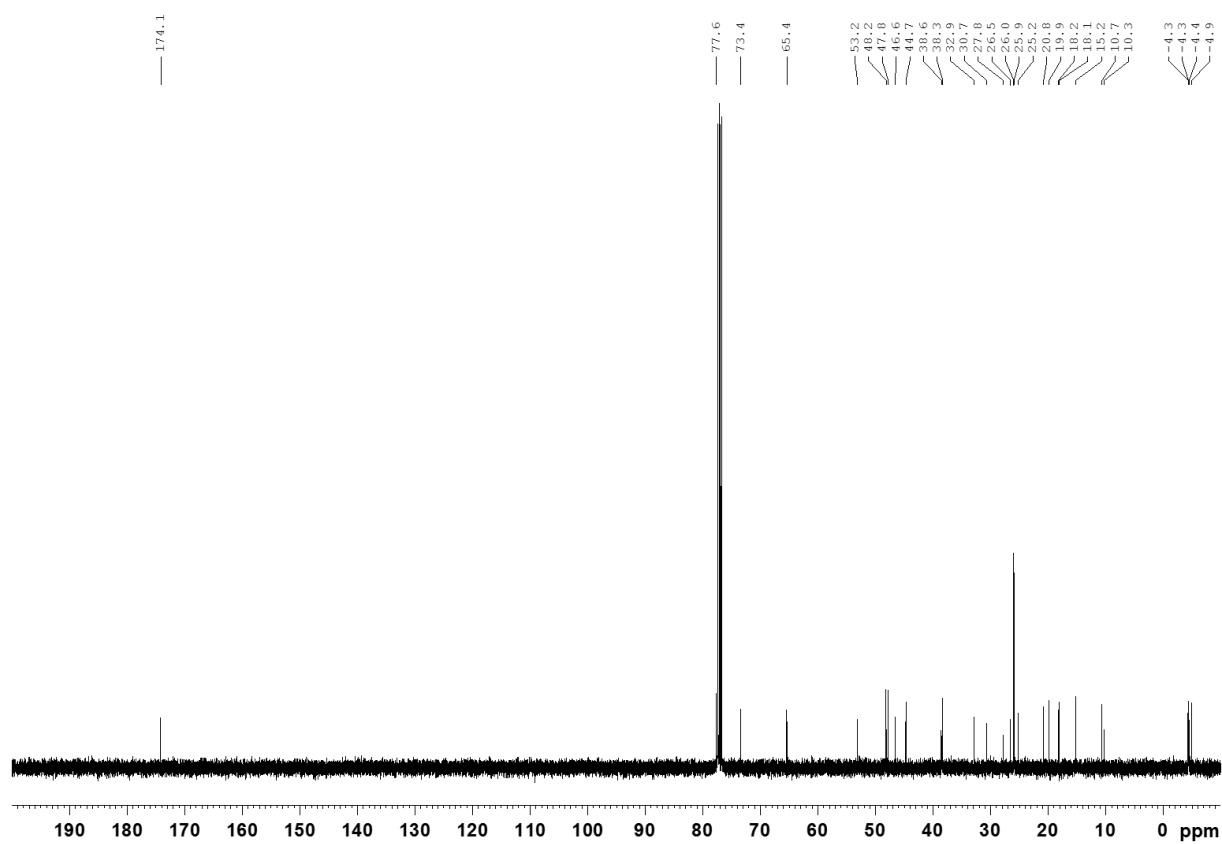
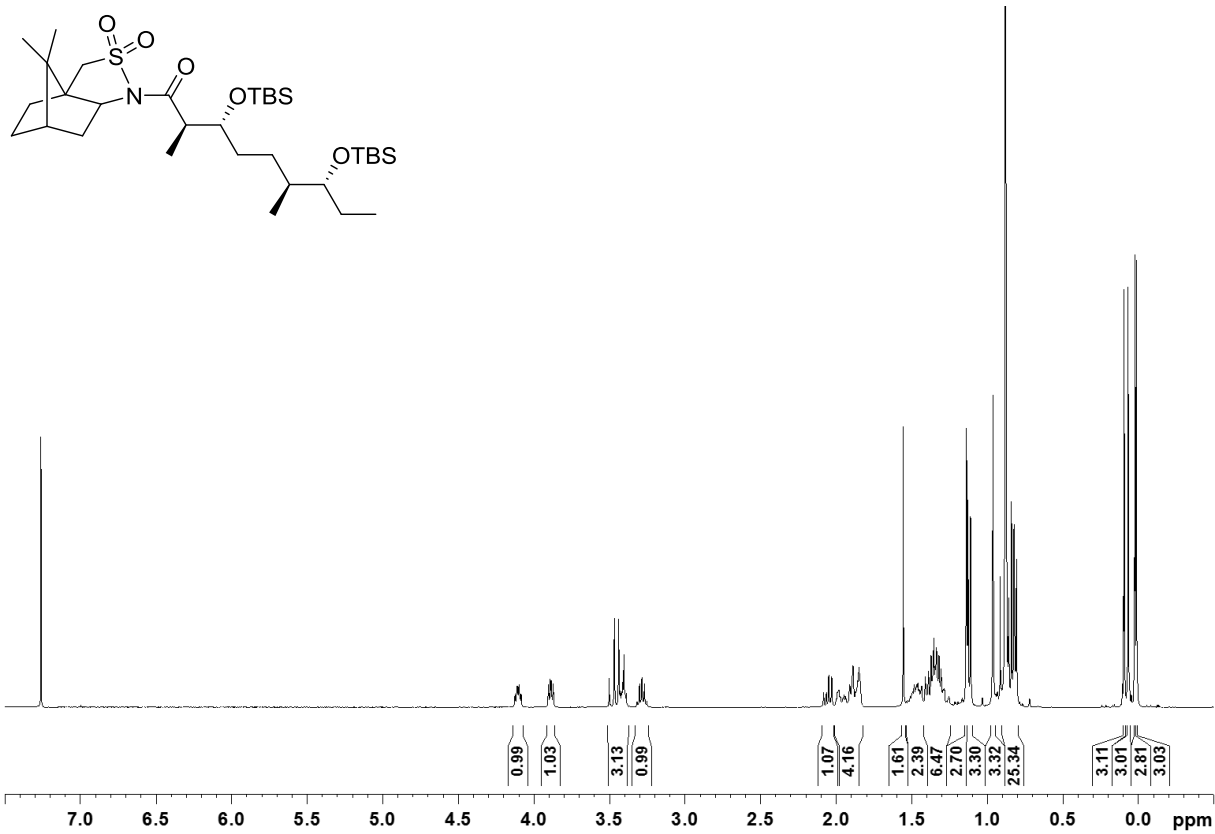


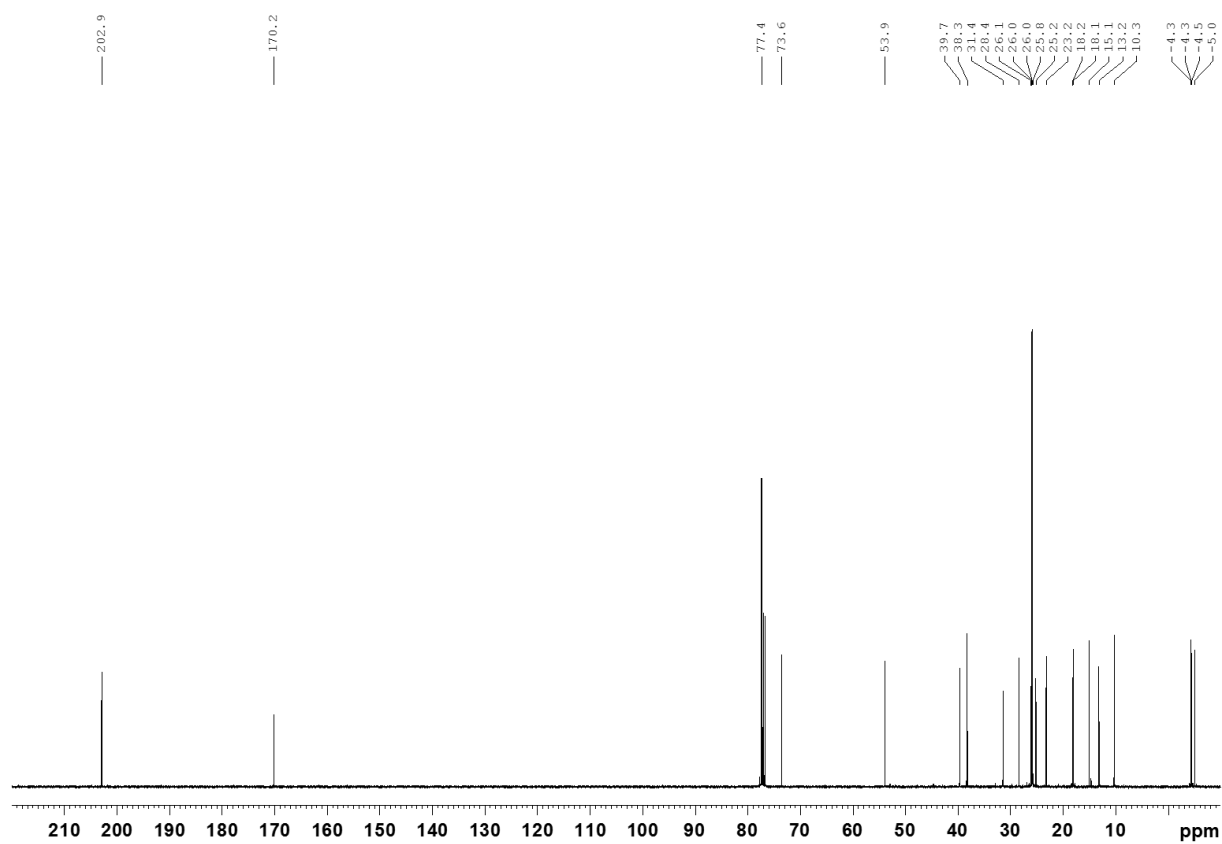
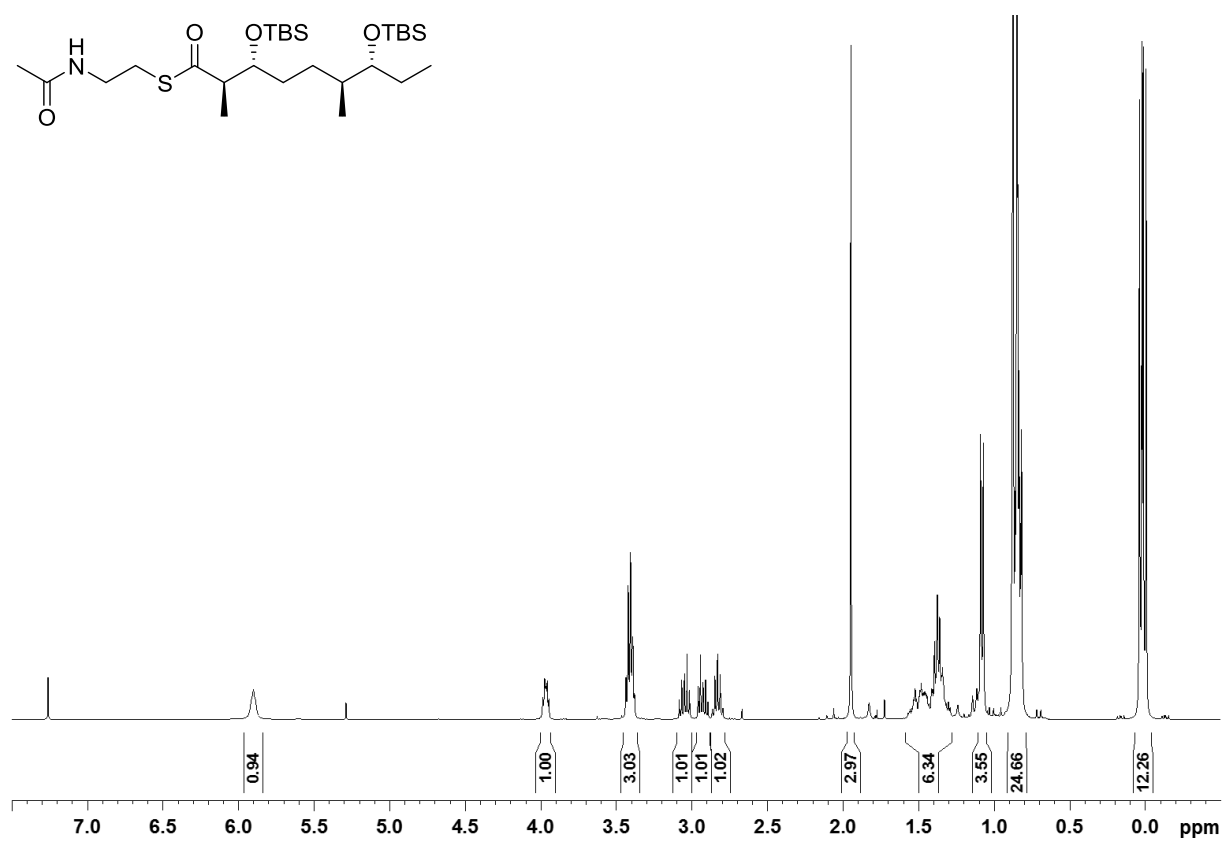
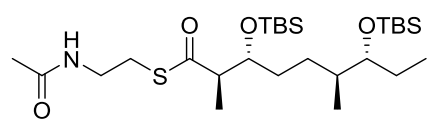


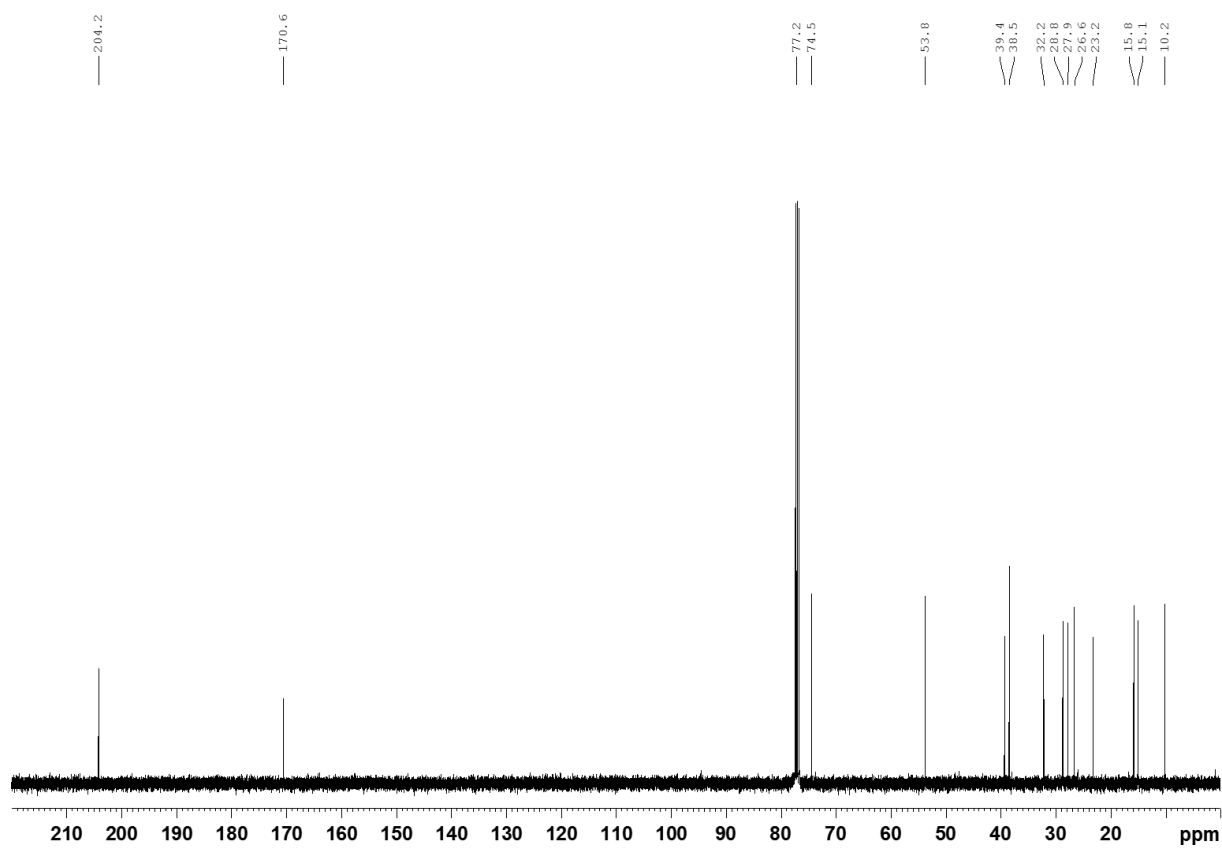
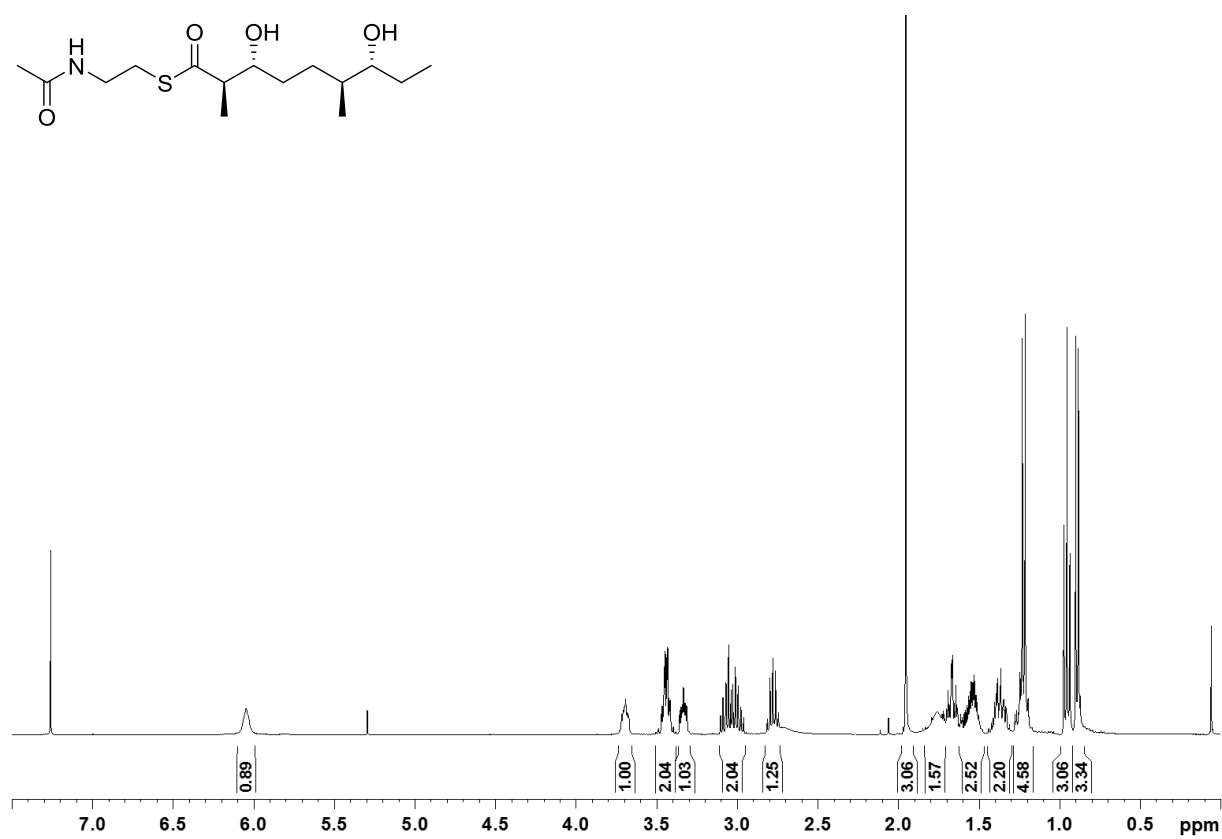
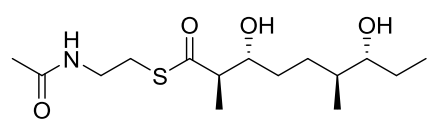


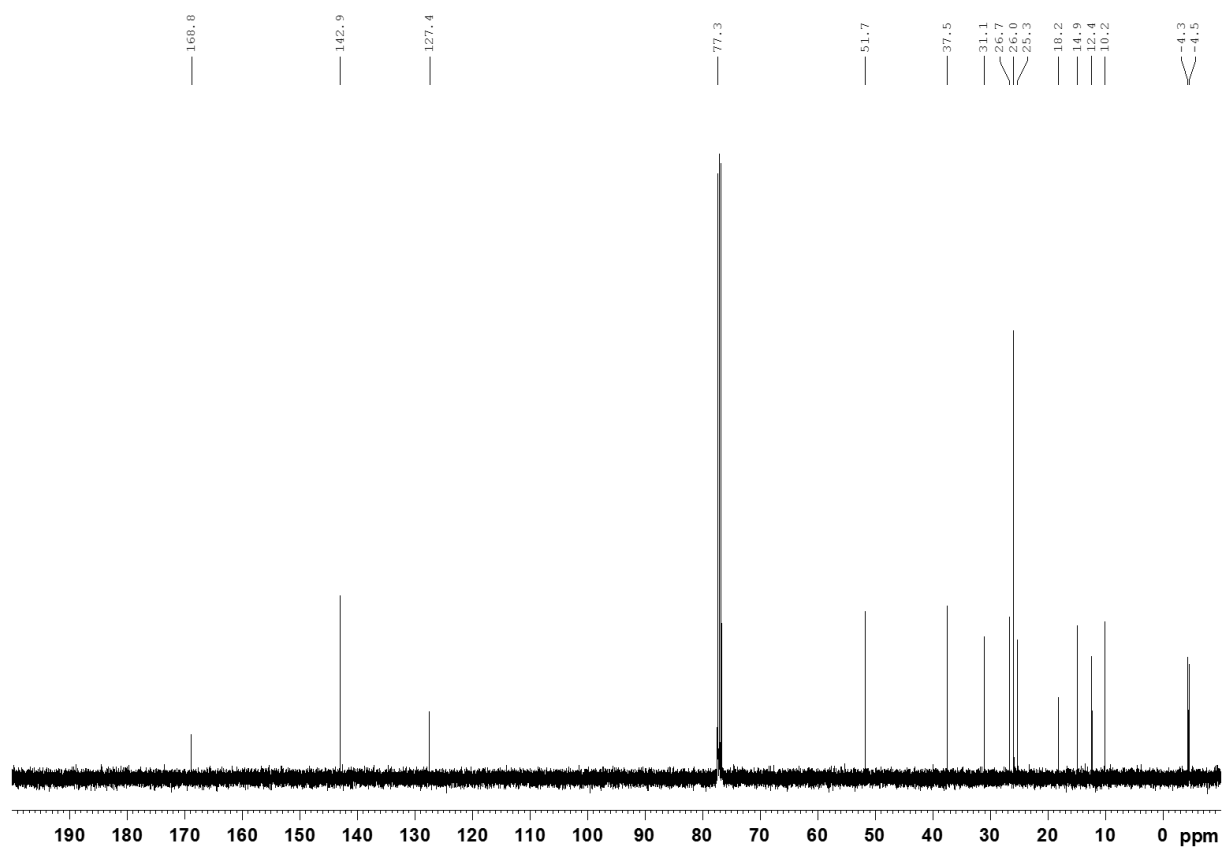
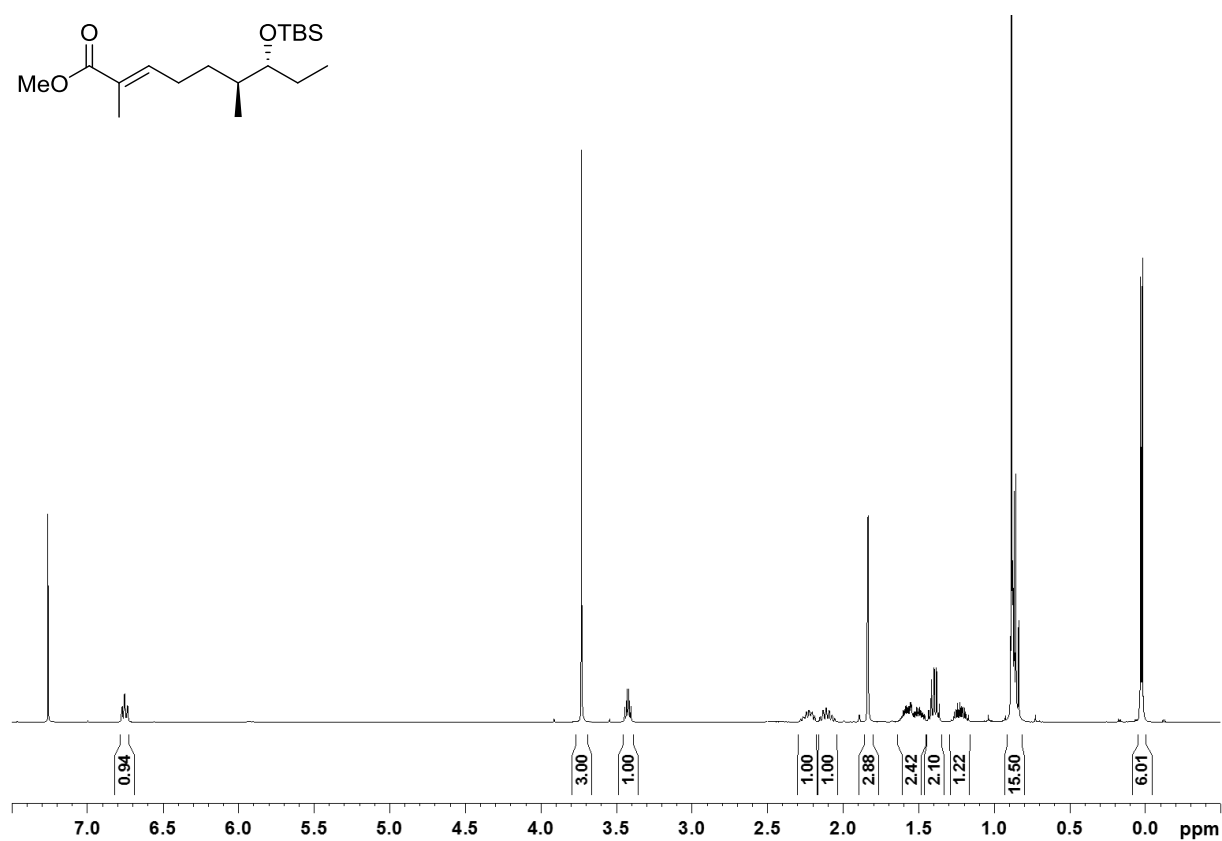
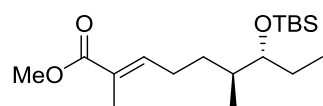


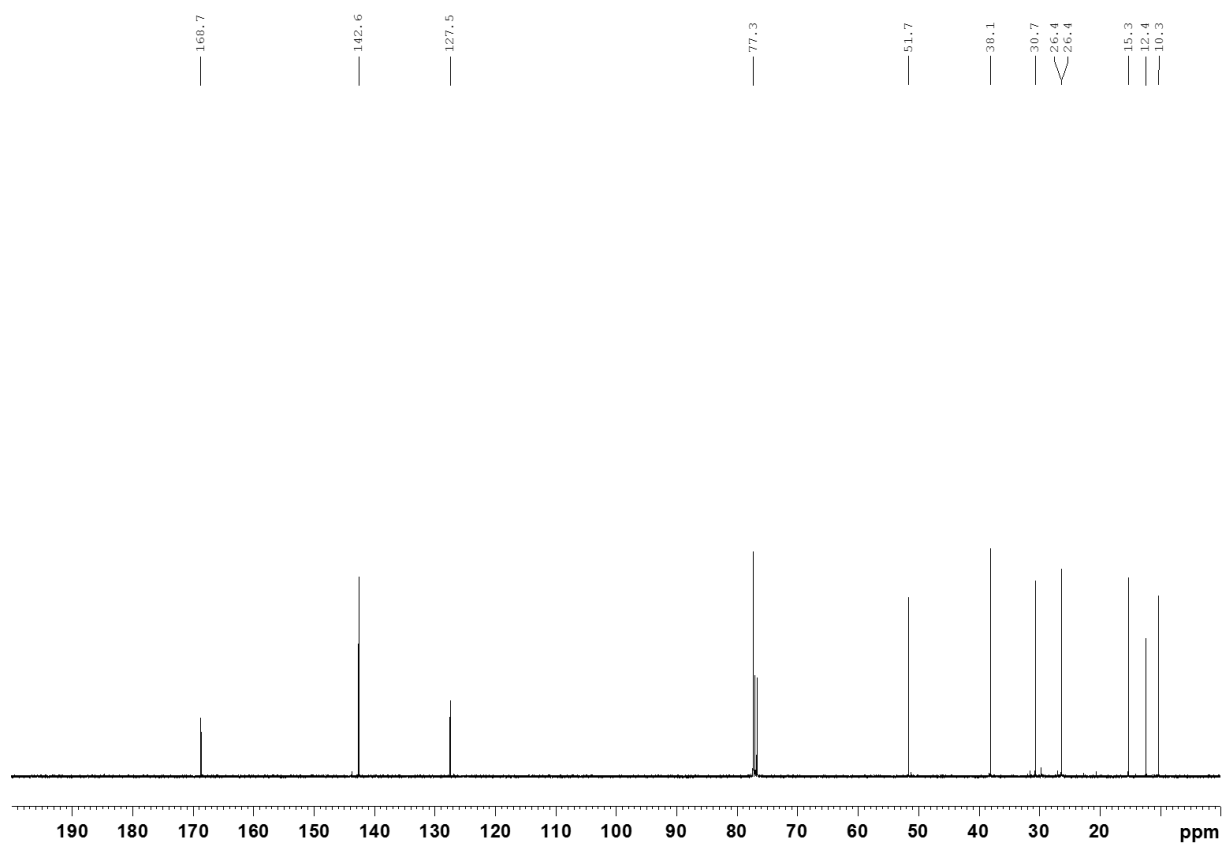
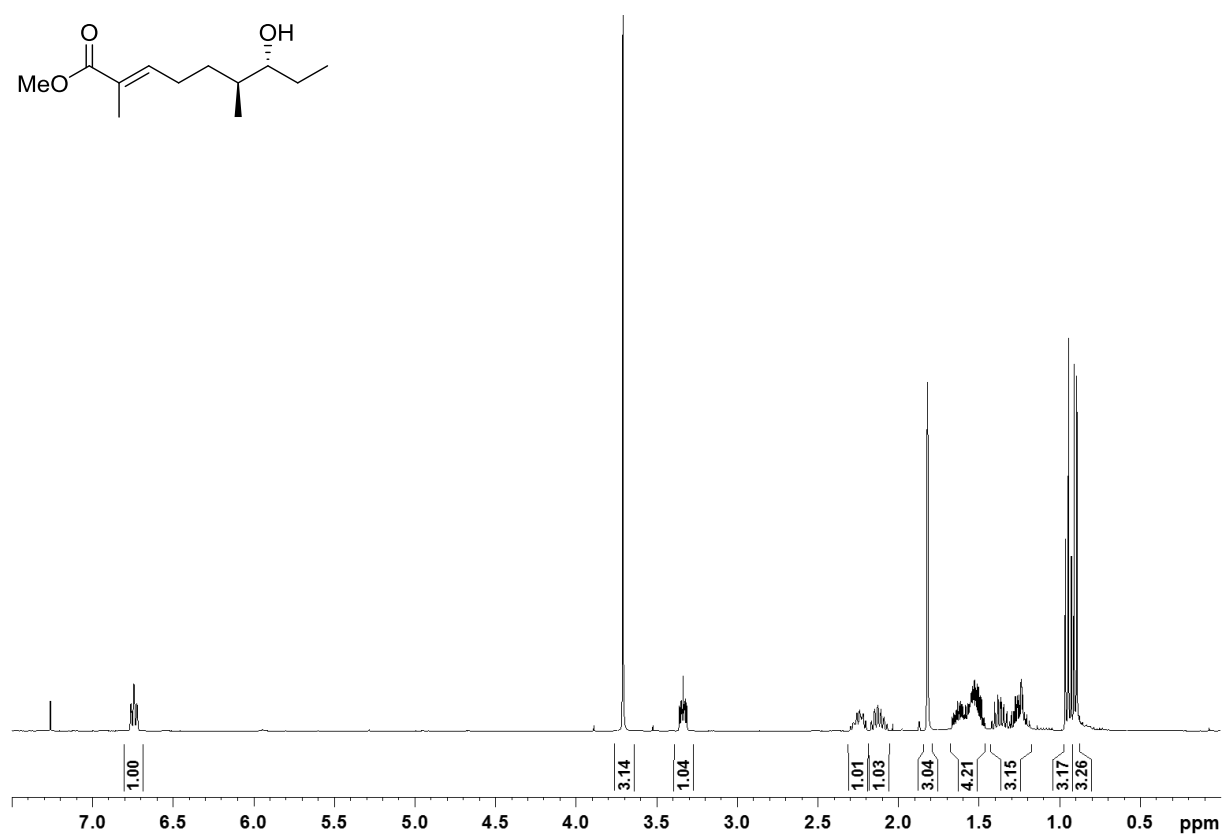
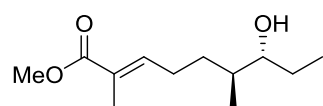


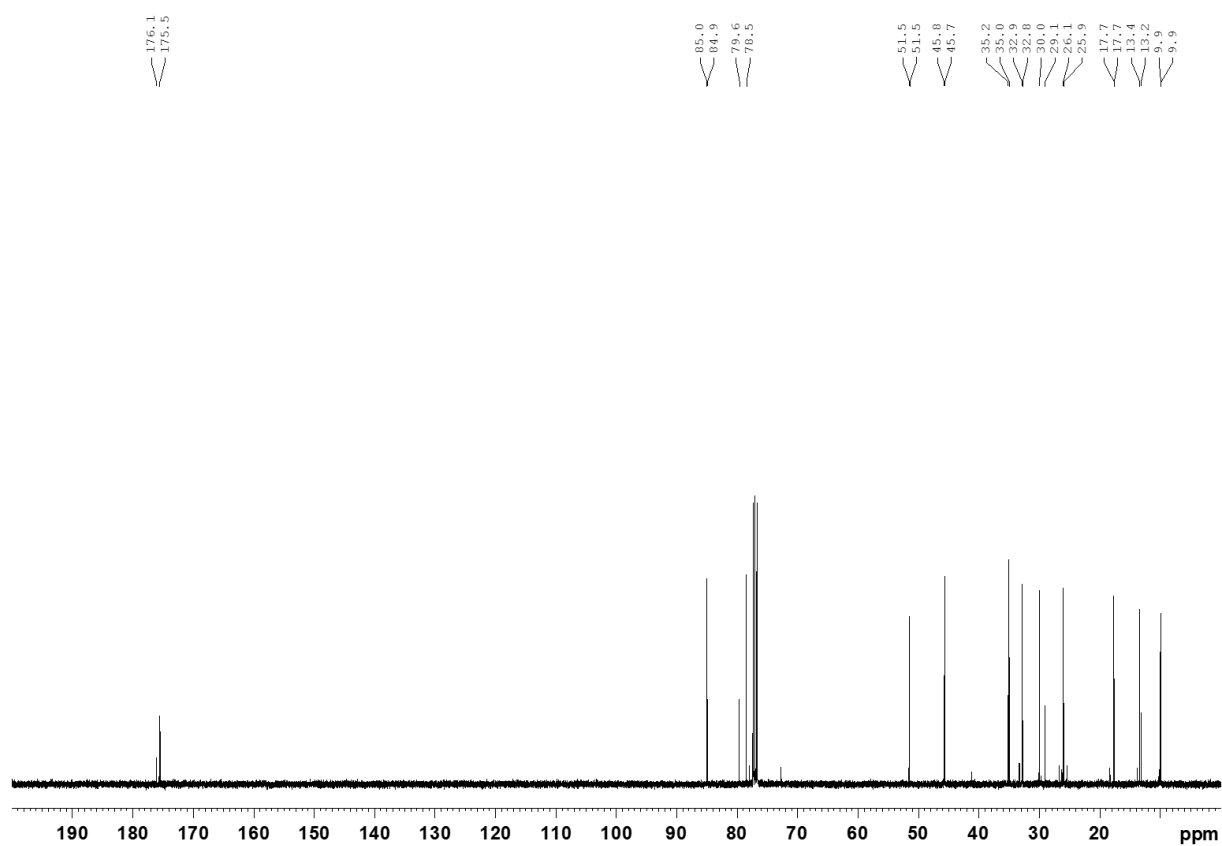
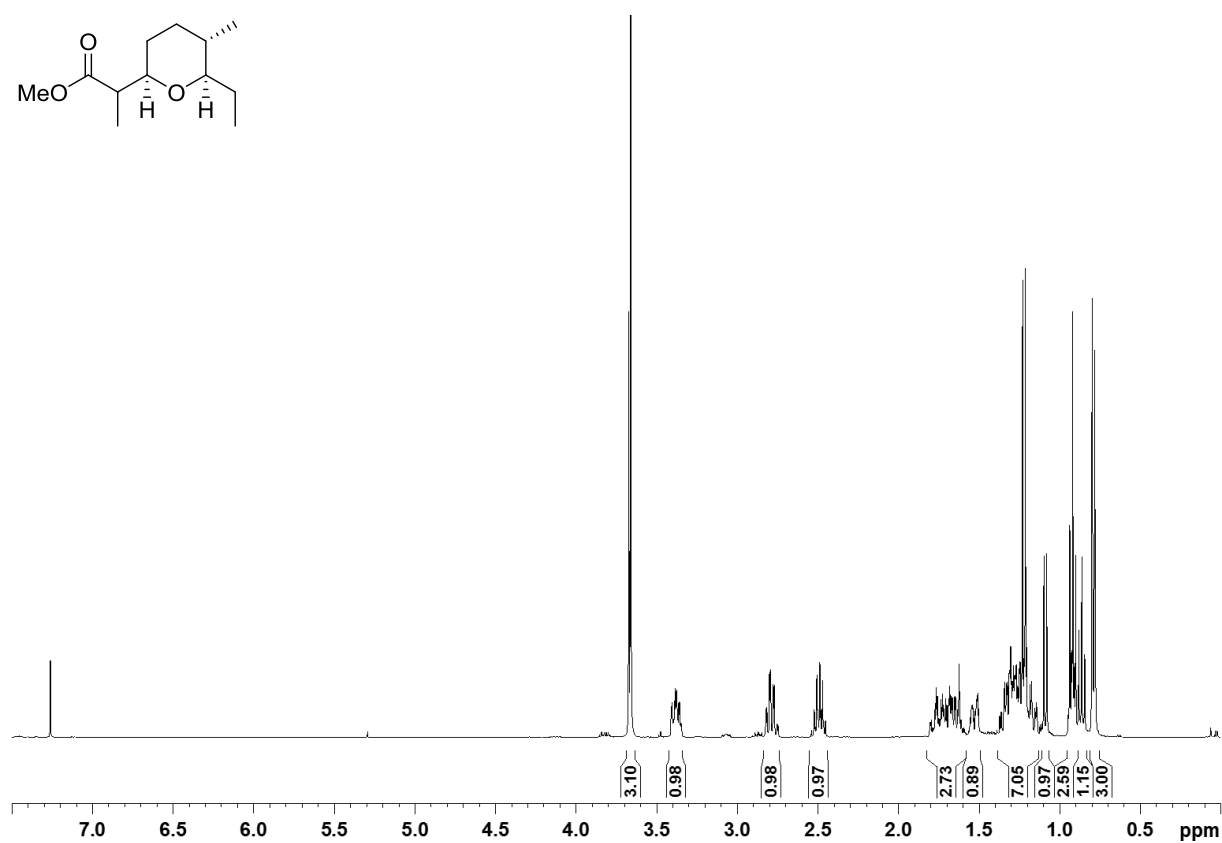
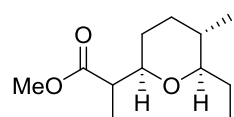


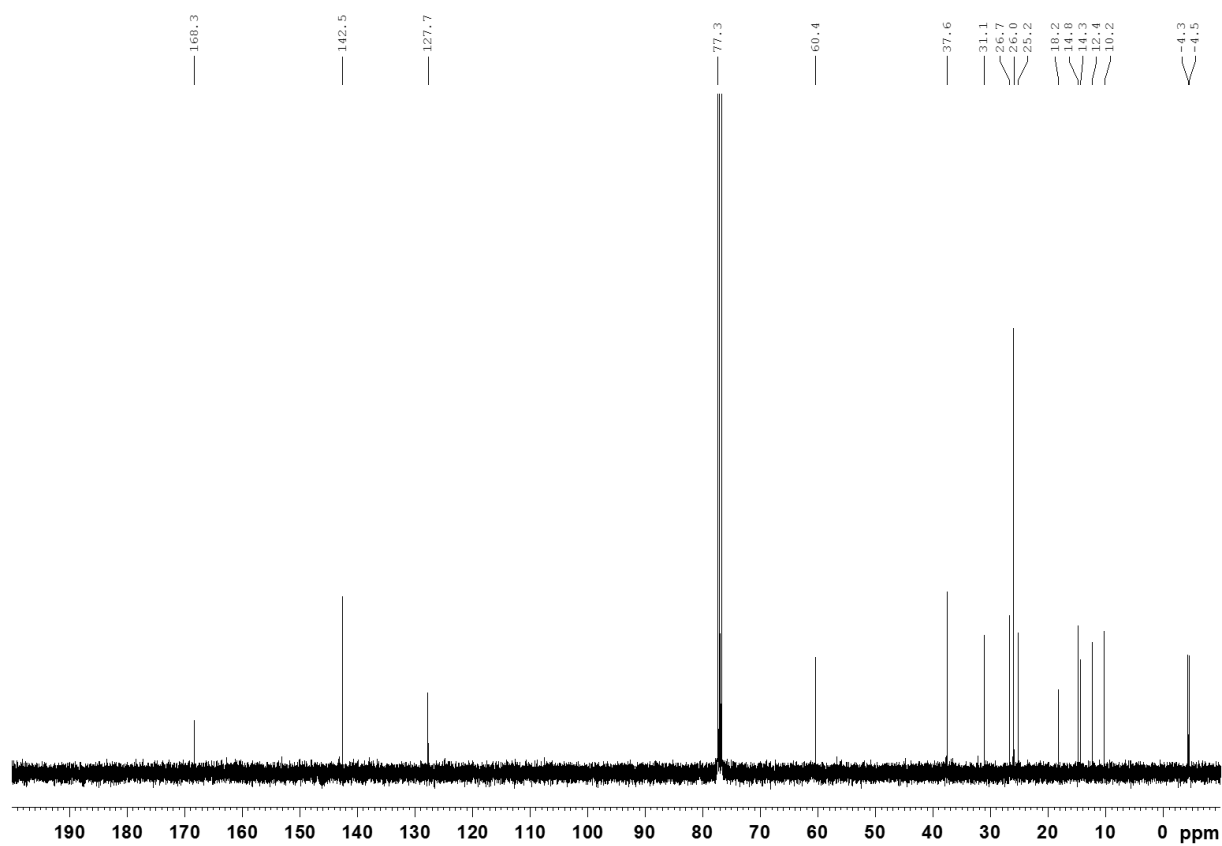
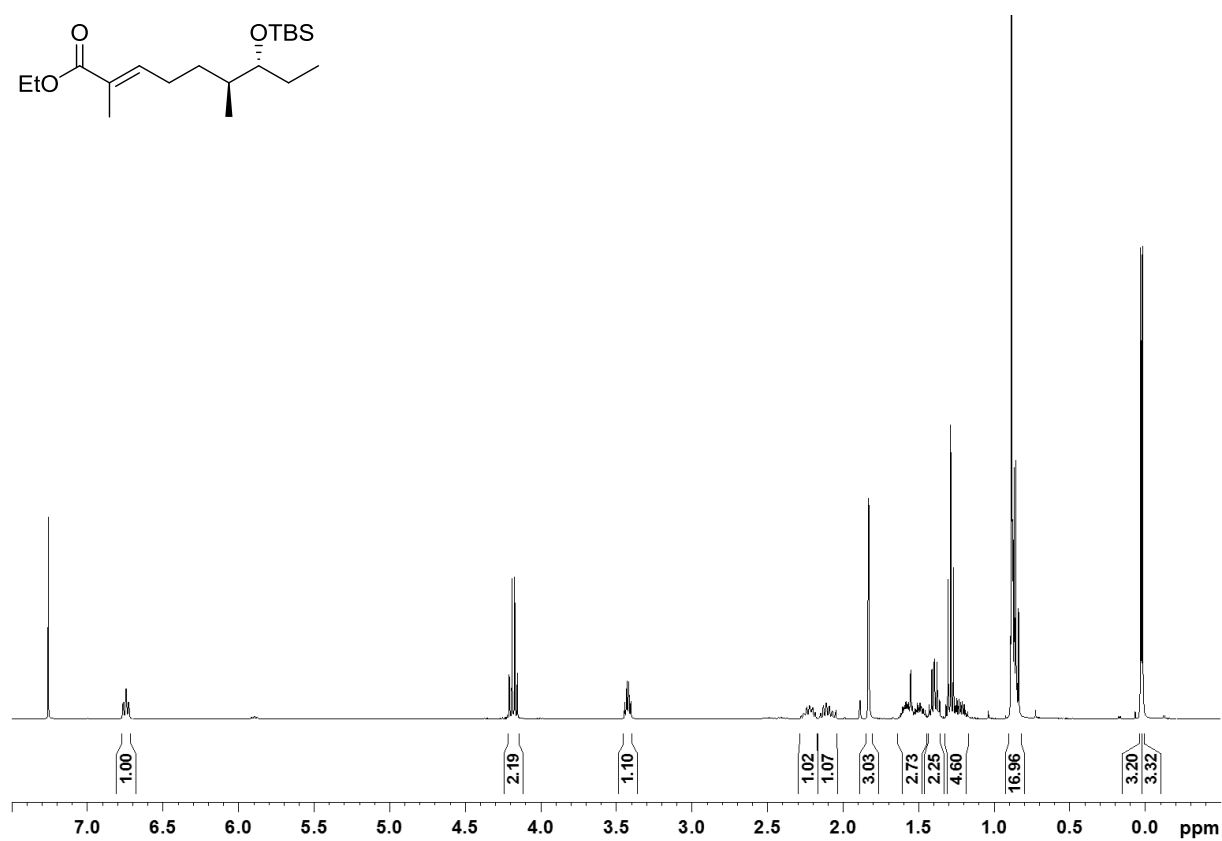
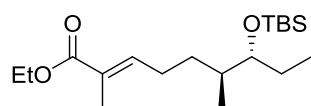


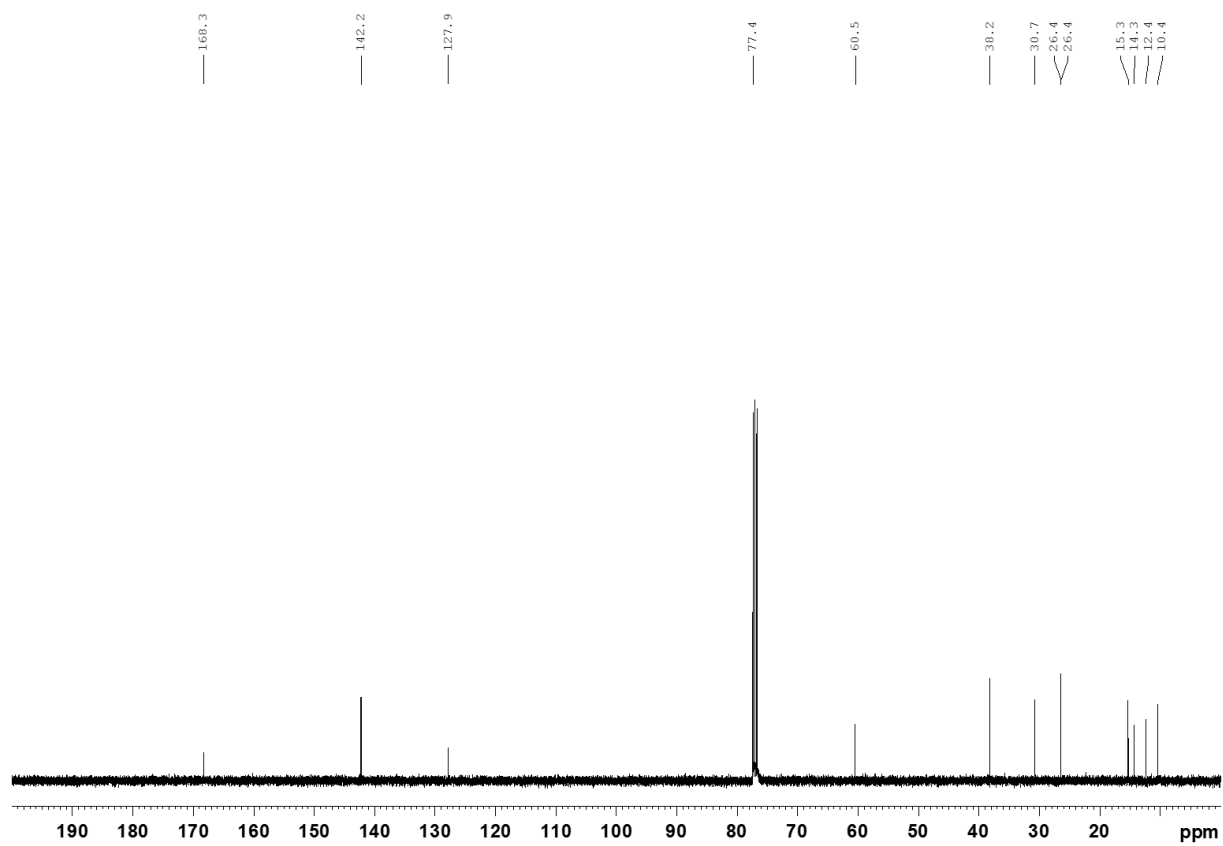
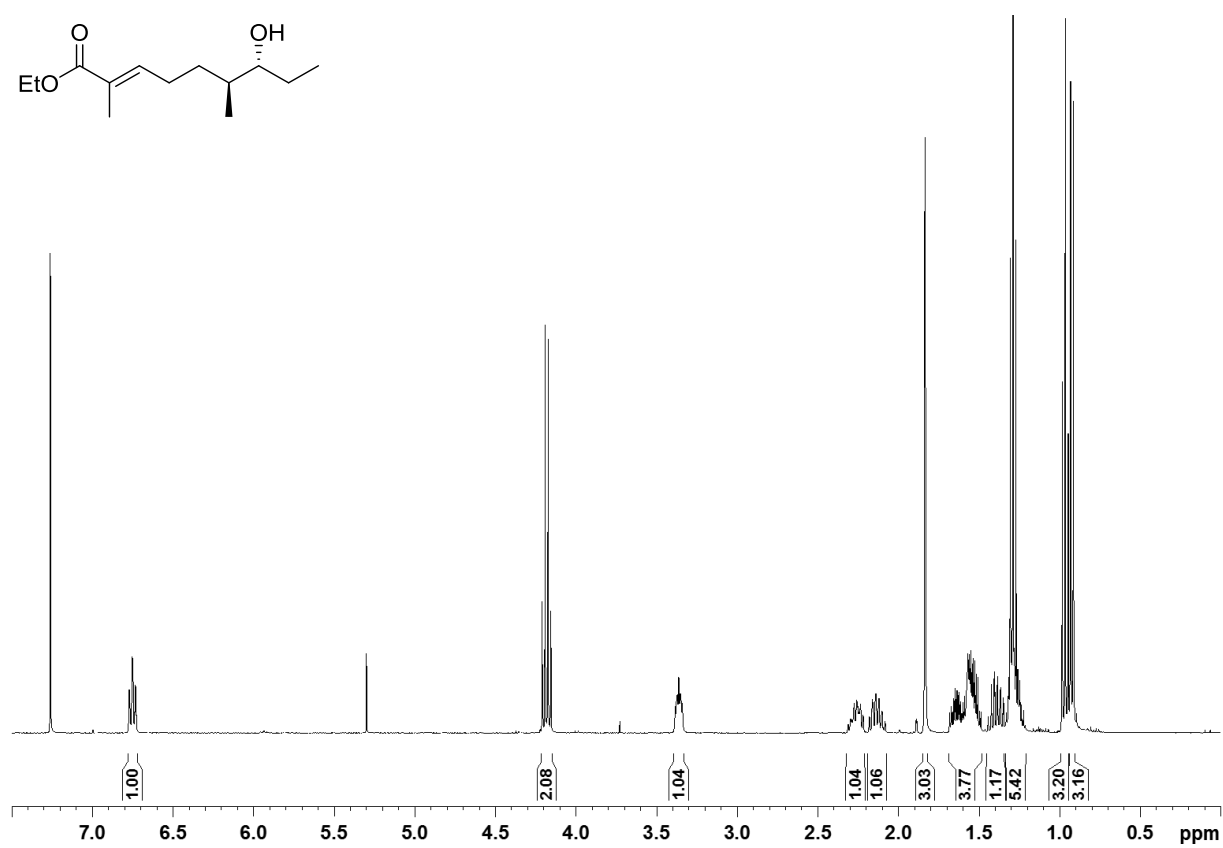
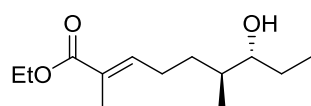


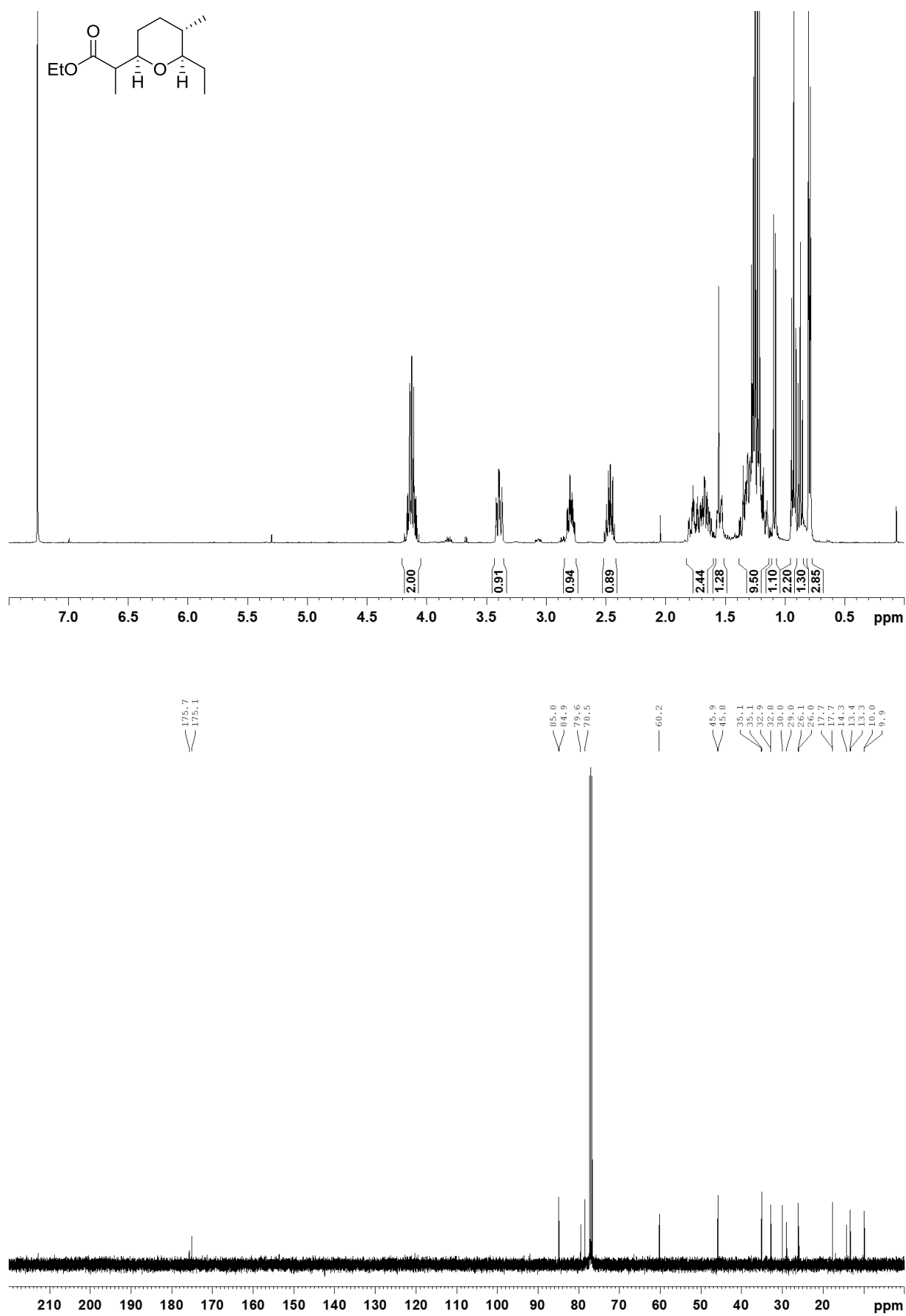


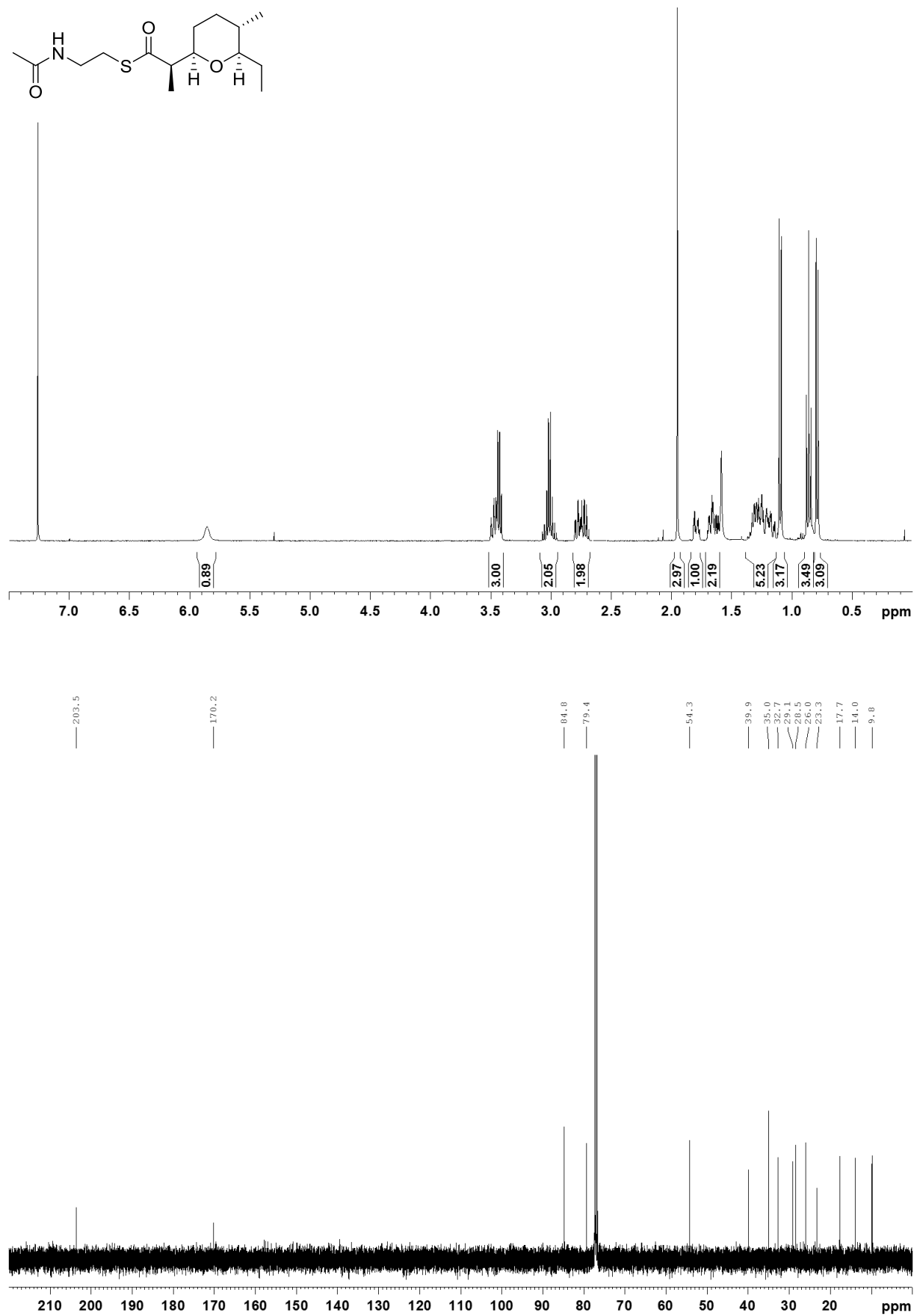


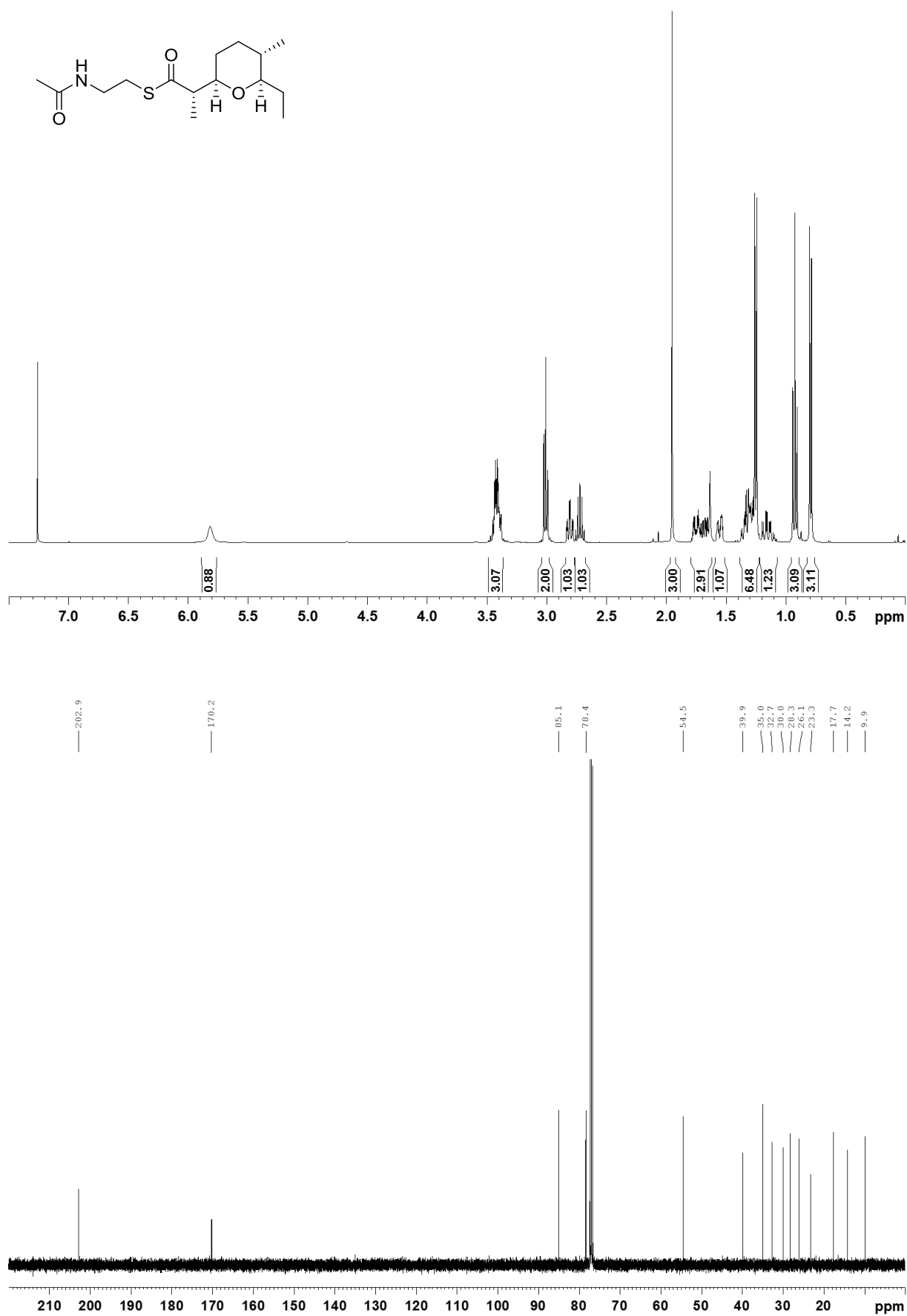


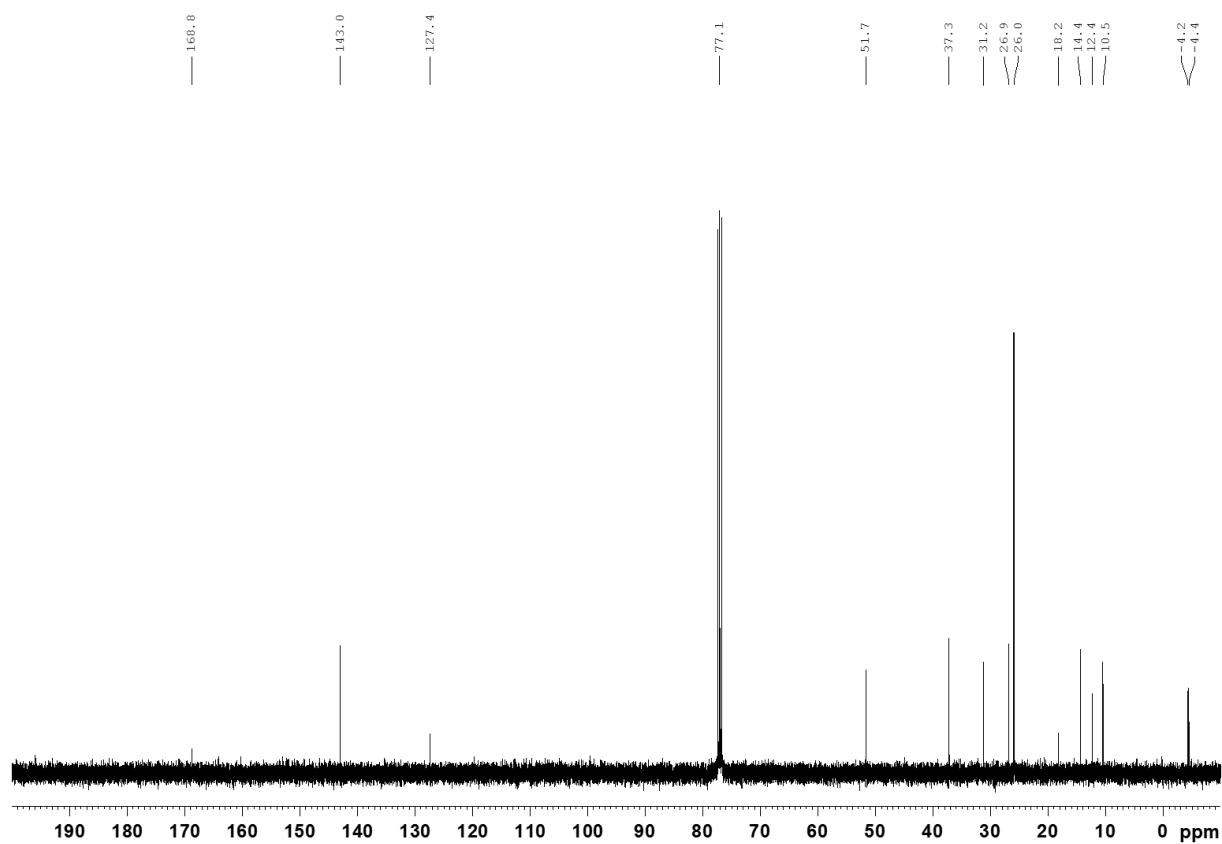
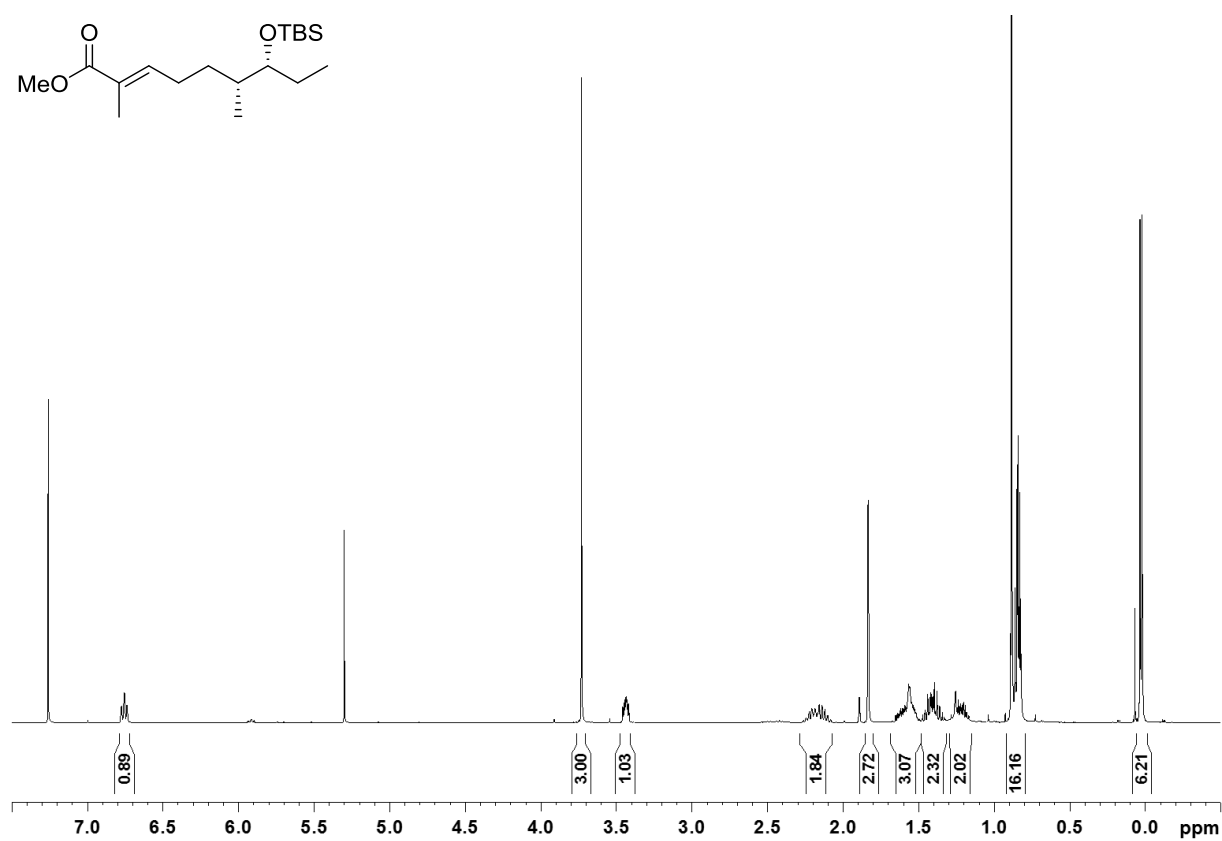
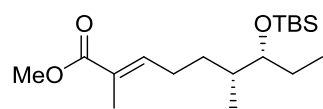


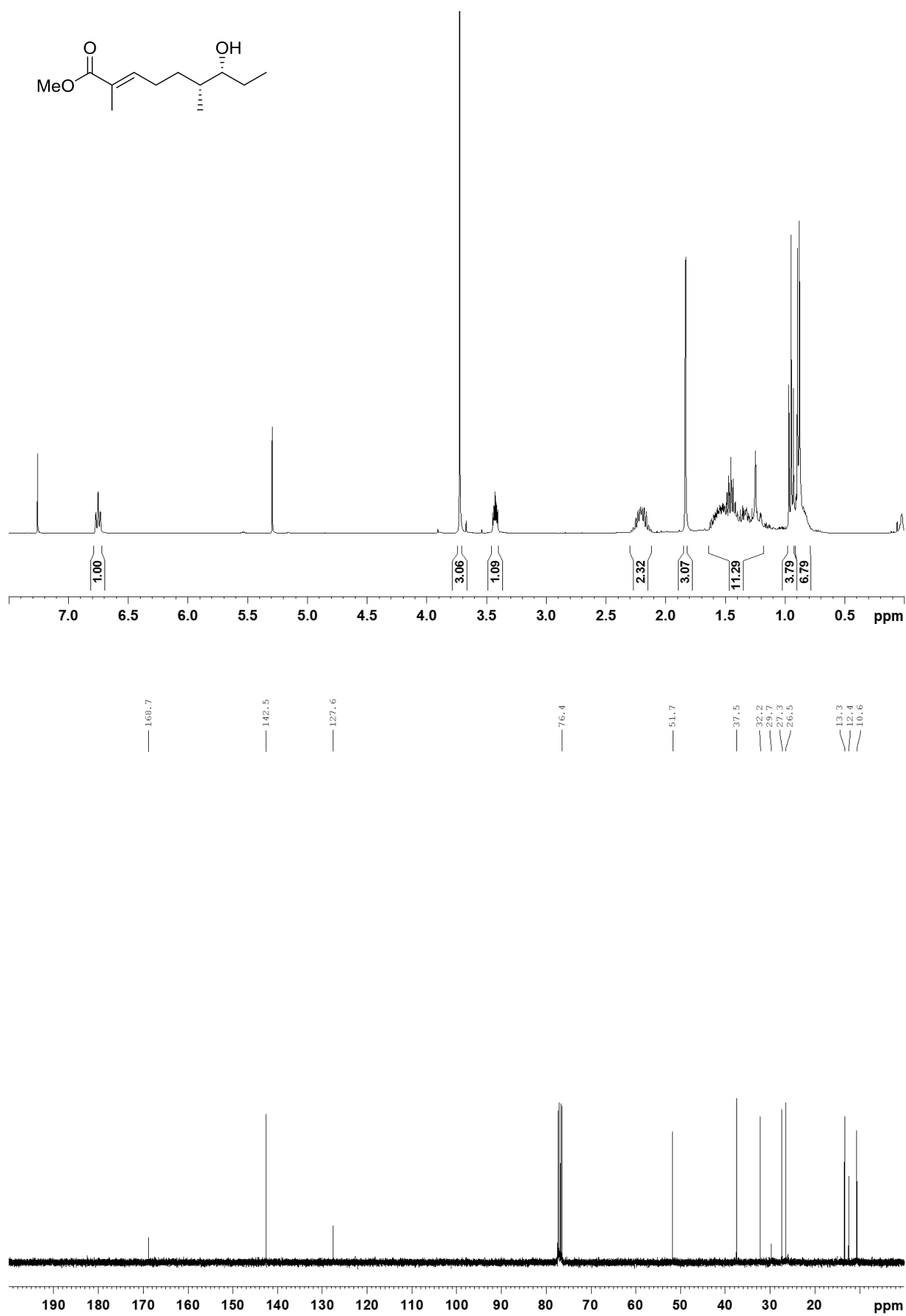


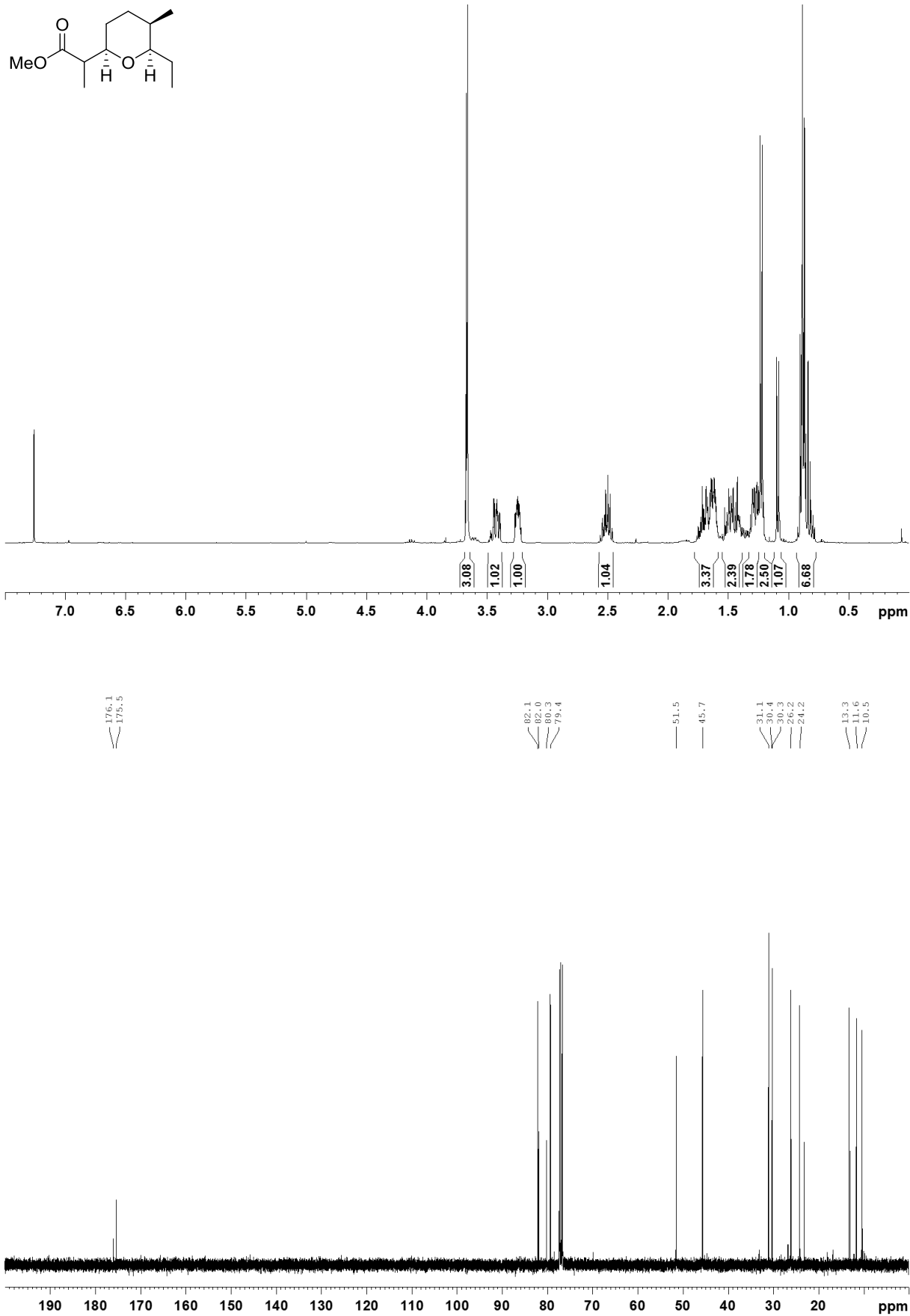


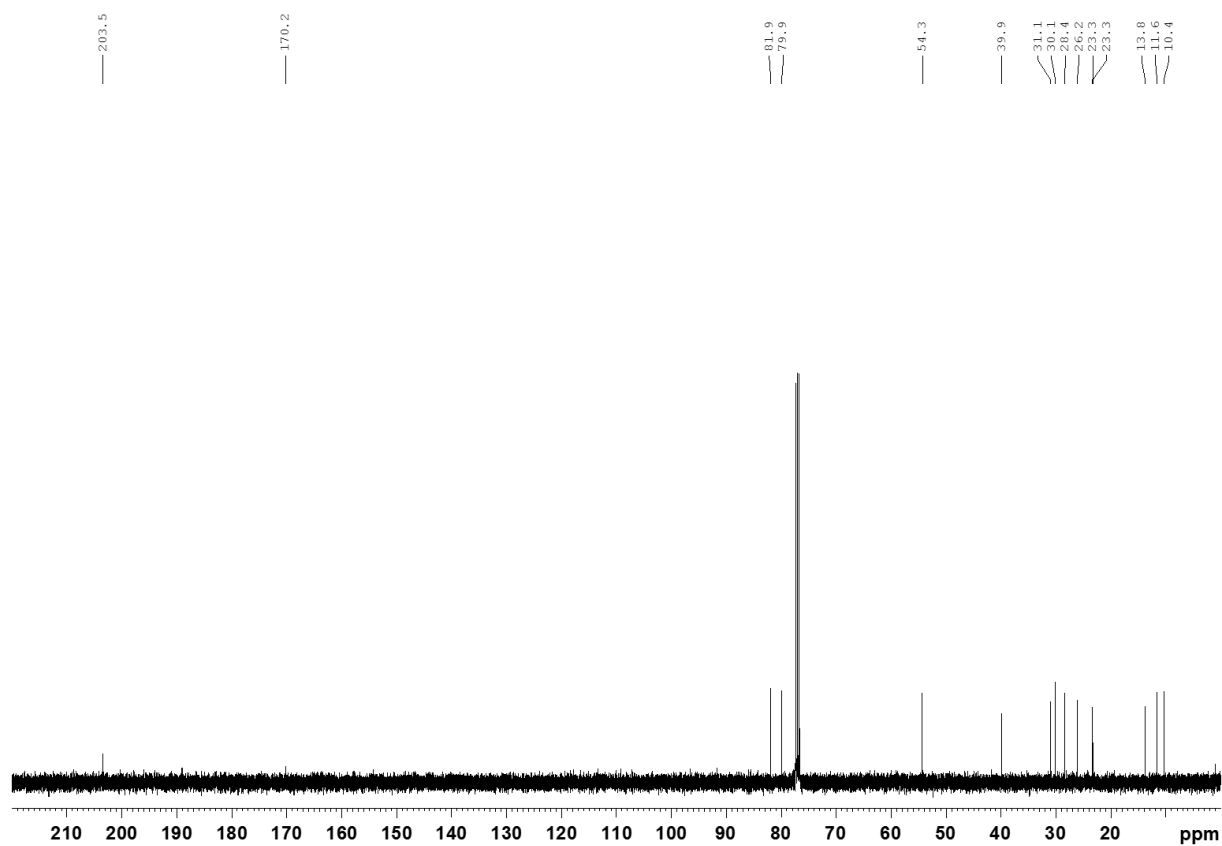
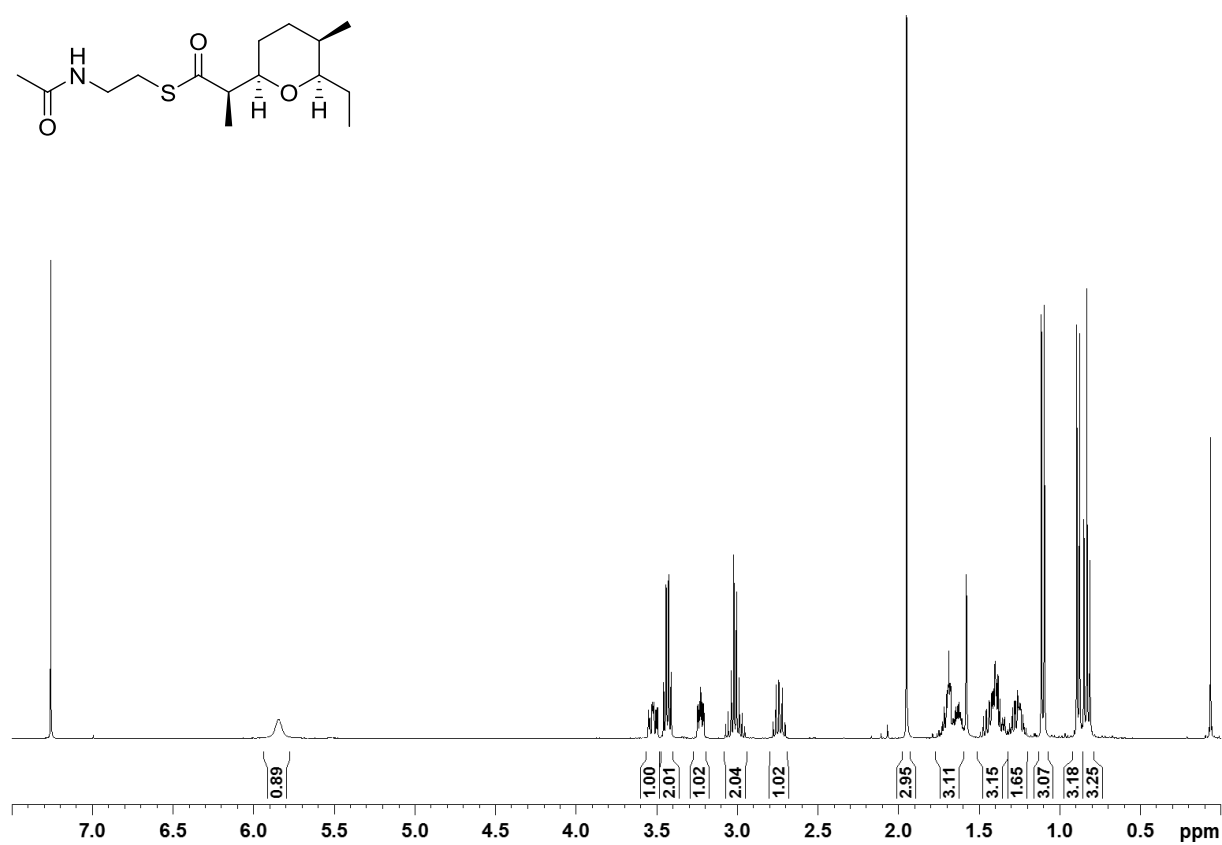
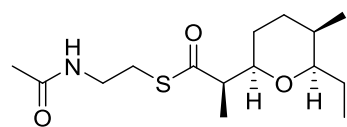


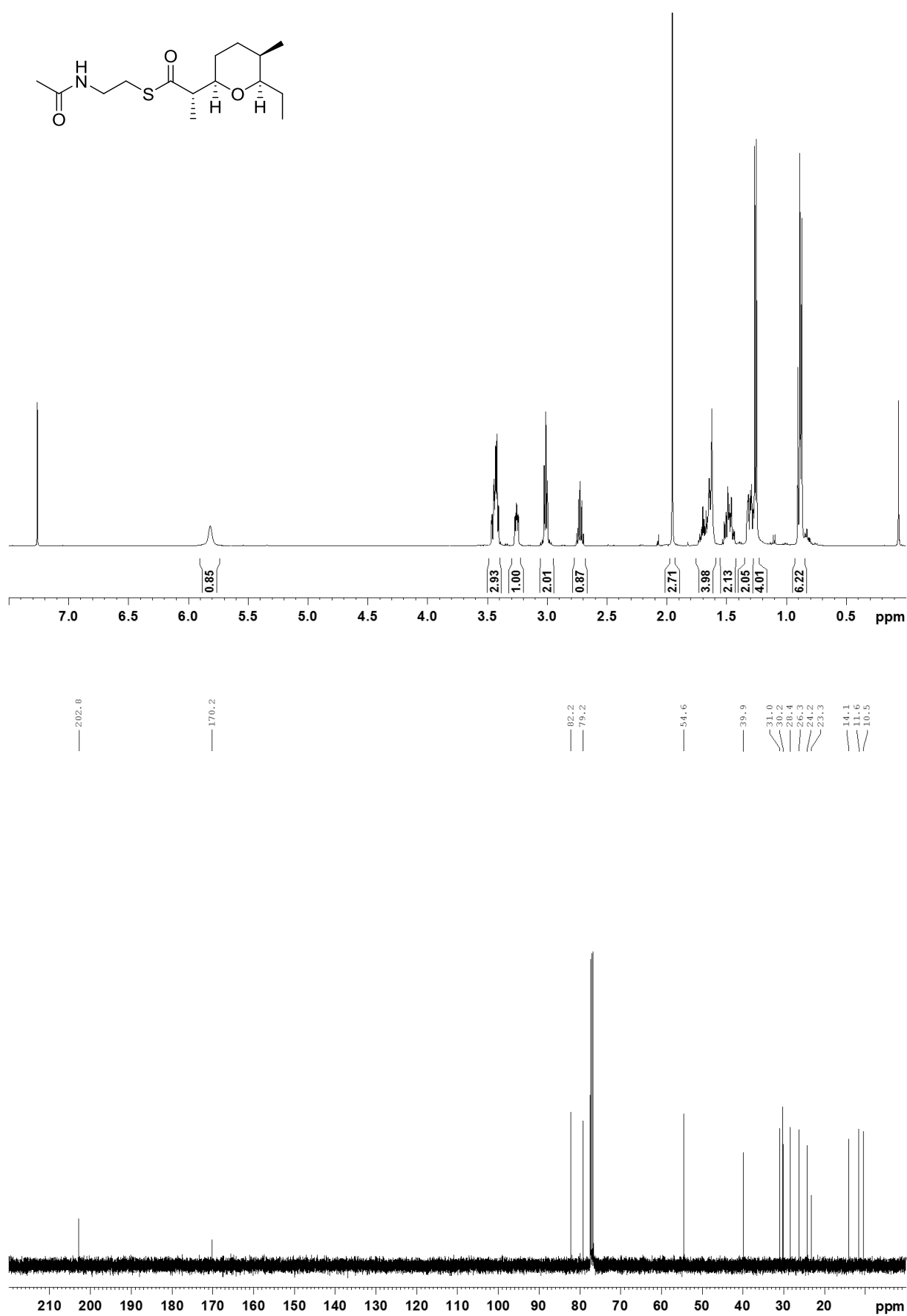


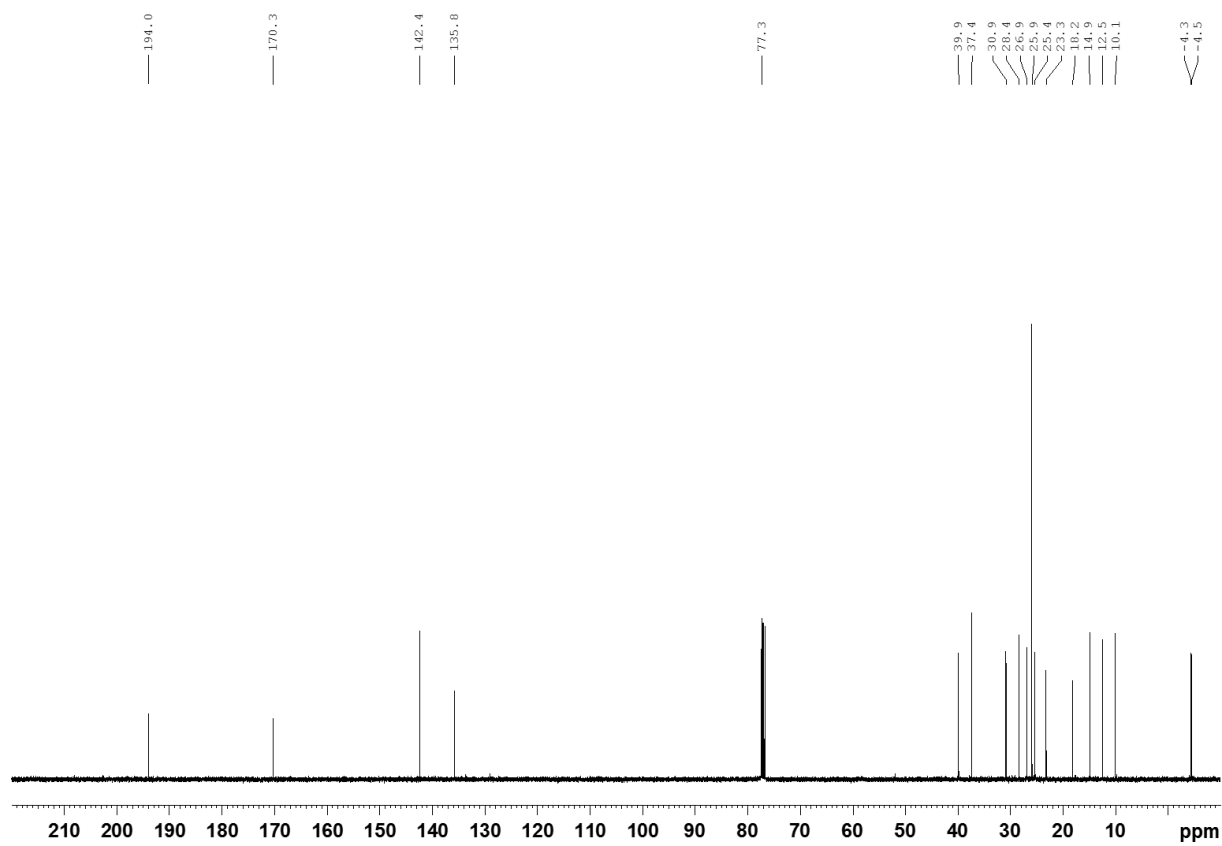
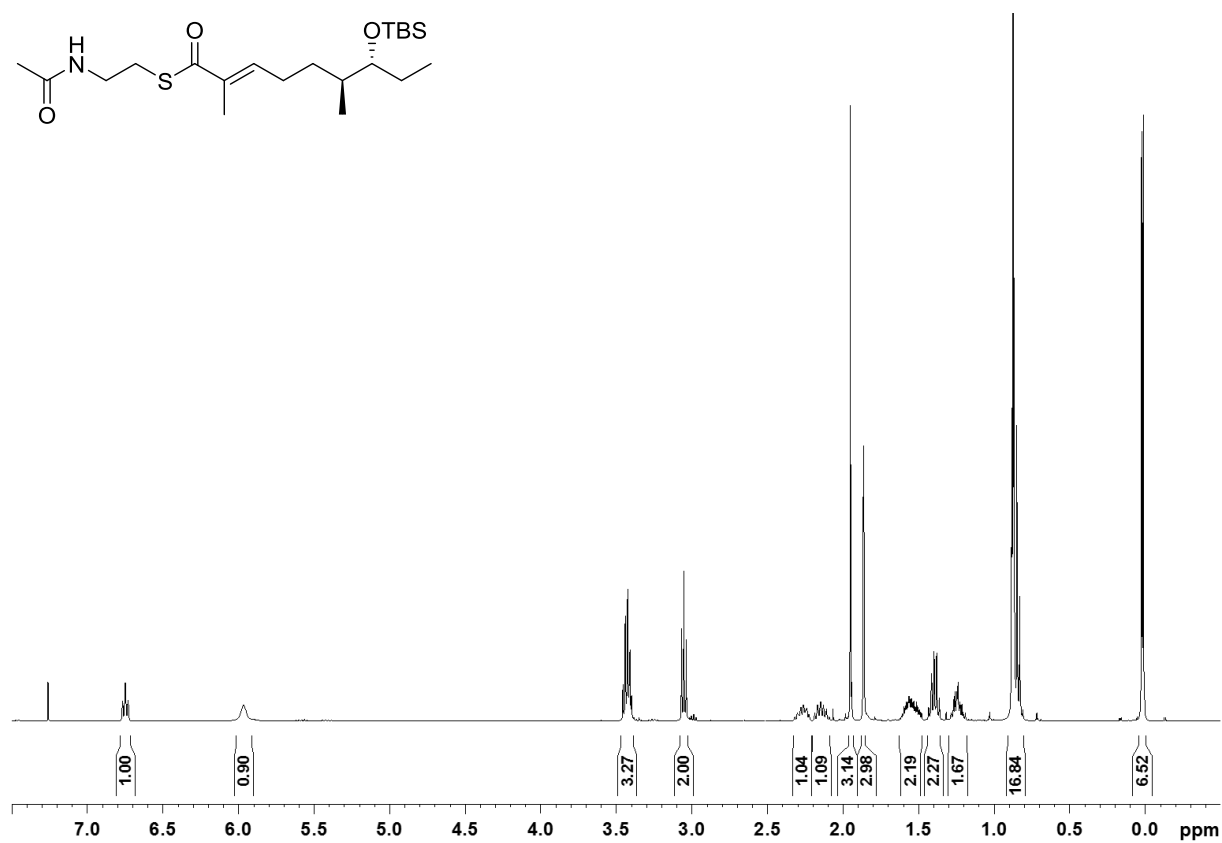
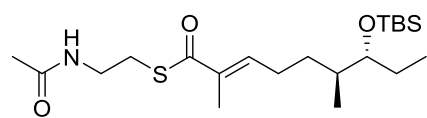


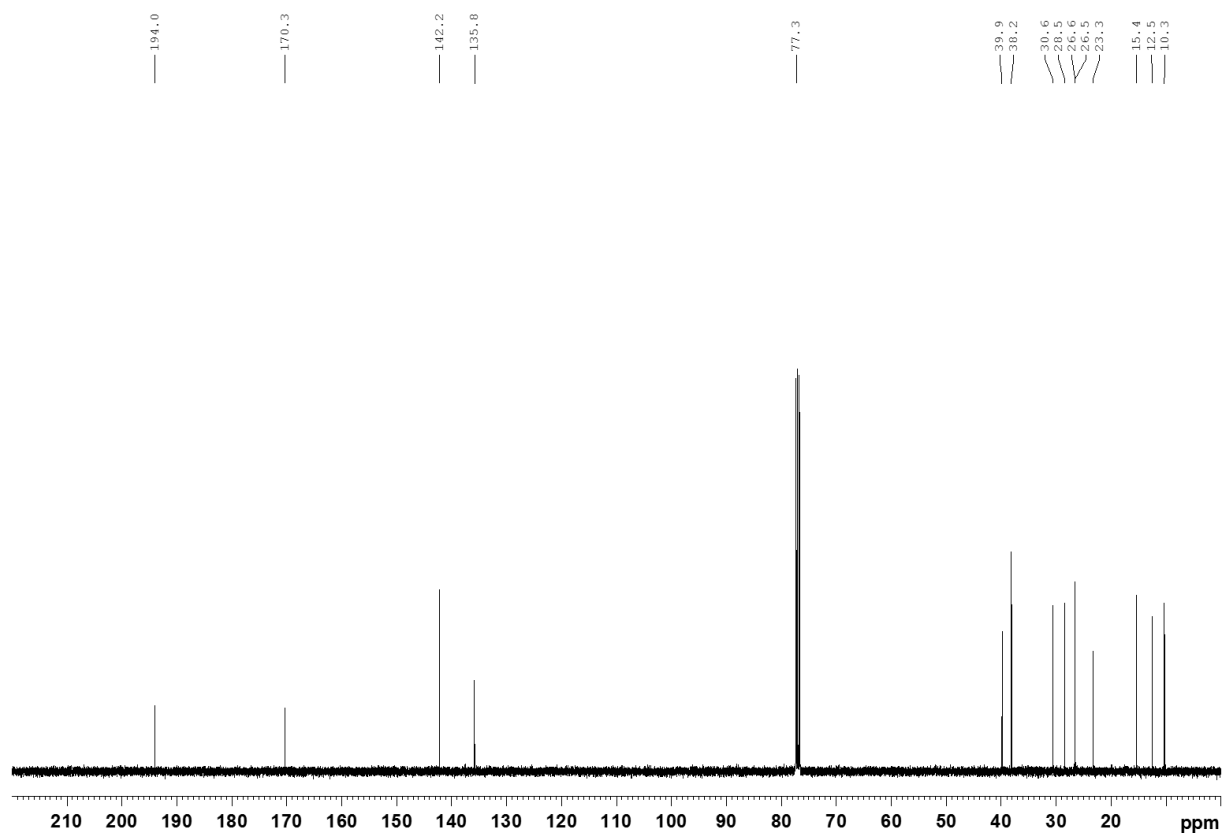
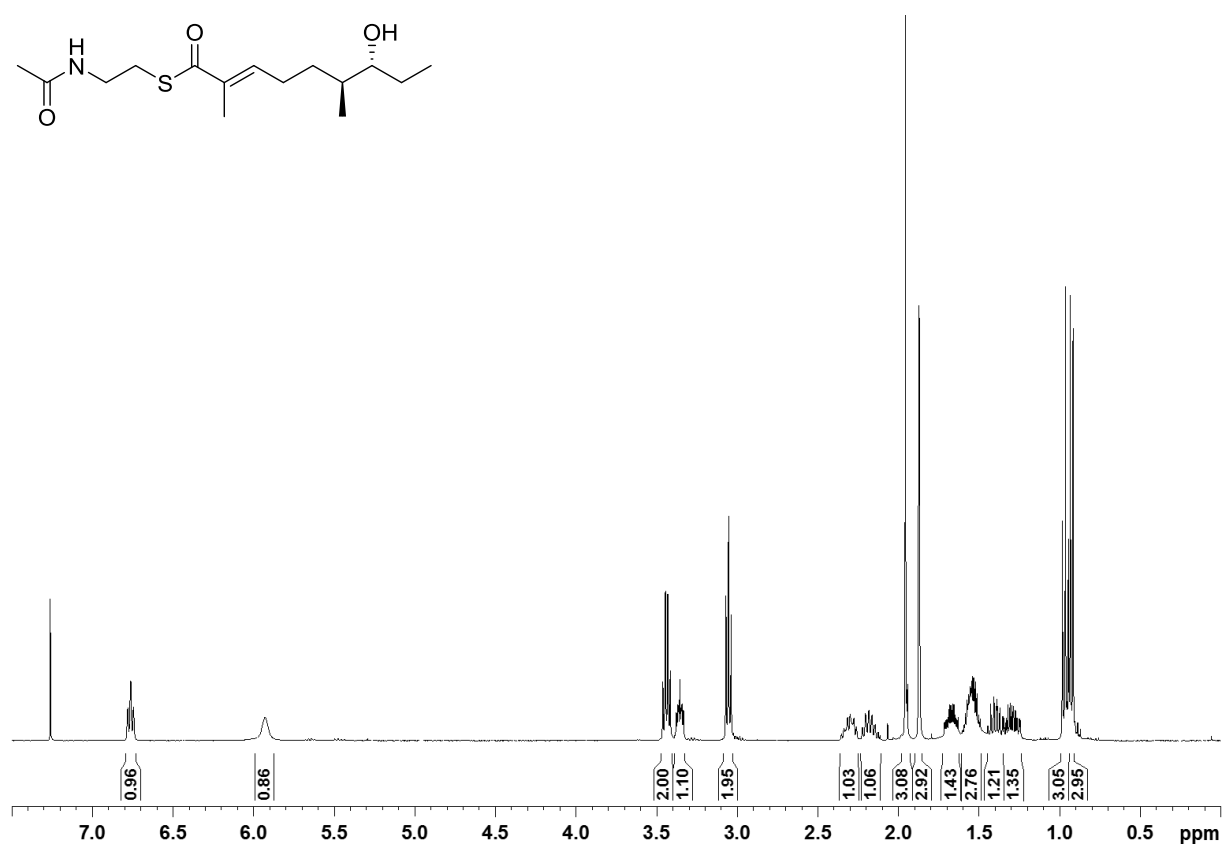
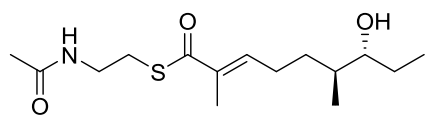


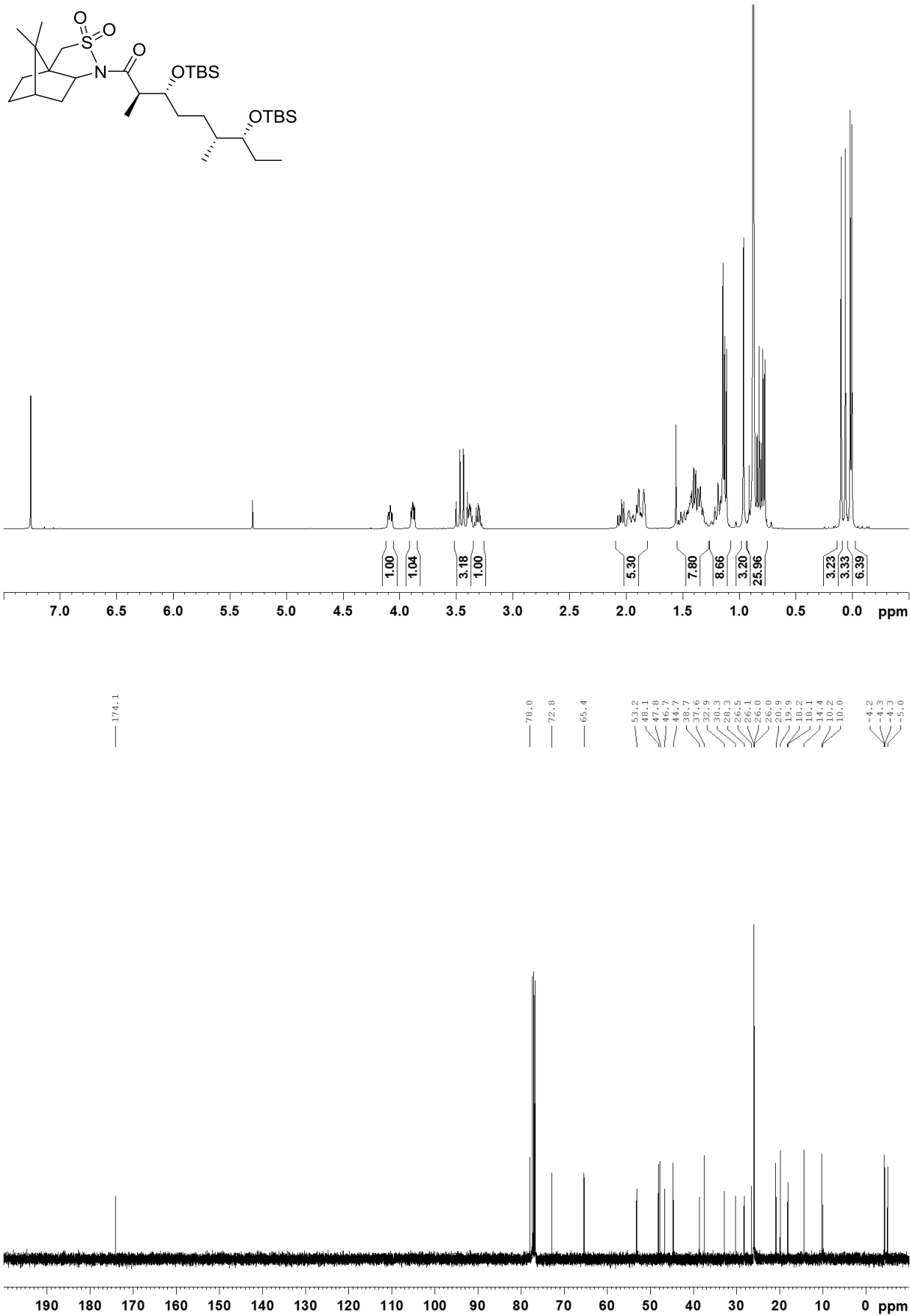


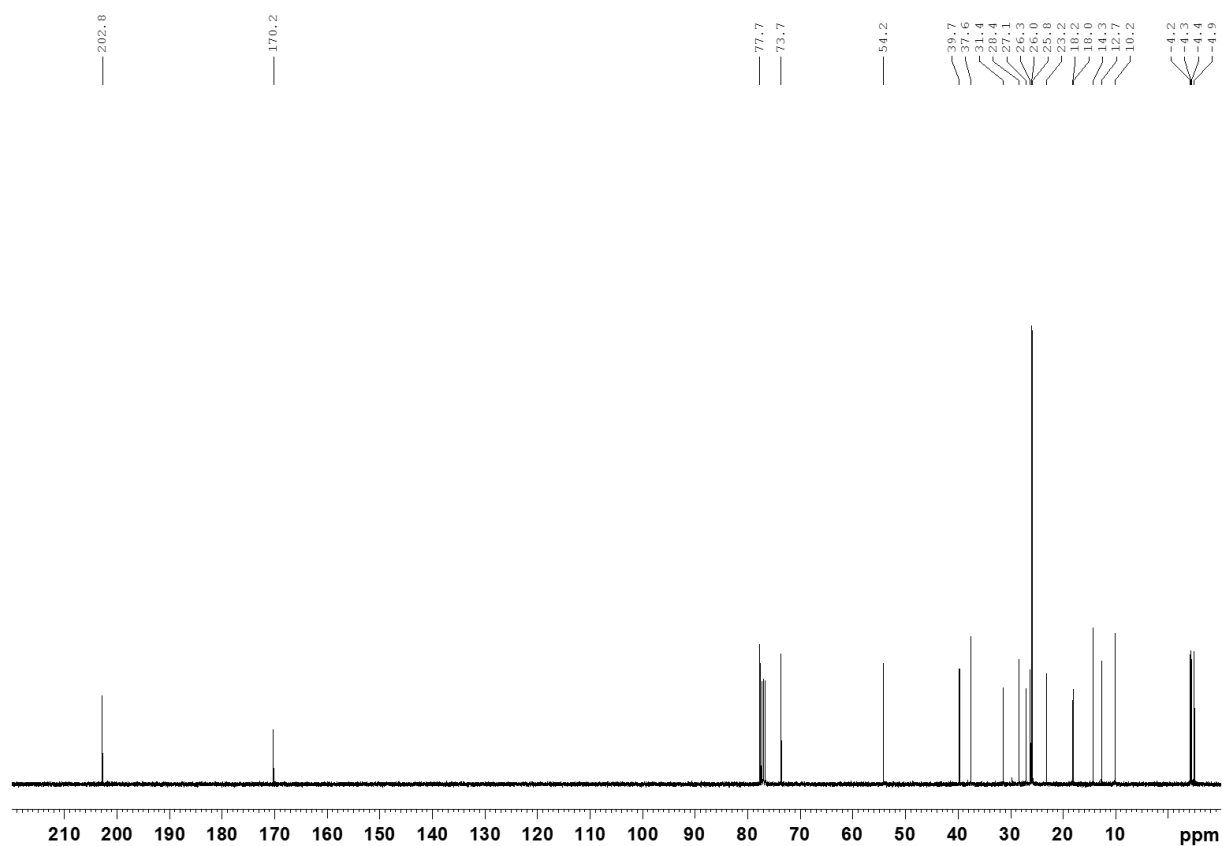
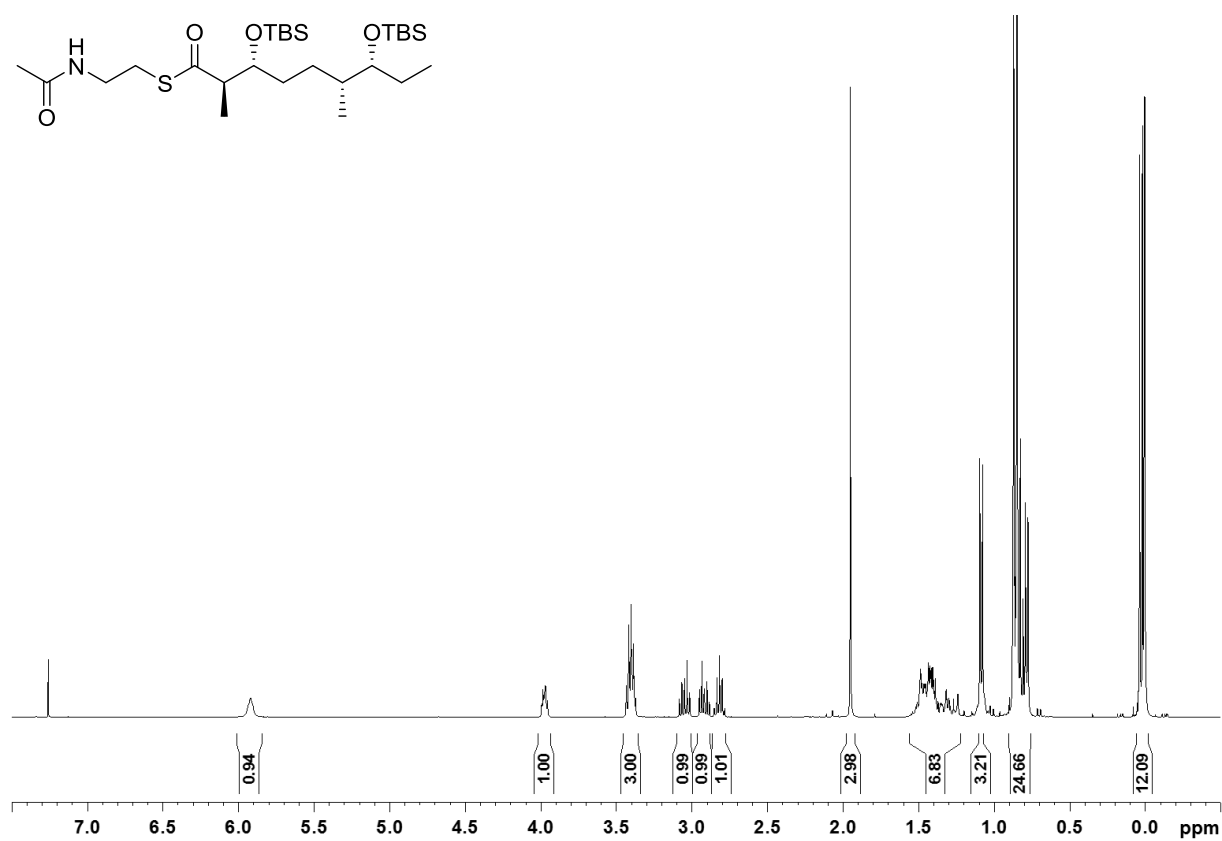
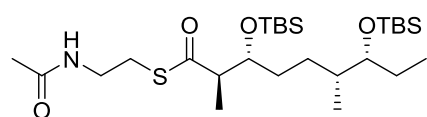


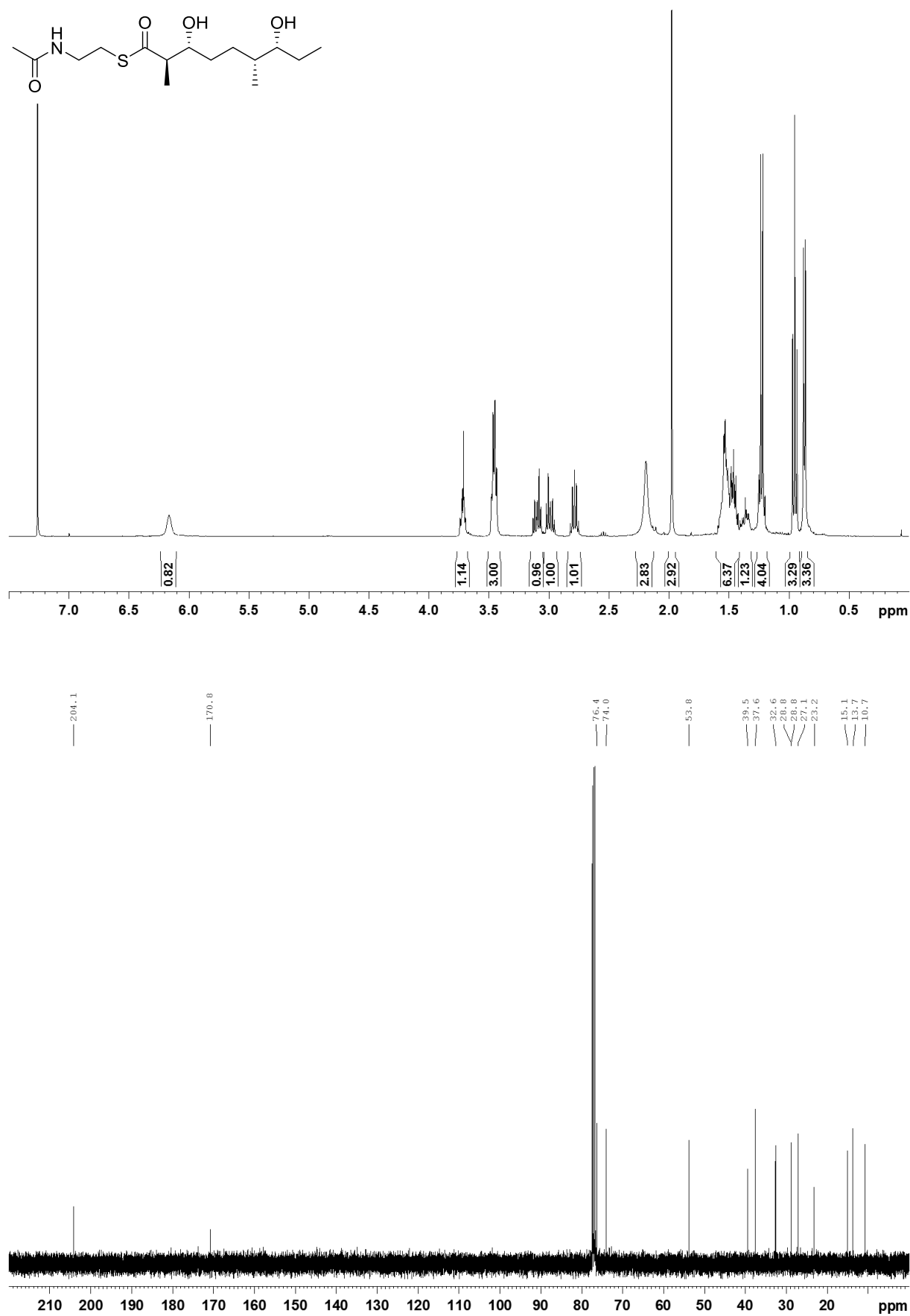


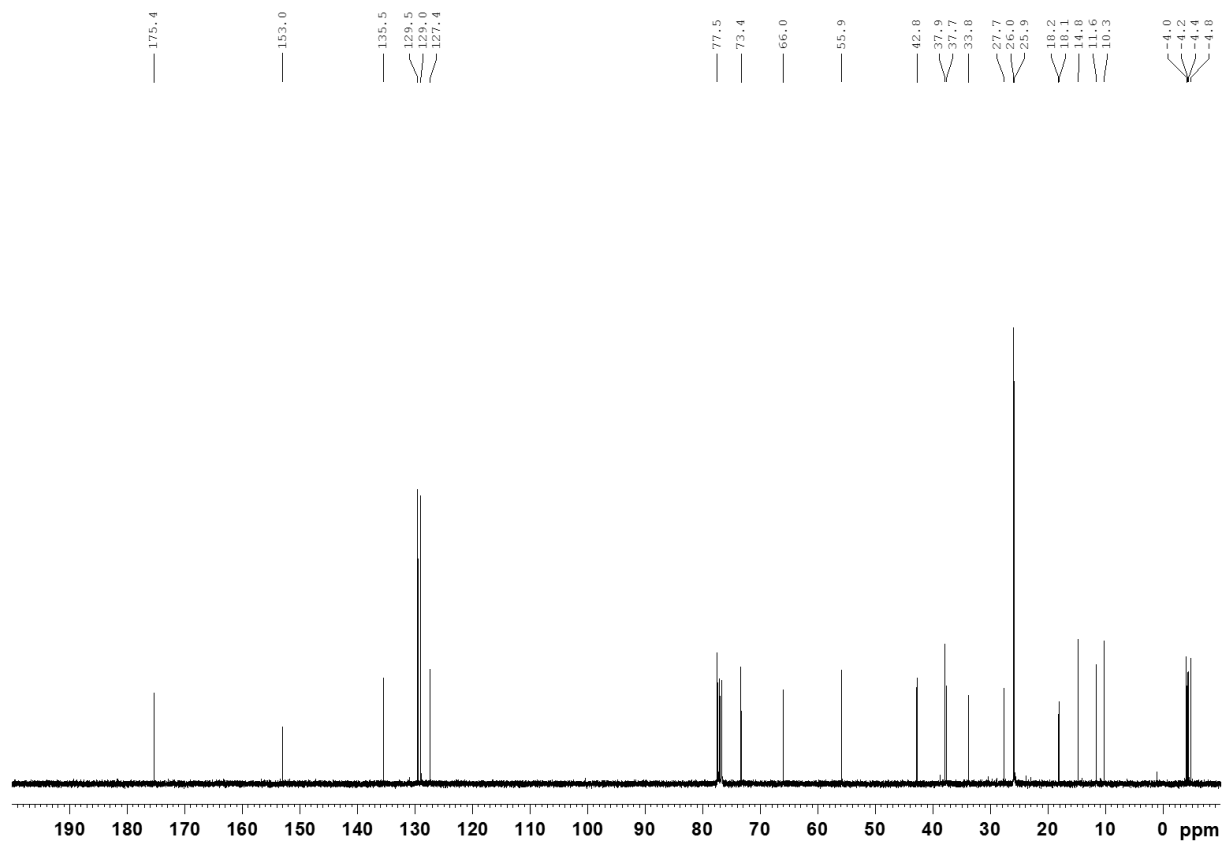
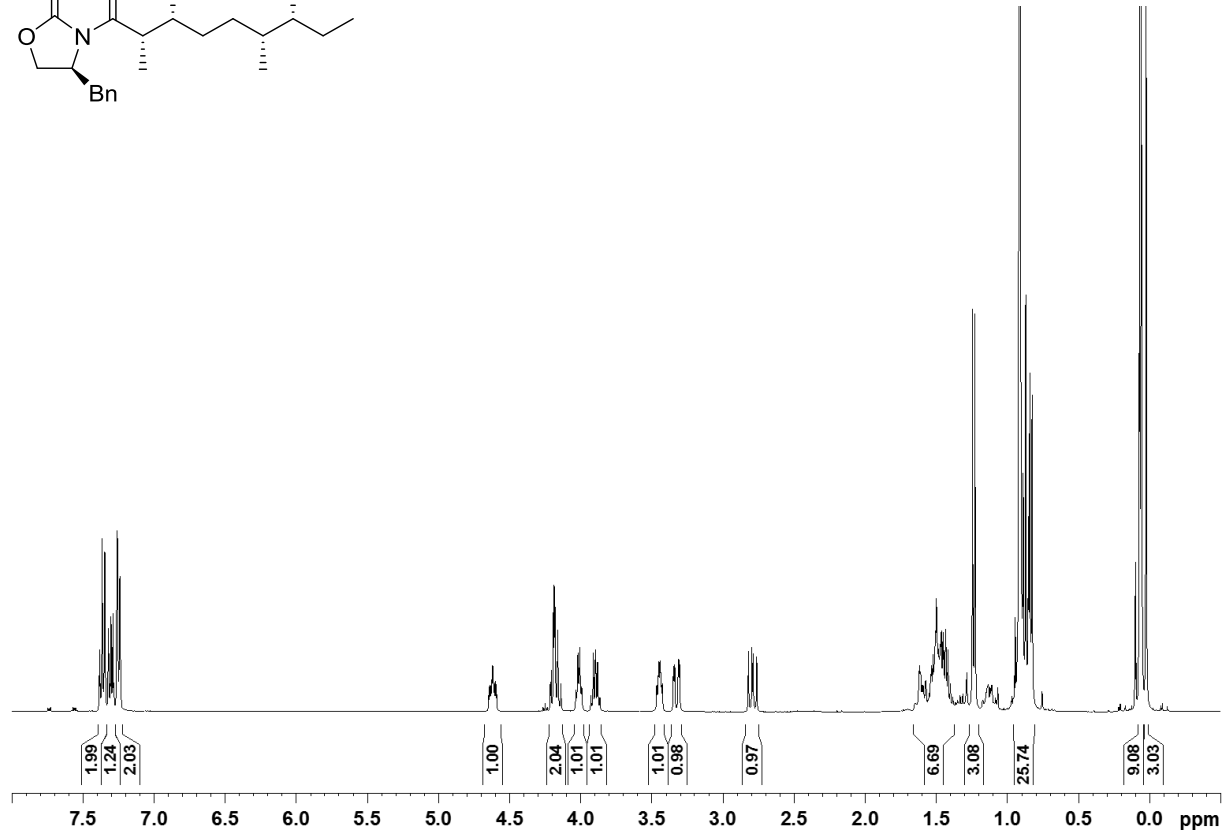
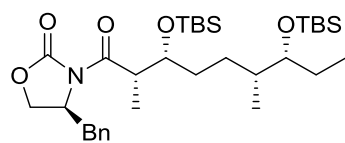


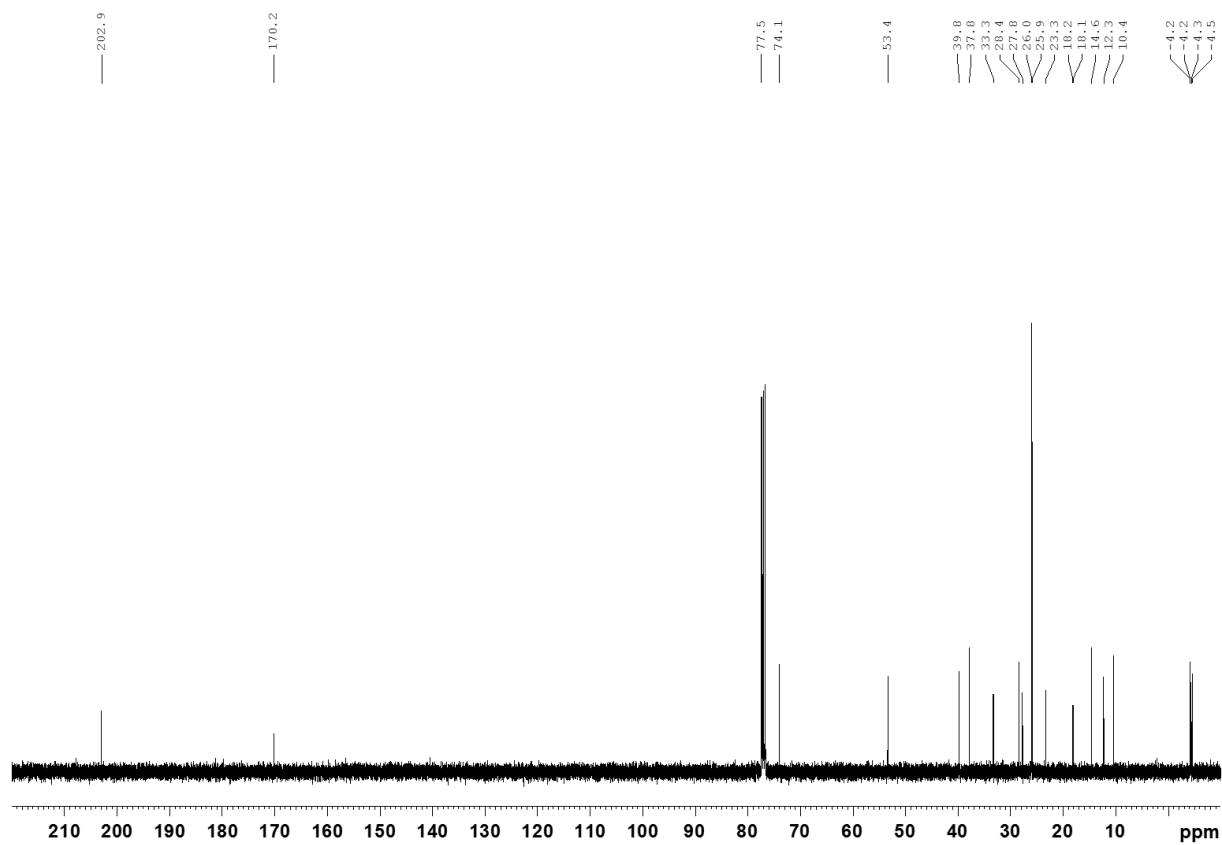
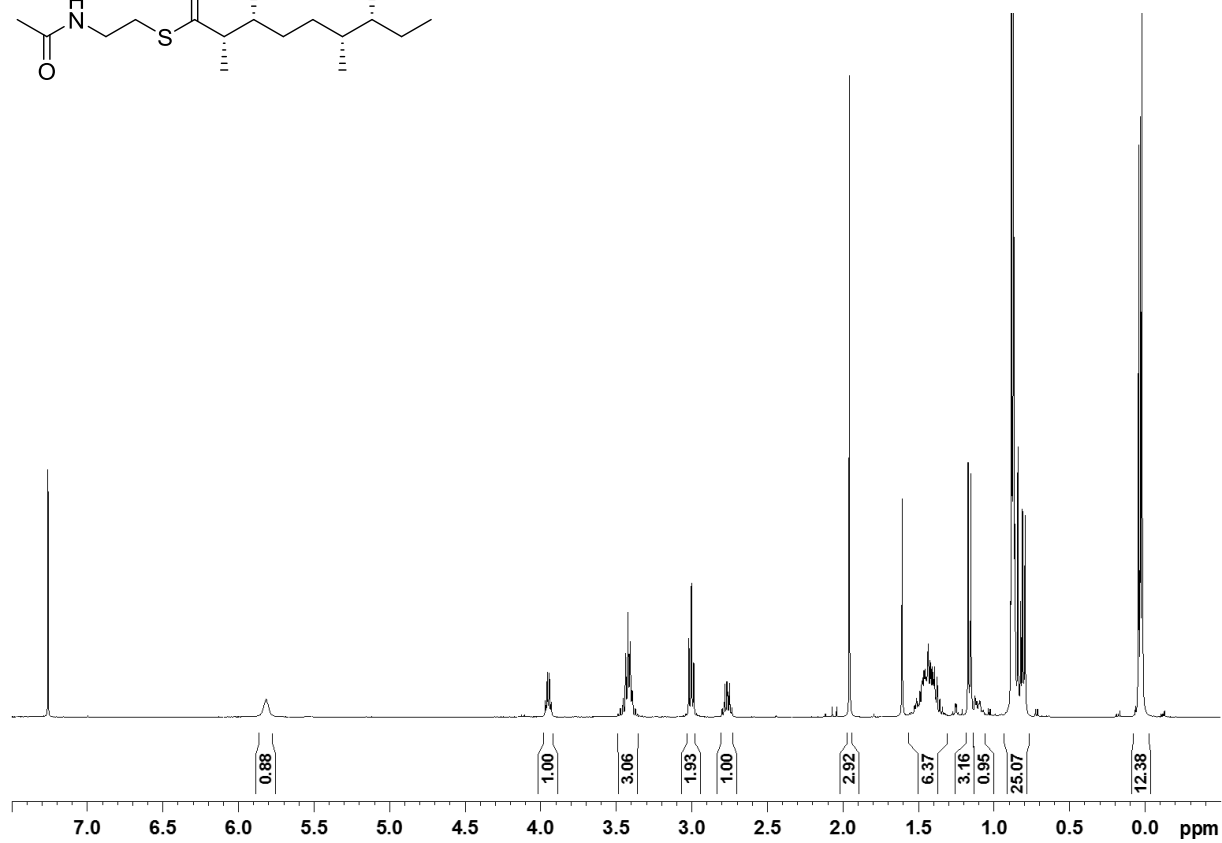
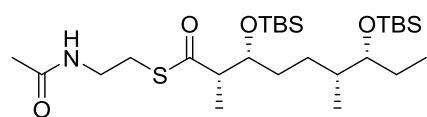


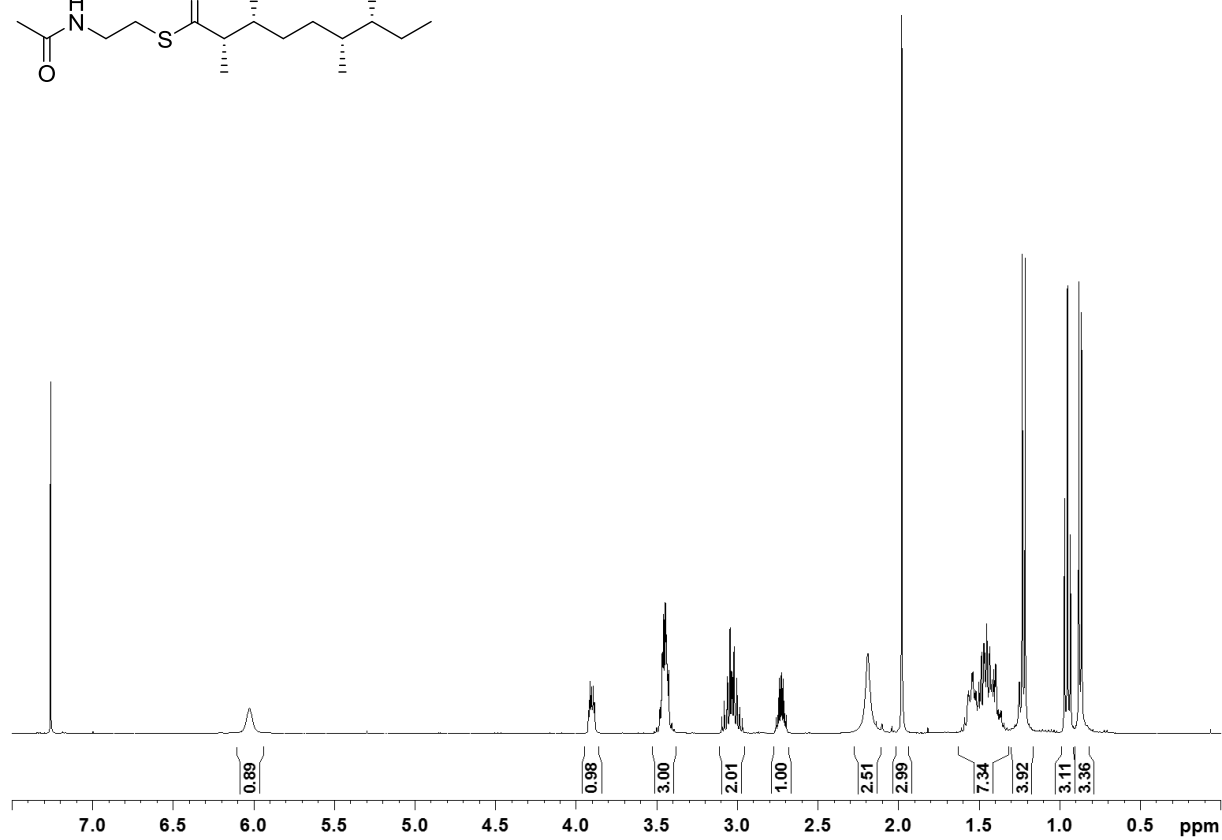
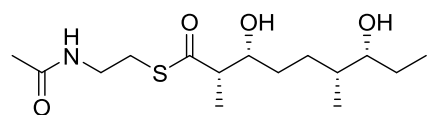












— 204.1

— 170.7

— 76.5

— 72.4

— 53.6

— 39.4

— 37.6

— 32.0

— 29.5

— 29.7

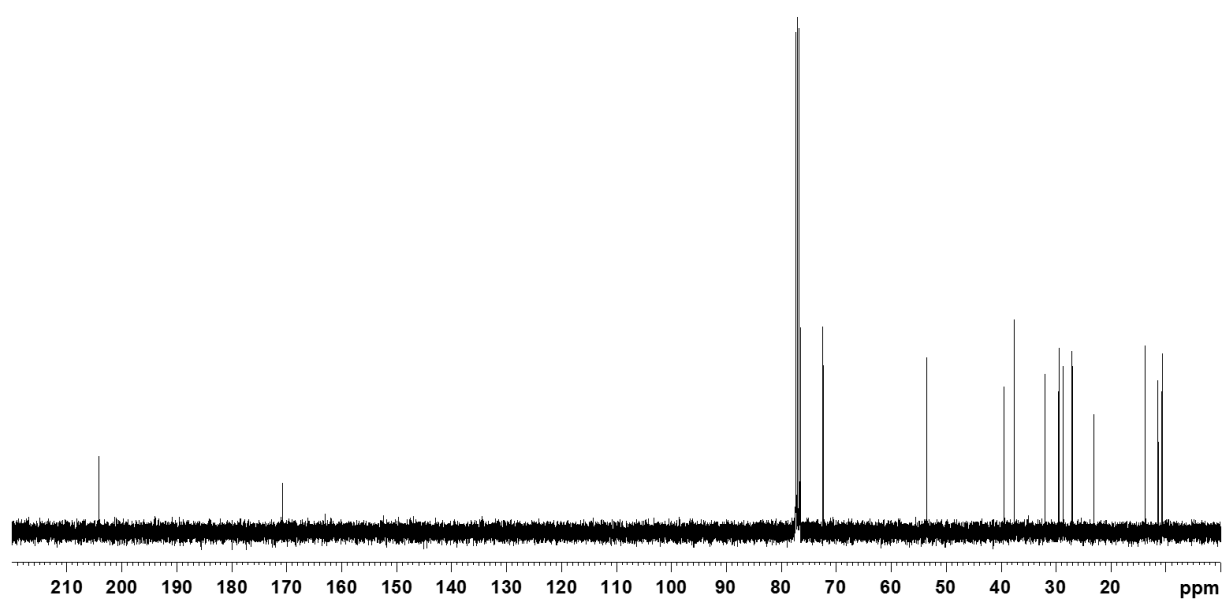
— 27.1

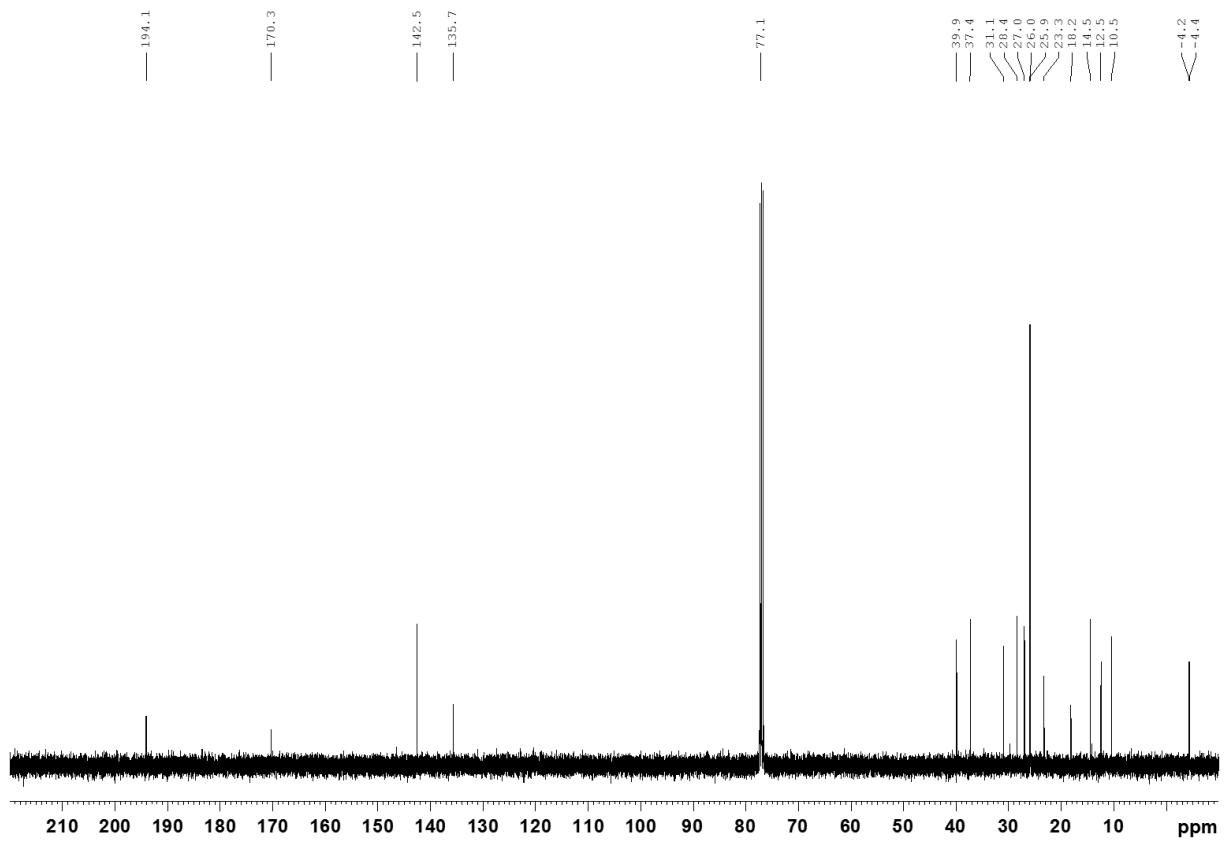
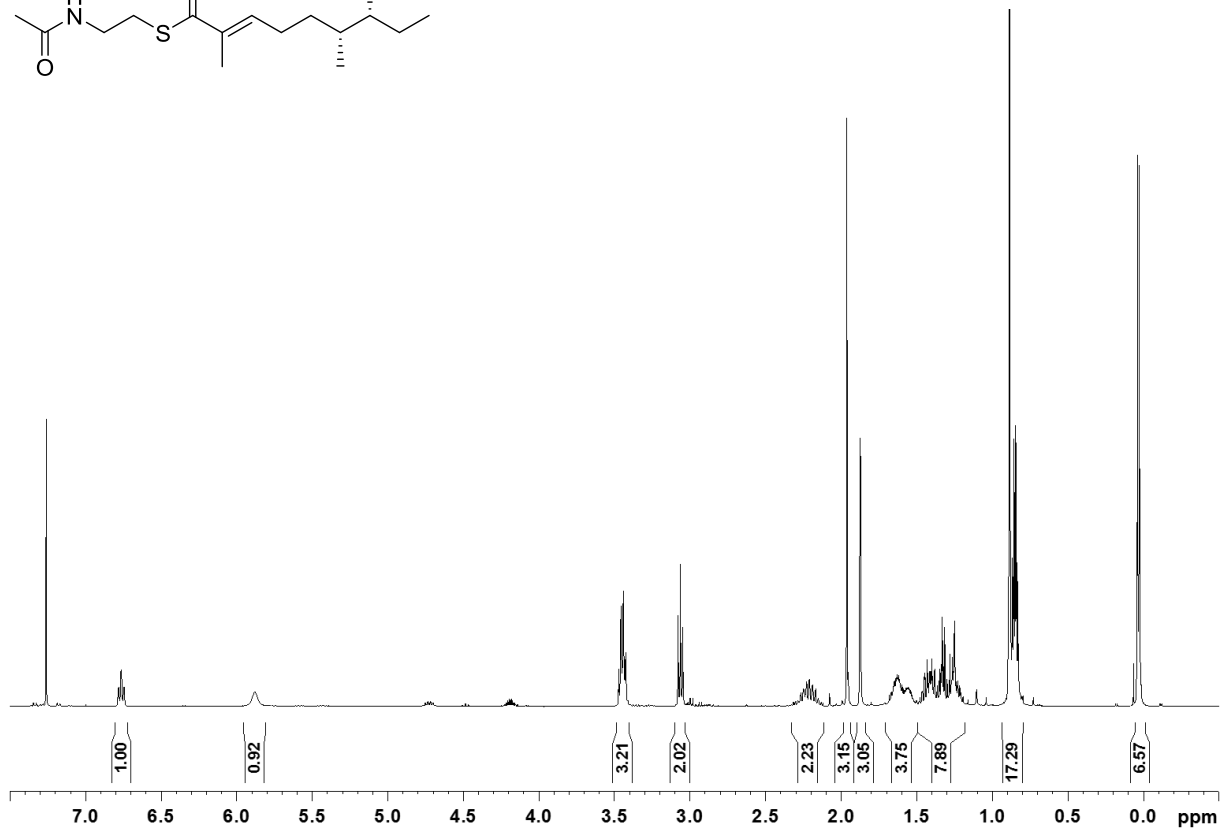
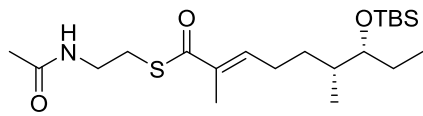
— 23.2

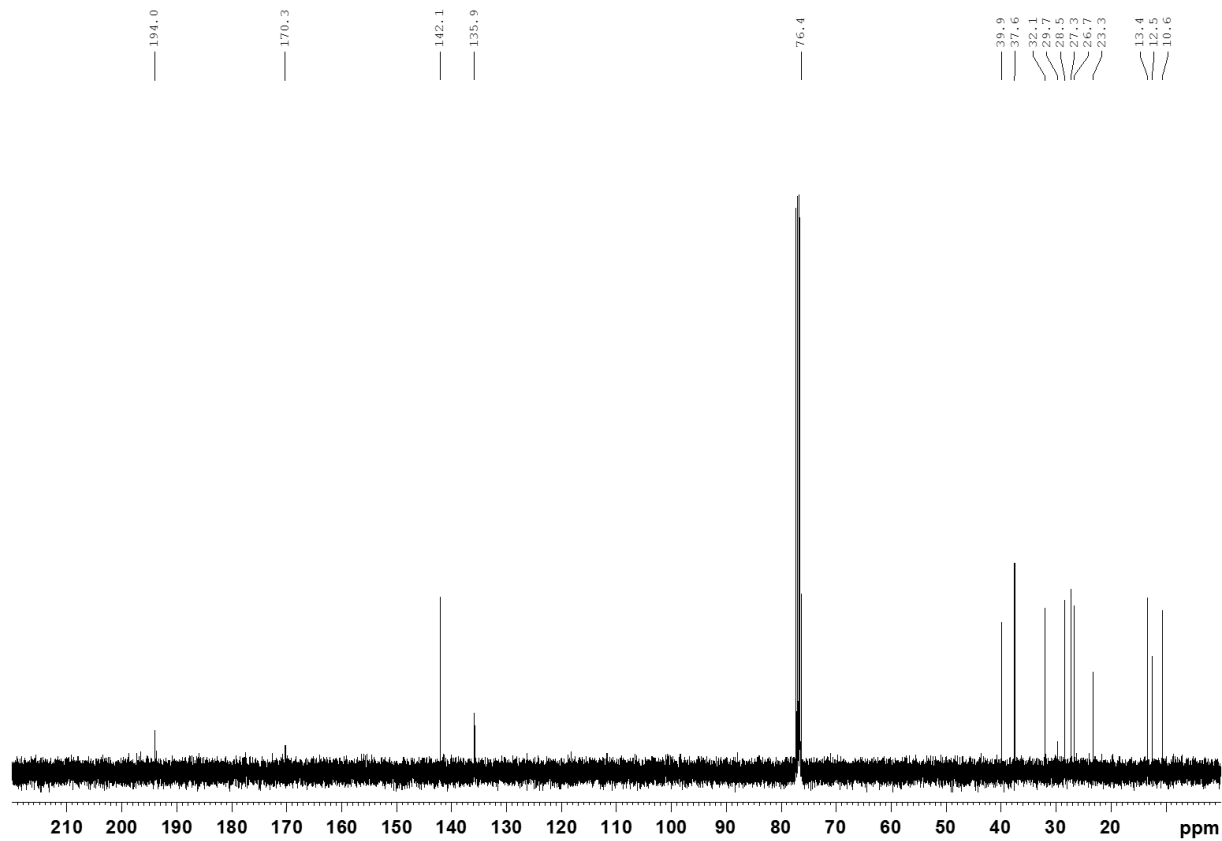
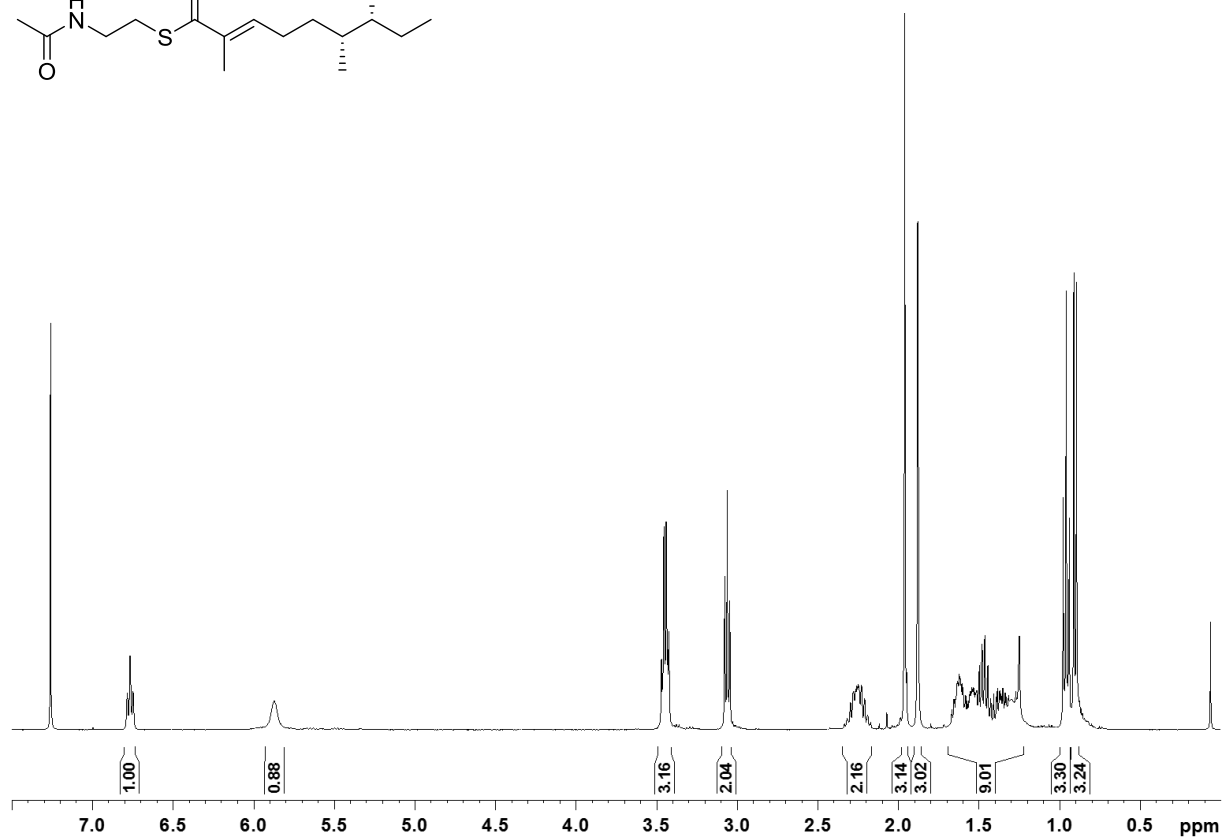
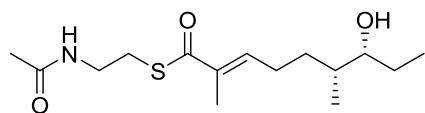
— 12.8

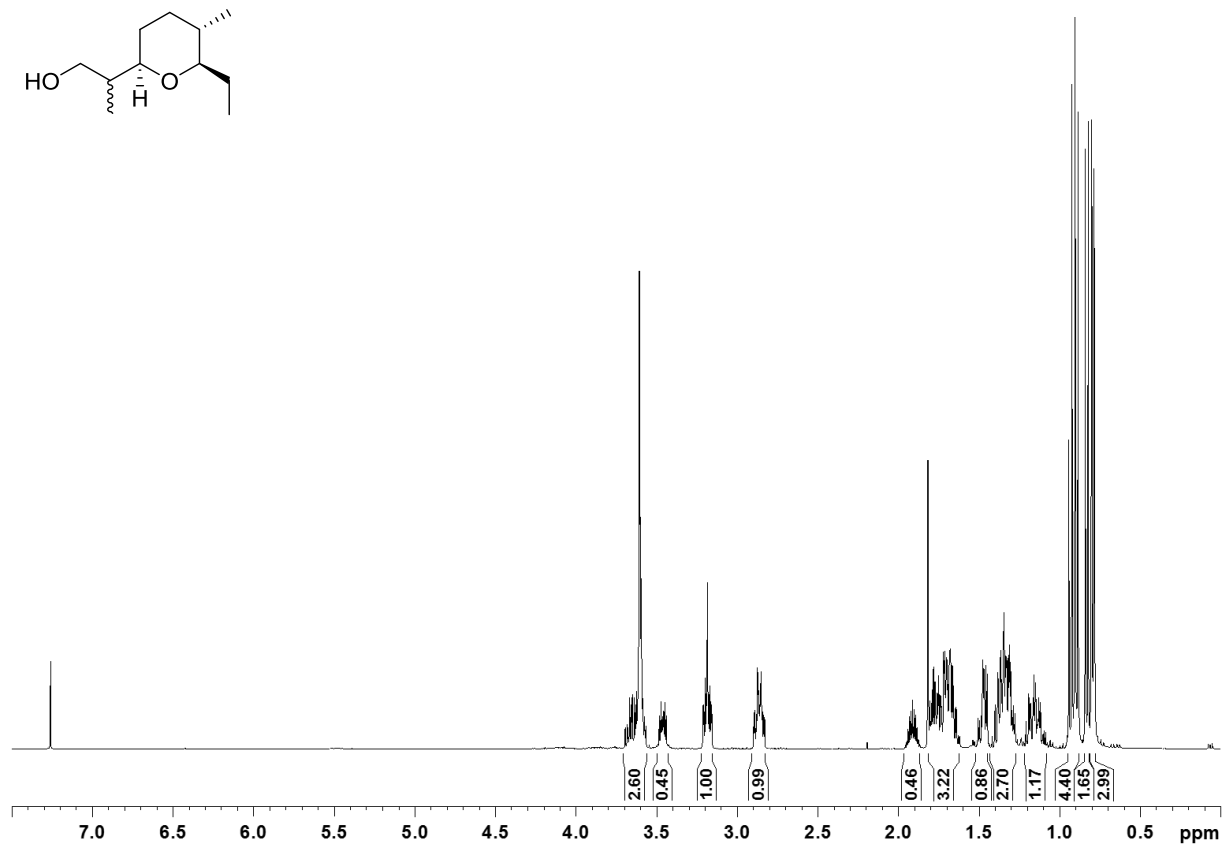
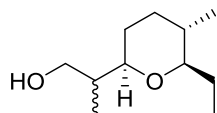
— 11.4

— 10.7









85.2
85.1
84.5
81.8

68.4
66.9

40.2
38.8

34.6
32.8
32.8

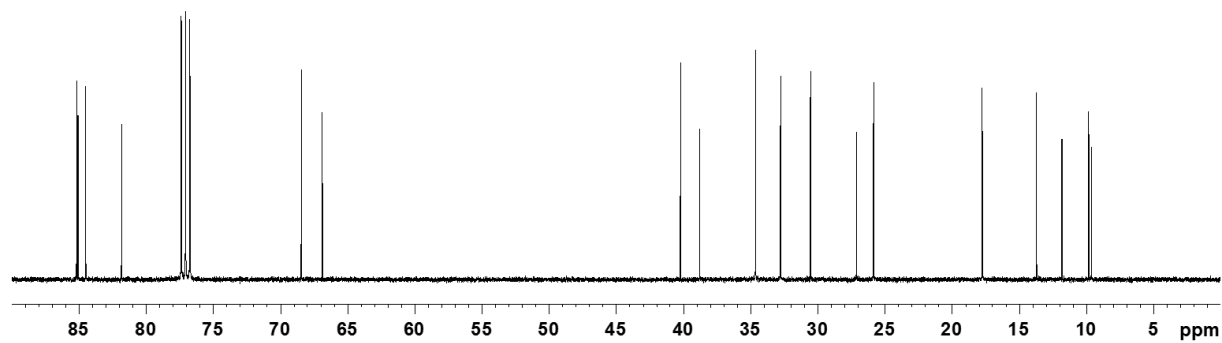
30.5

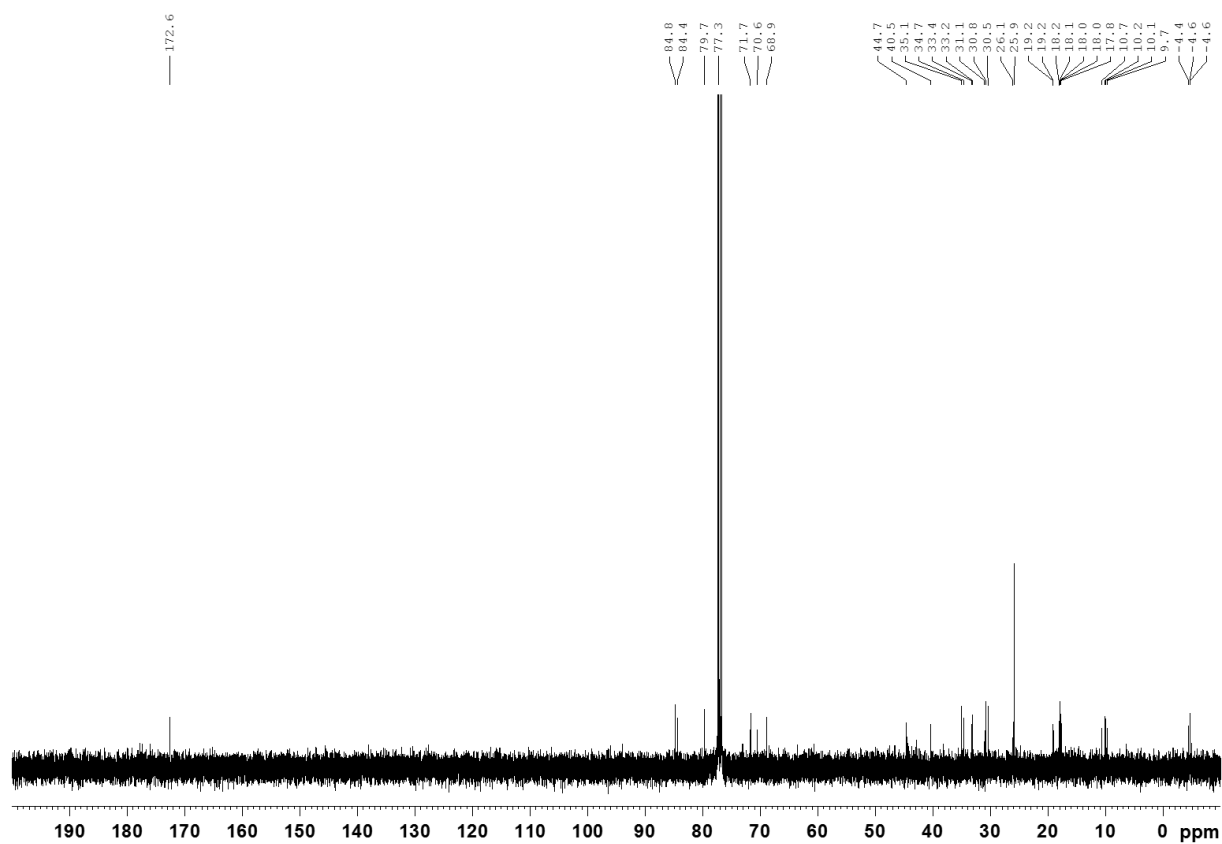
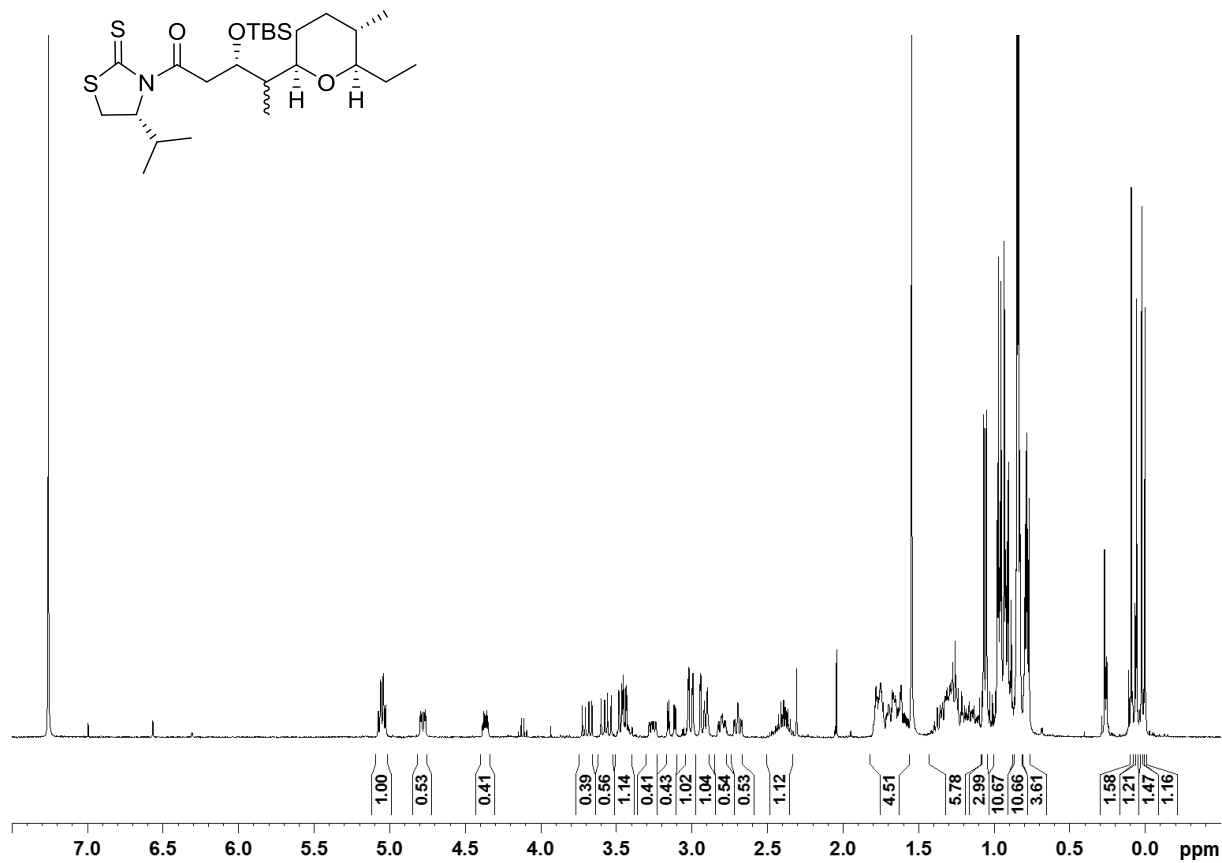
27.1
25.9
25.8

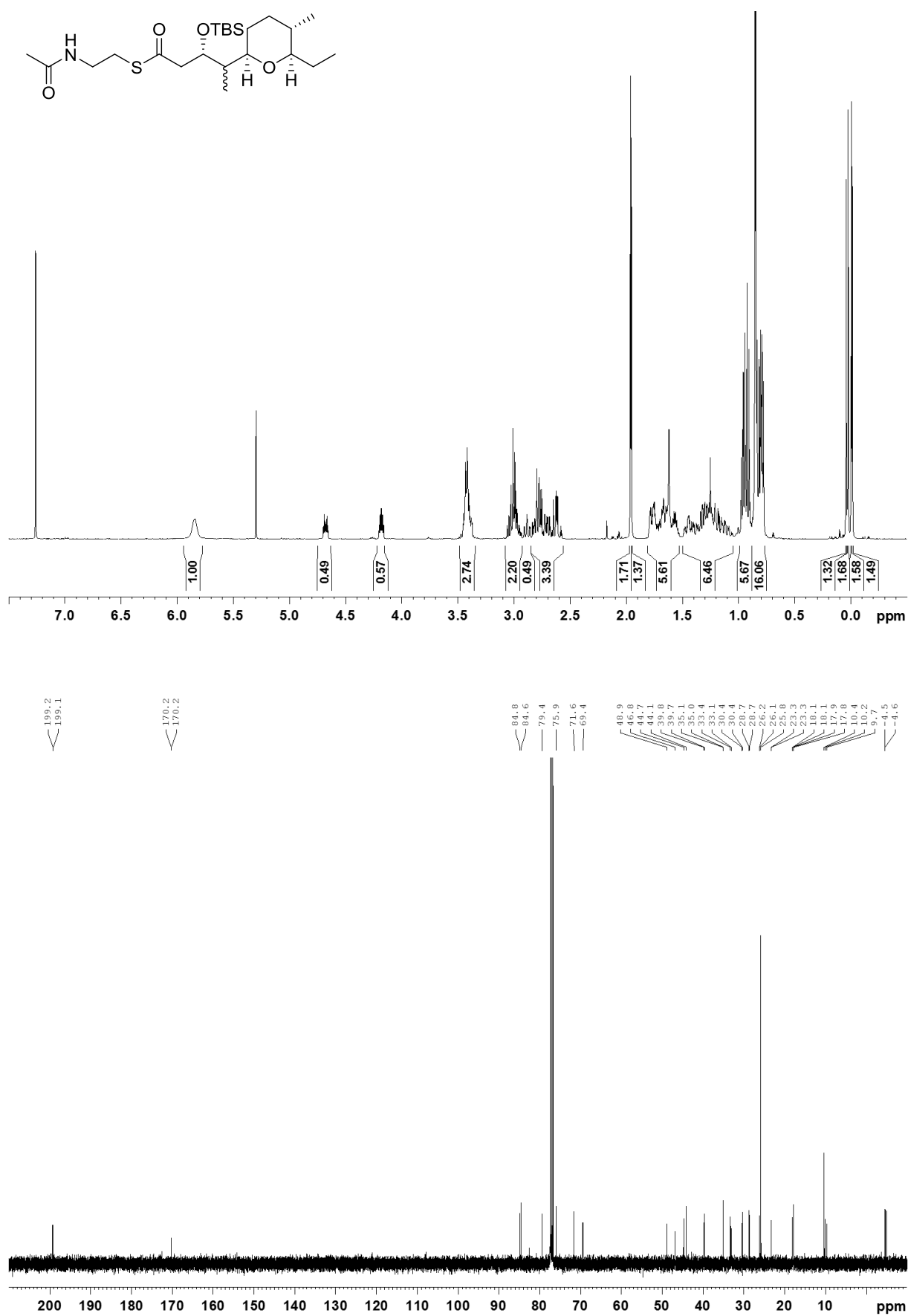
17.8
17.7

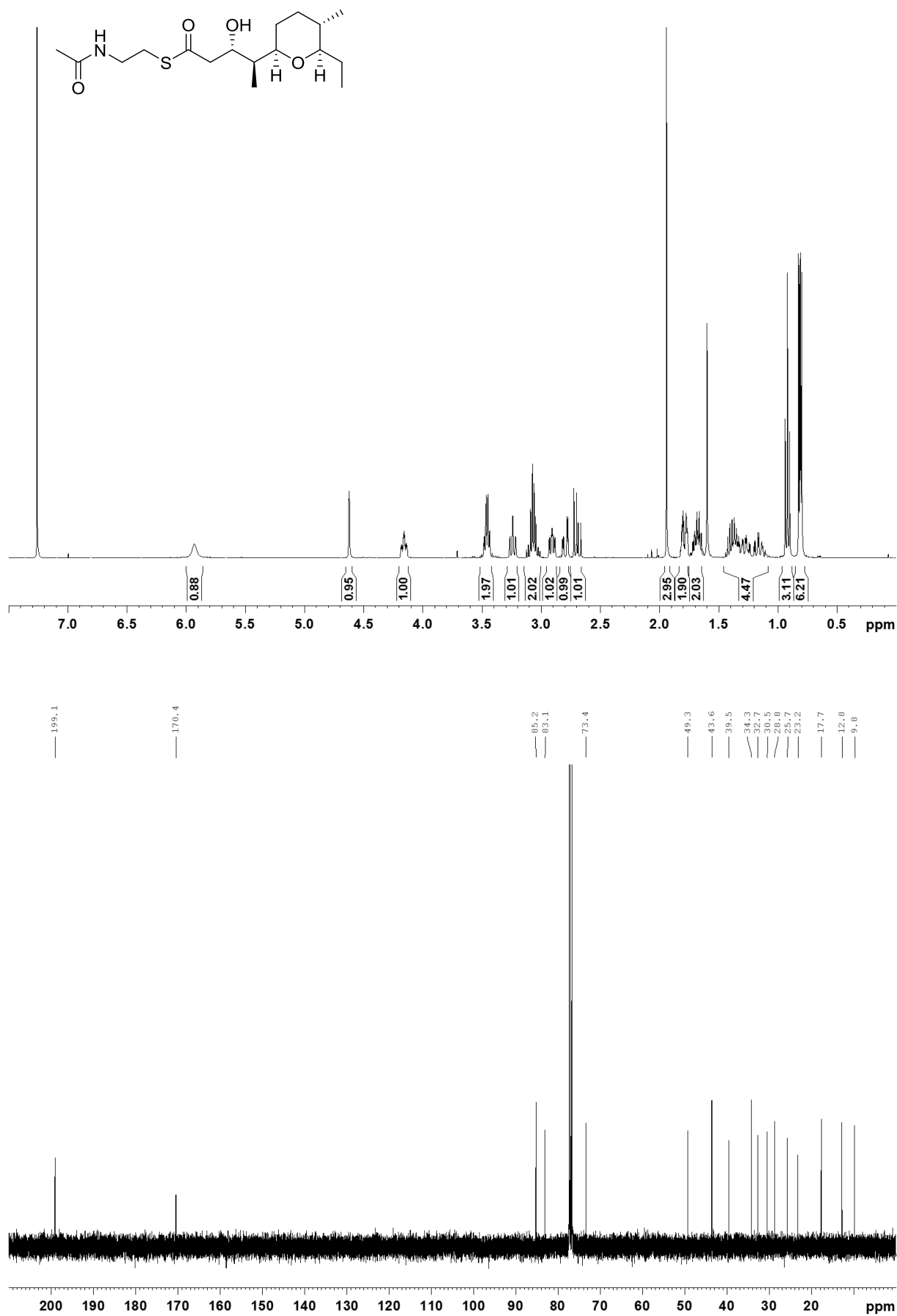
13.7

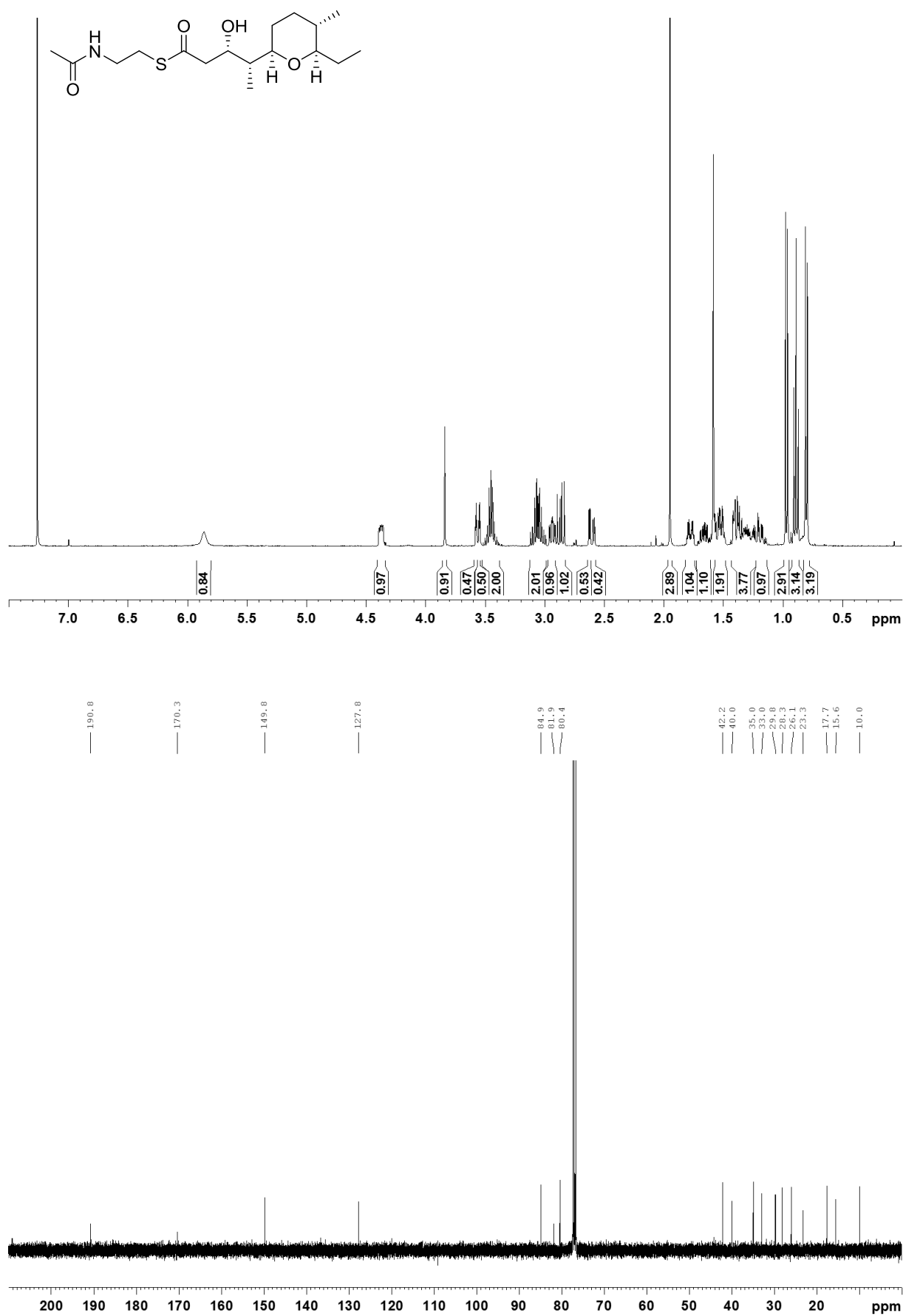
11.8
9.8
9.6

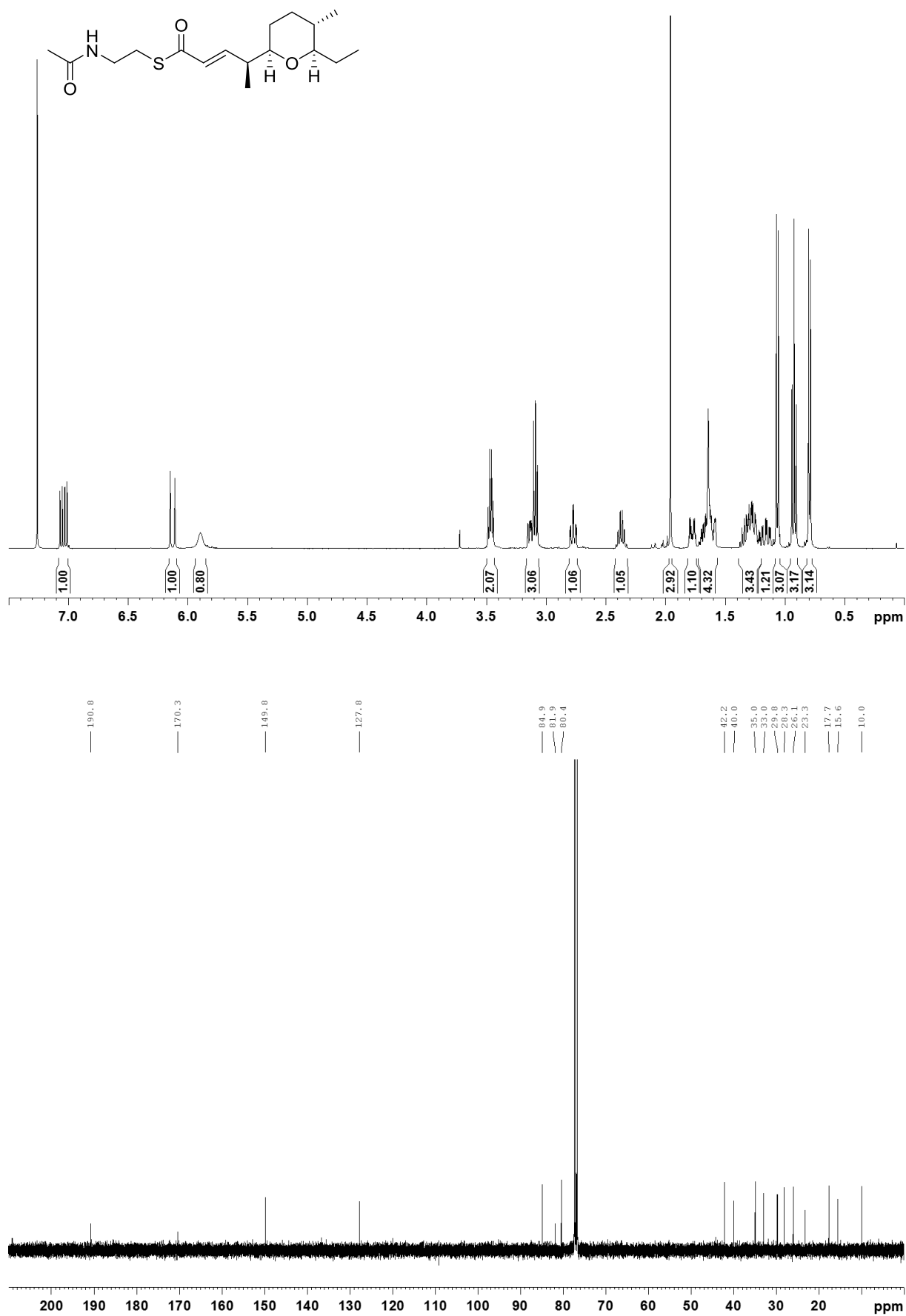


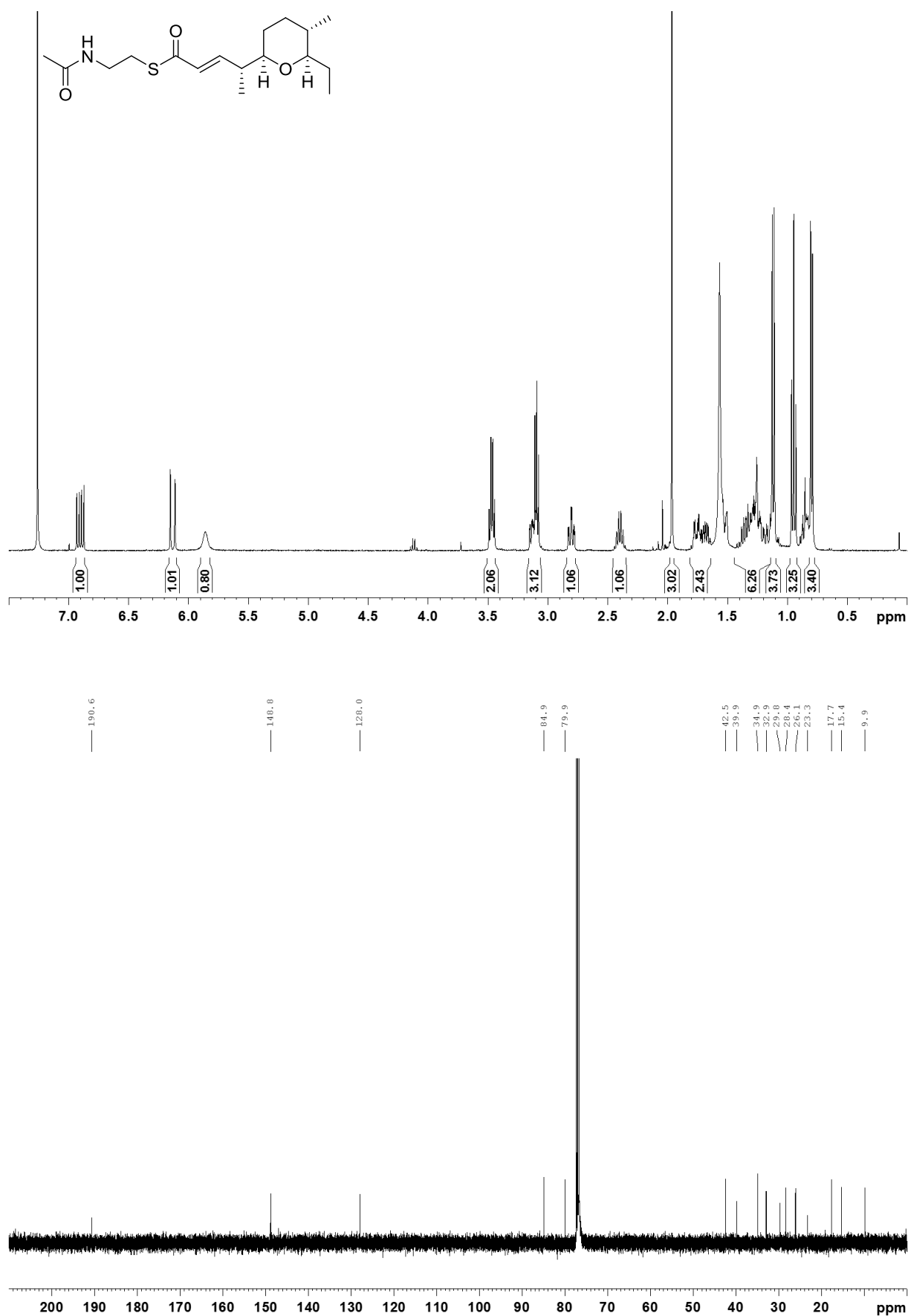


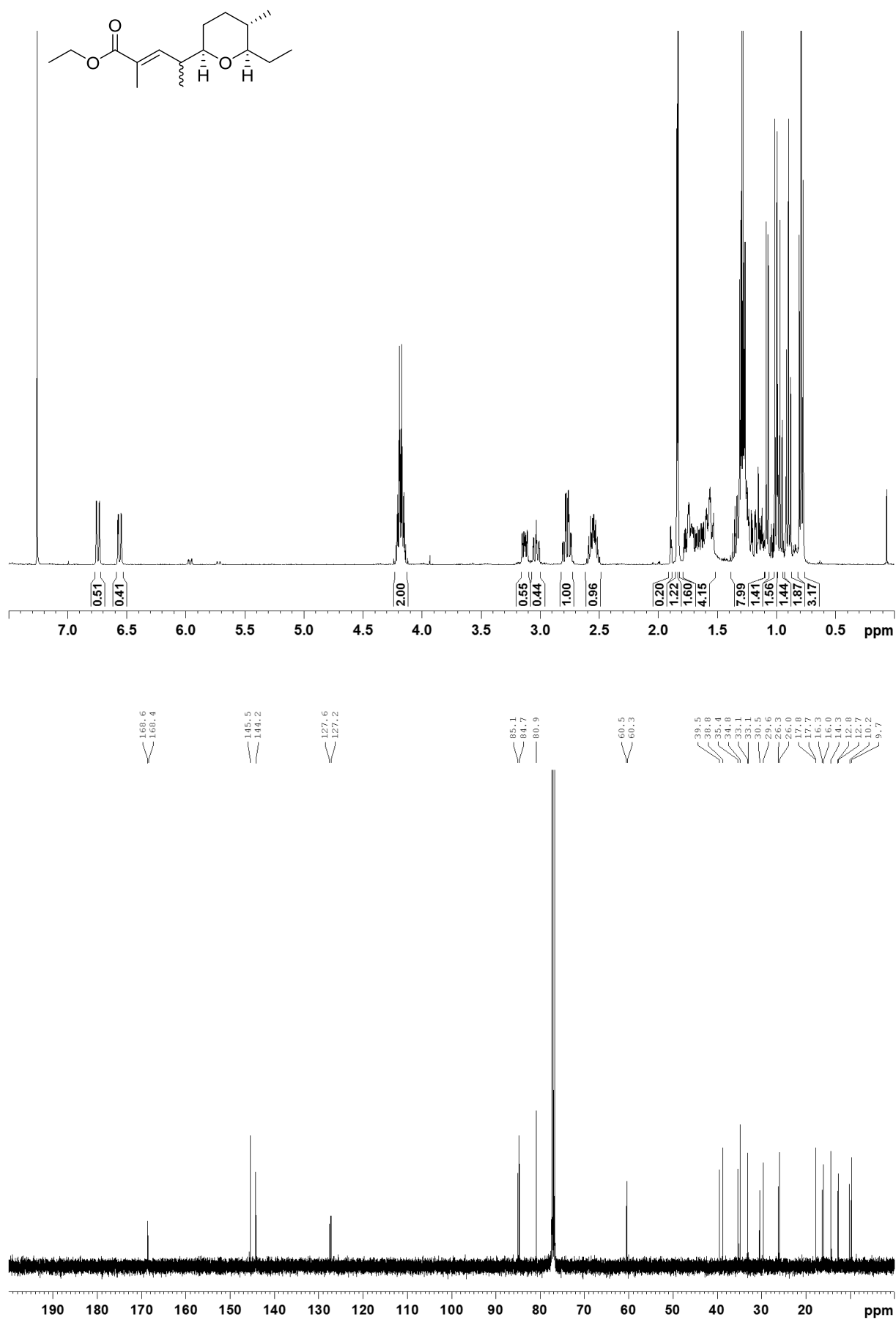


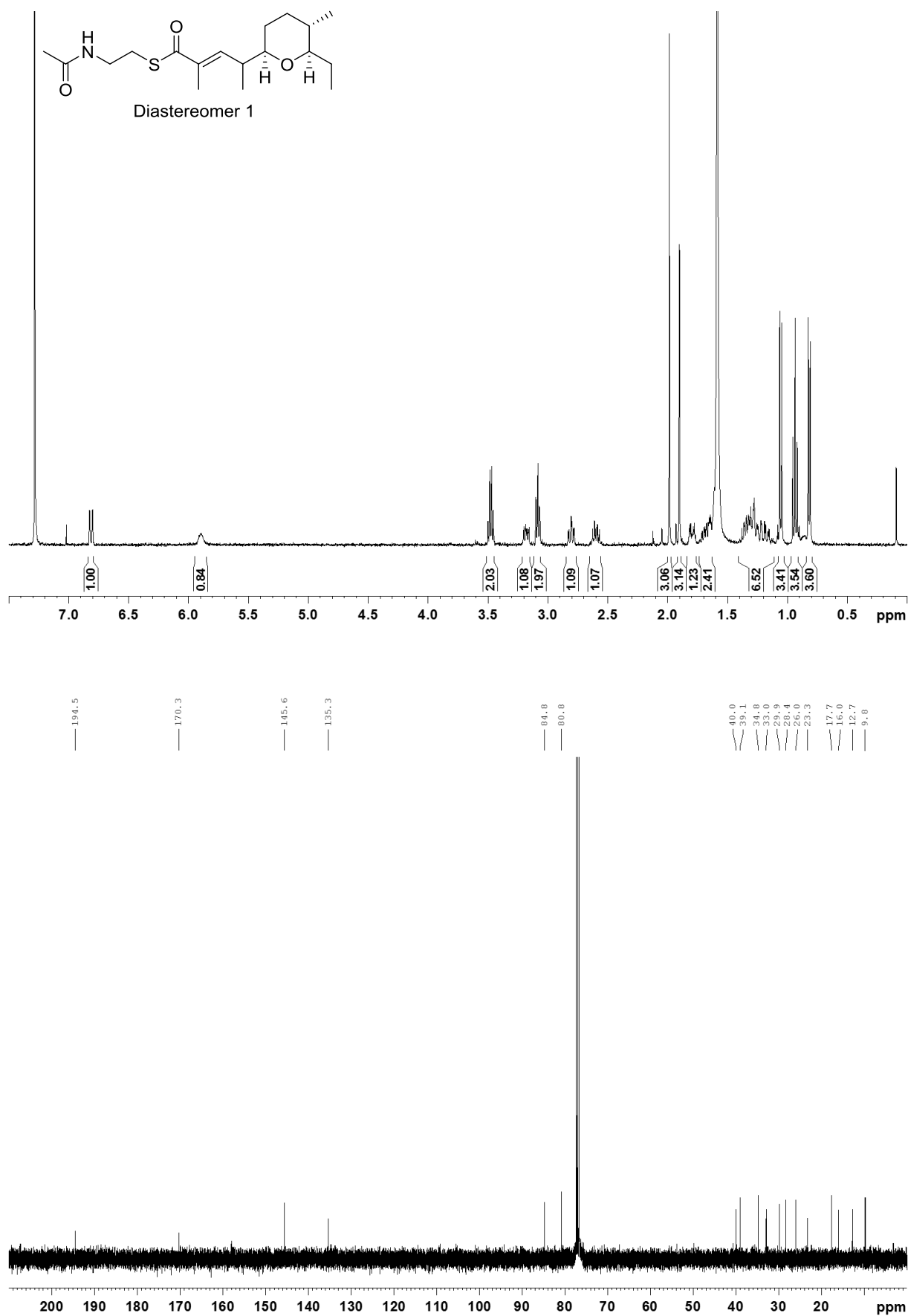


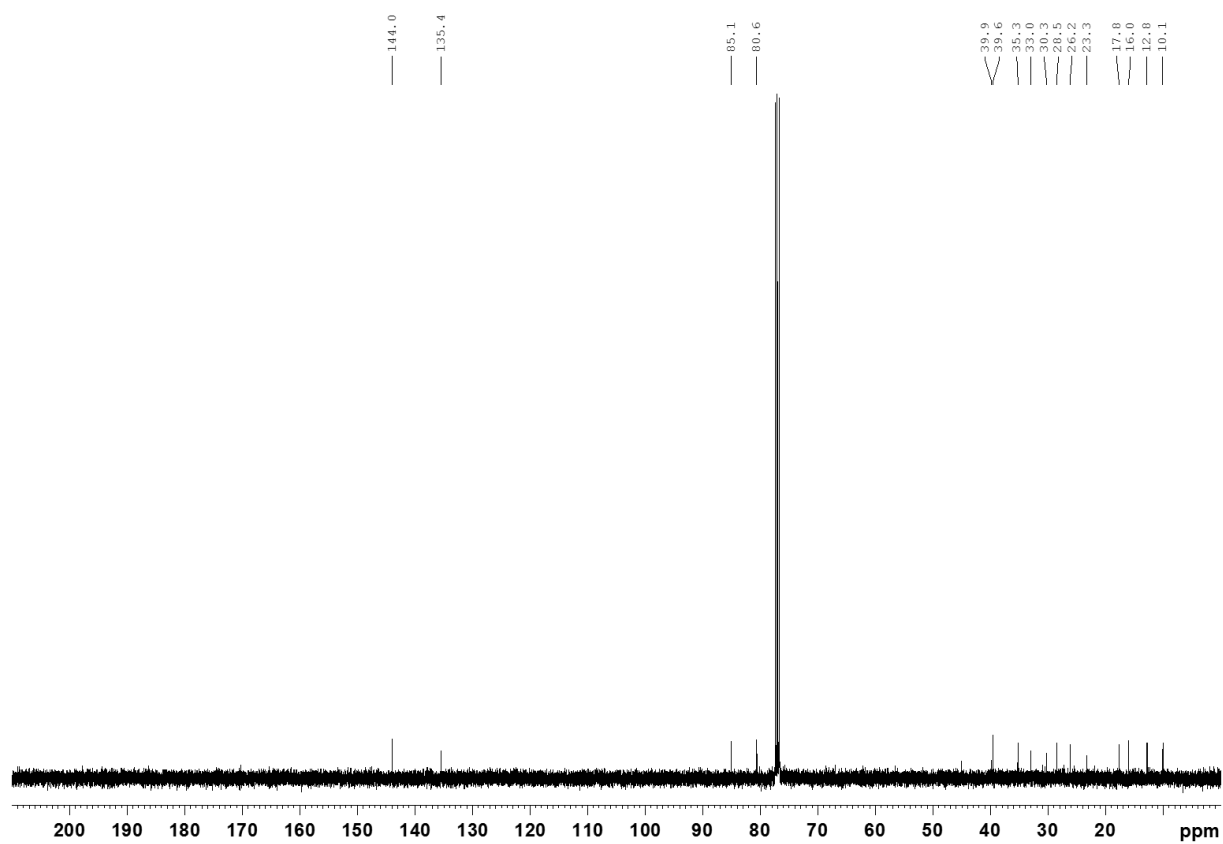
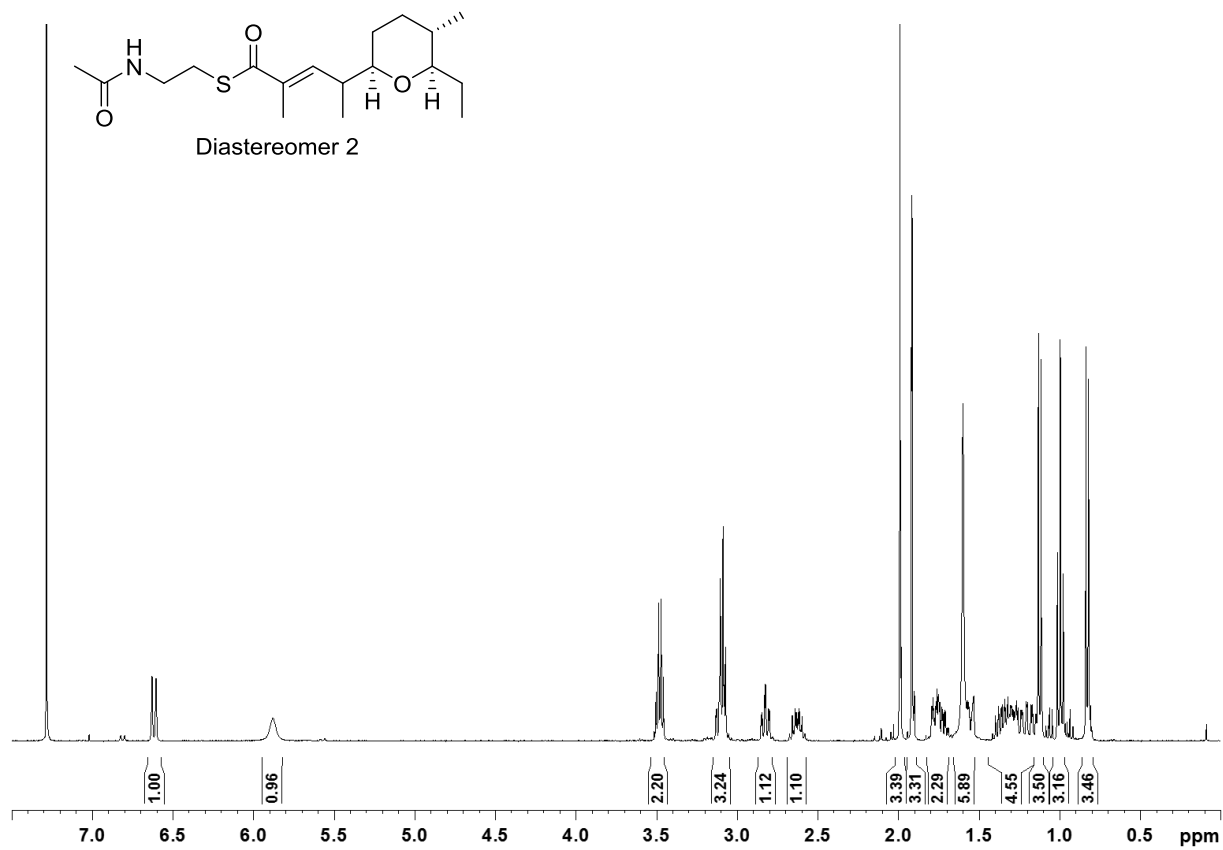


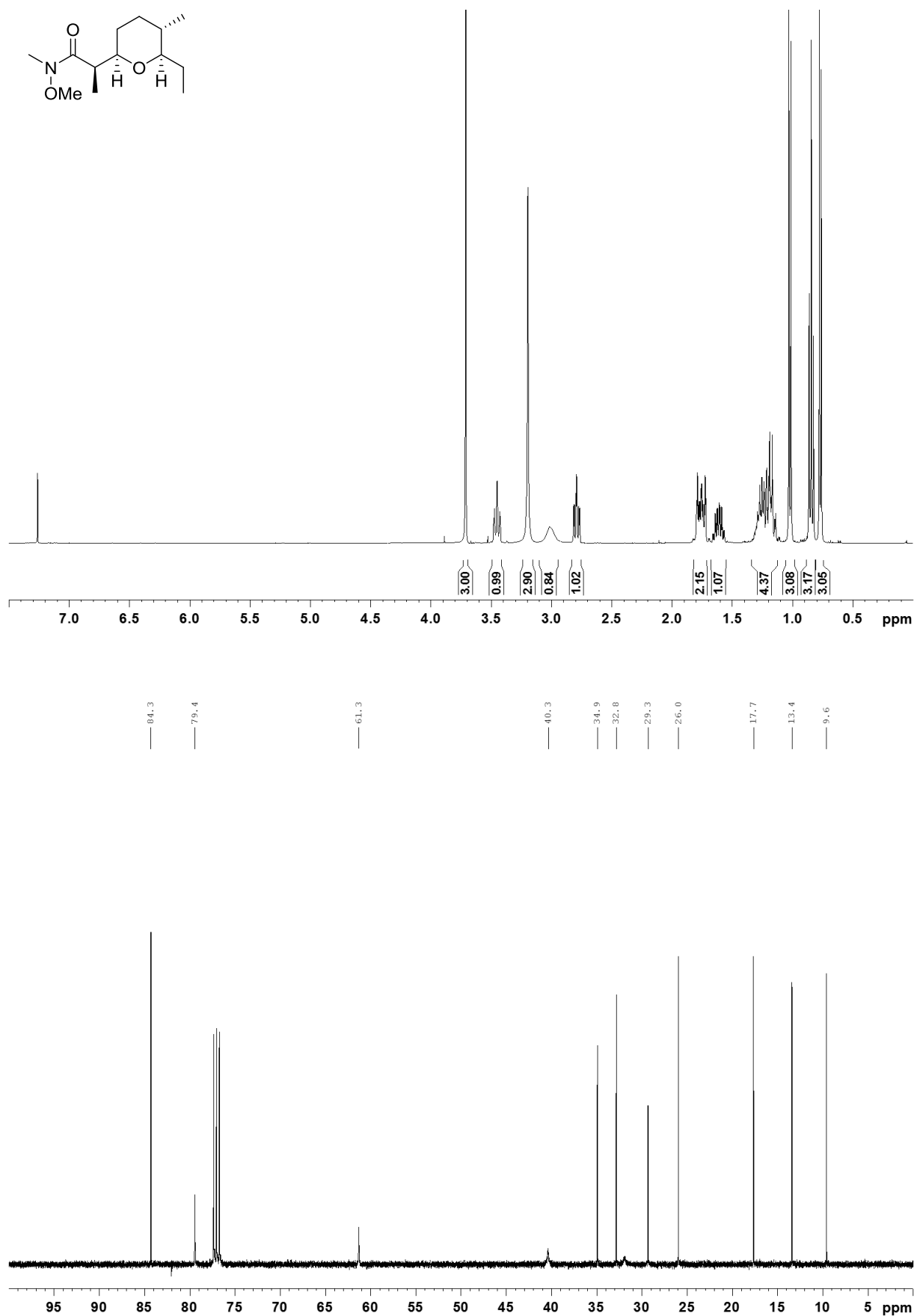


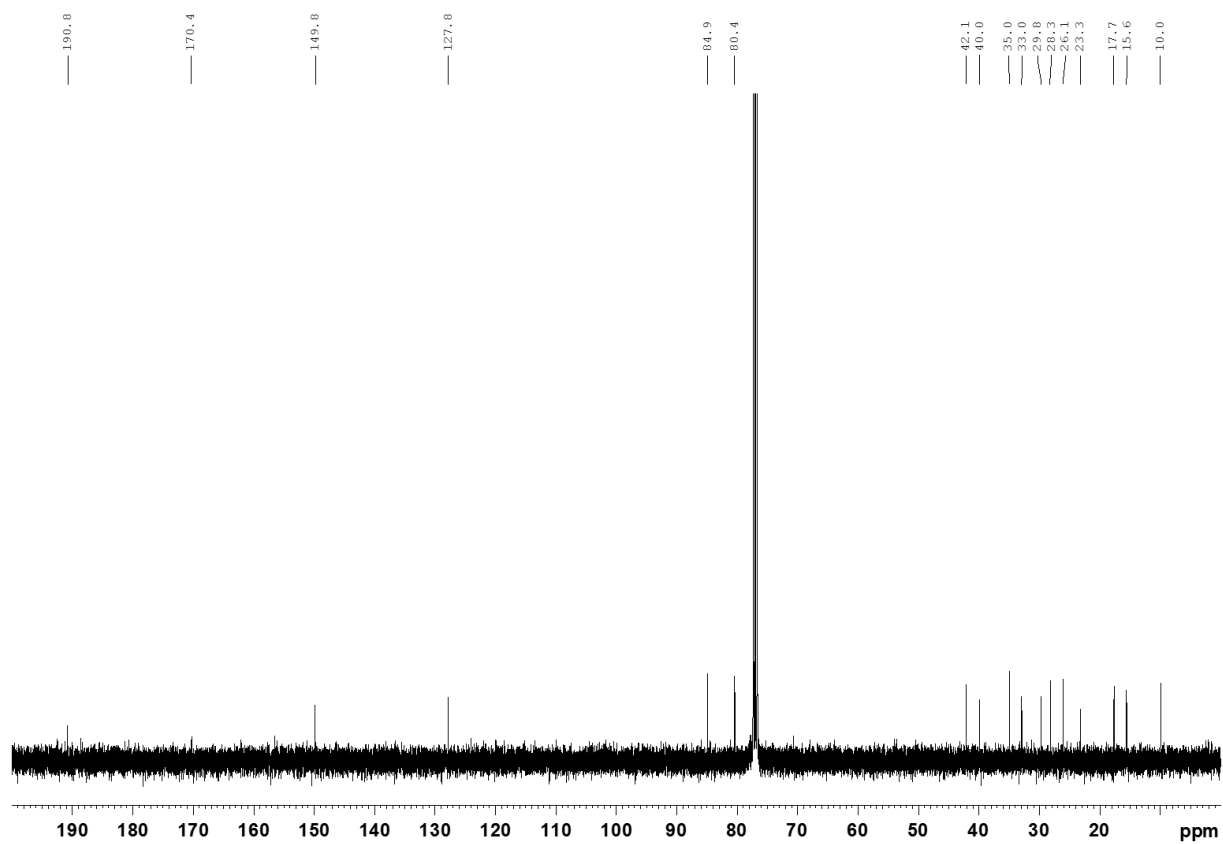
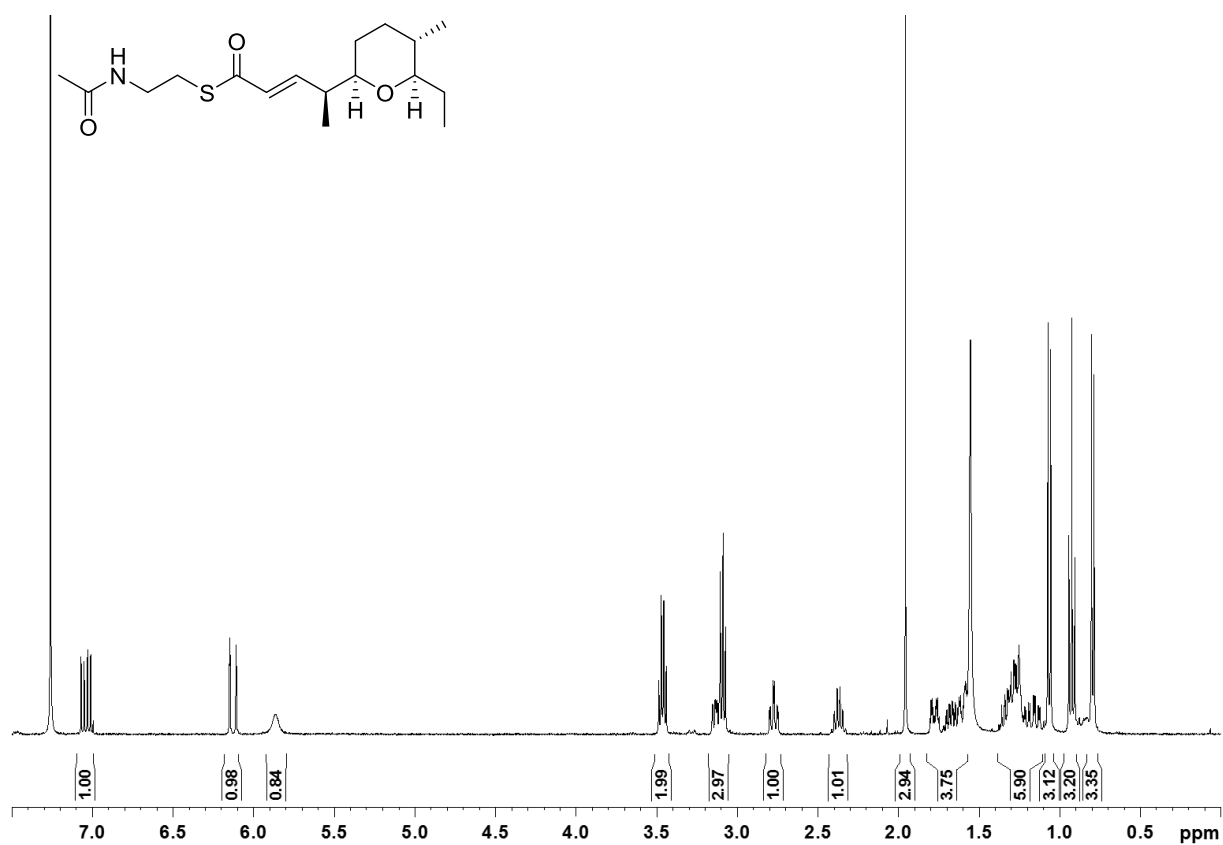


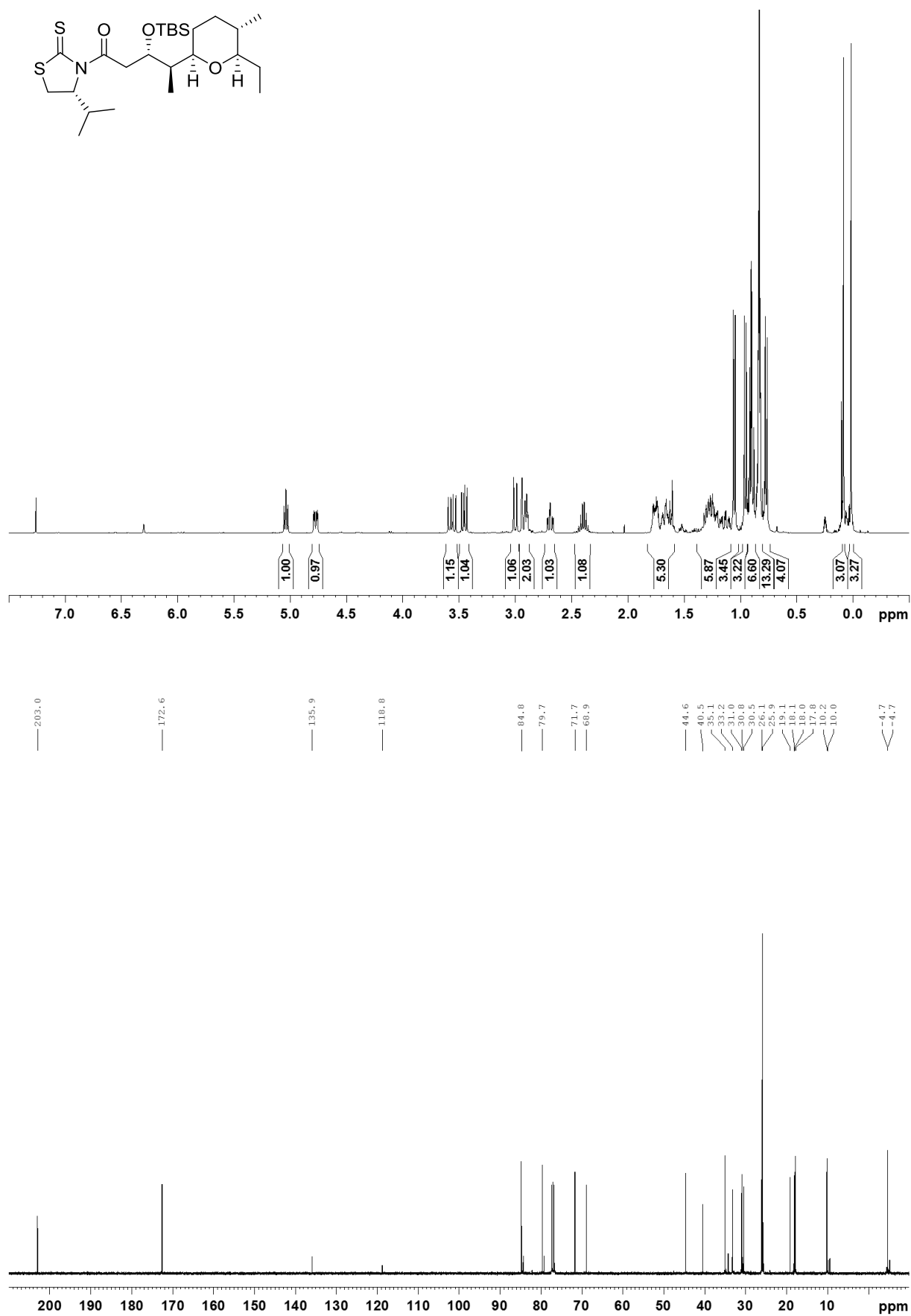












— 203.0

— 172.6

— 135.9

— 118.8

— 84.8

— 79.7

— 71.7

— 68.9

— 44.6

— 40.5

— 35.1

— 31.2

— 30.8

— 30.5

— 26.1

— 25.9

— 19.1

— 18.1

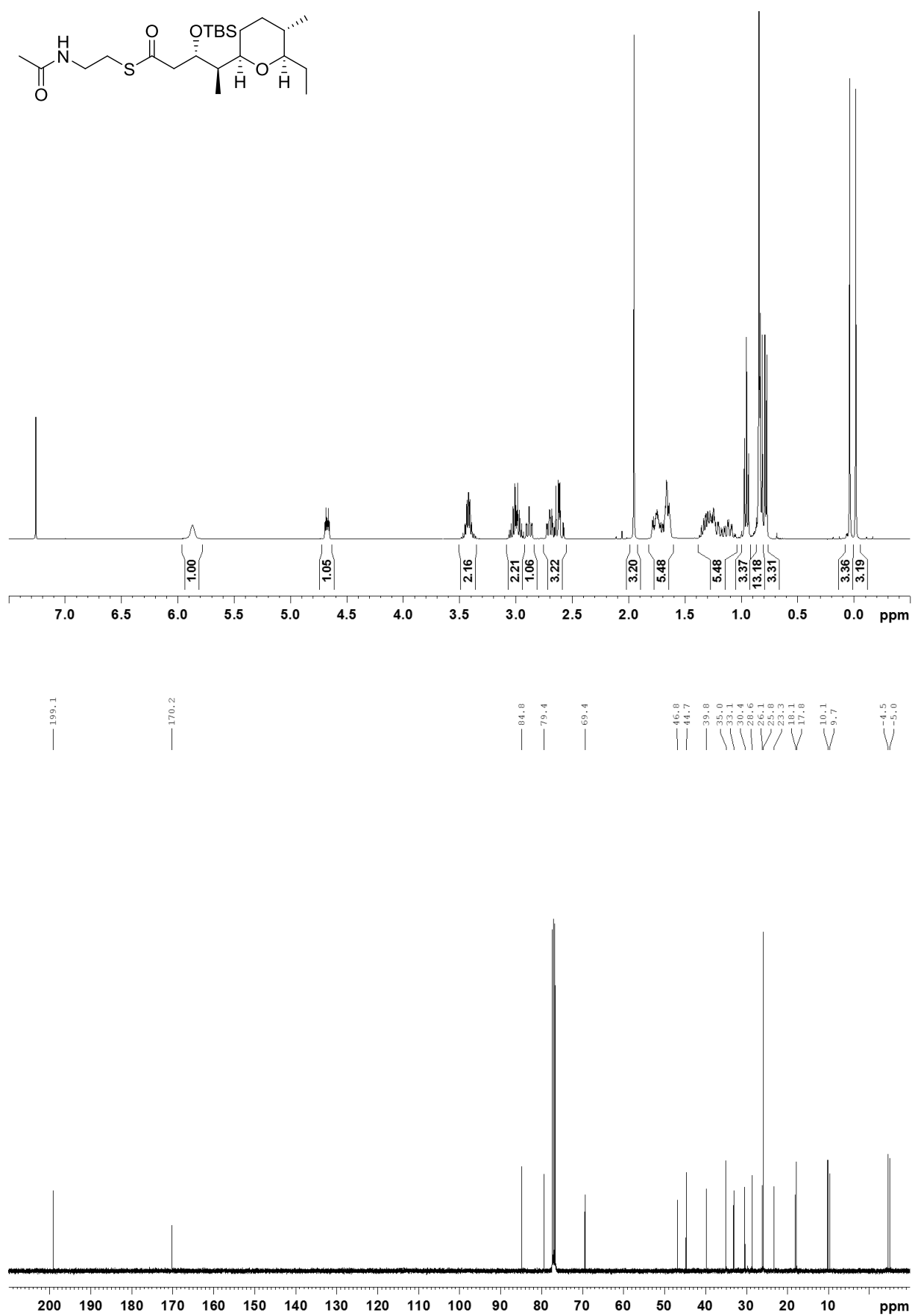
— 17.8

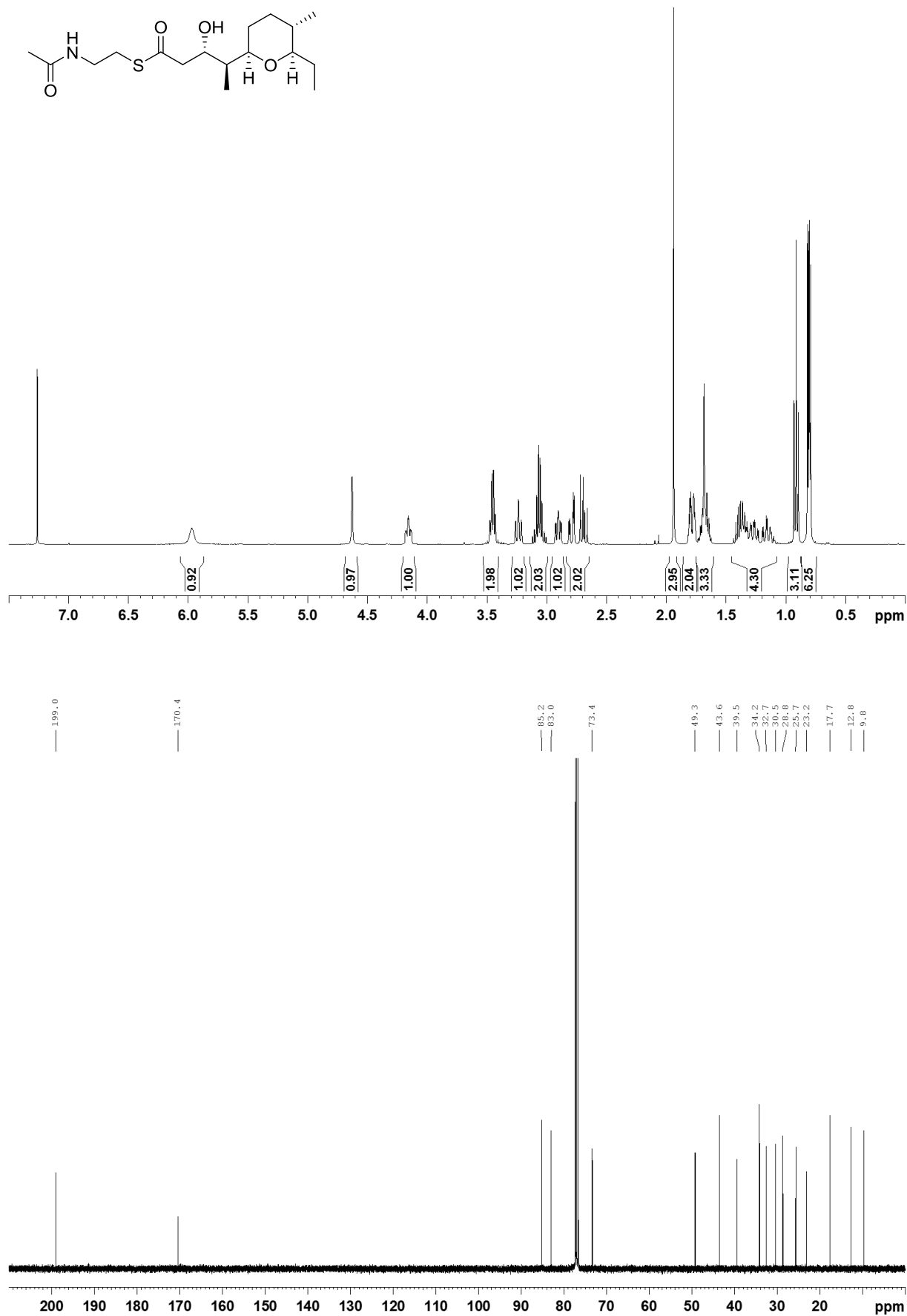
— 10.2

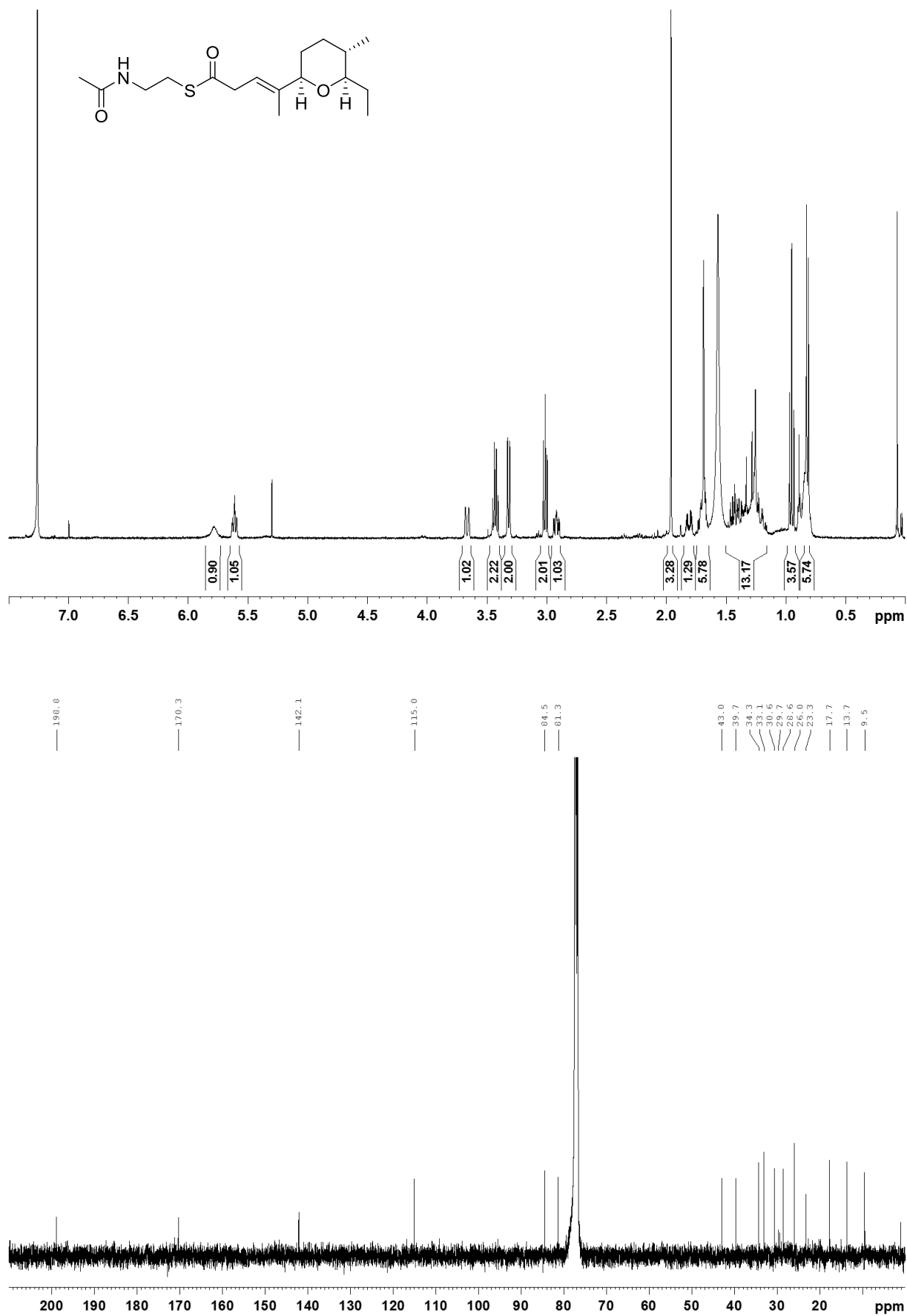
— 10.0

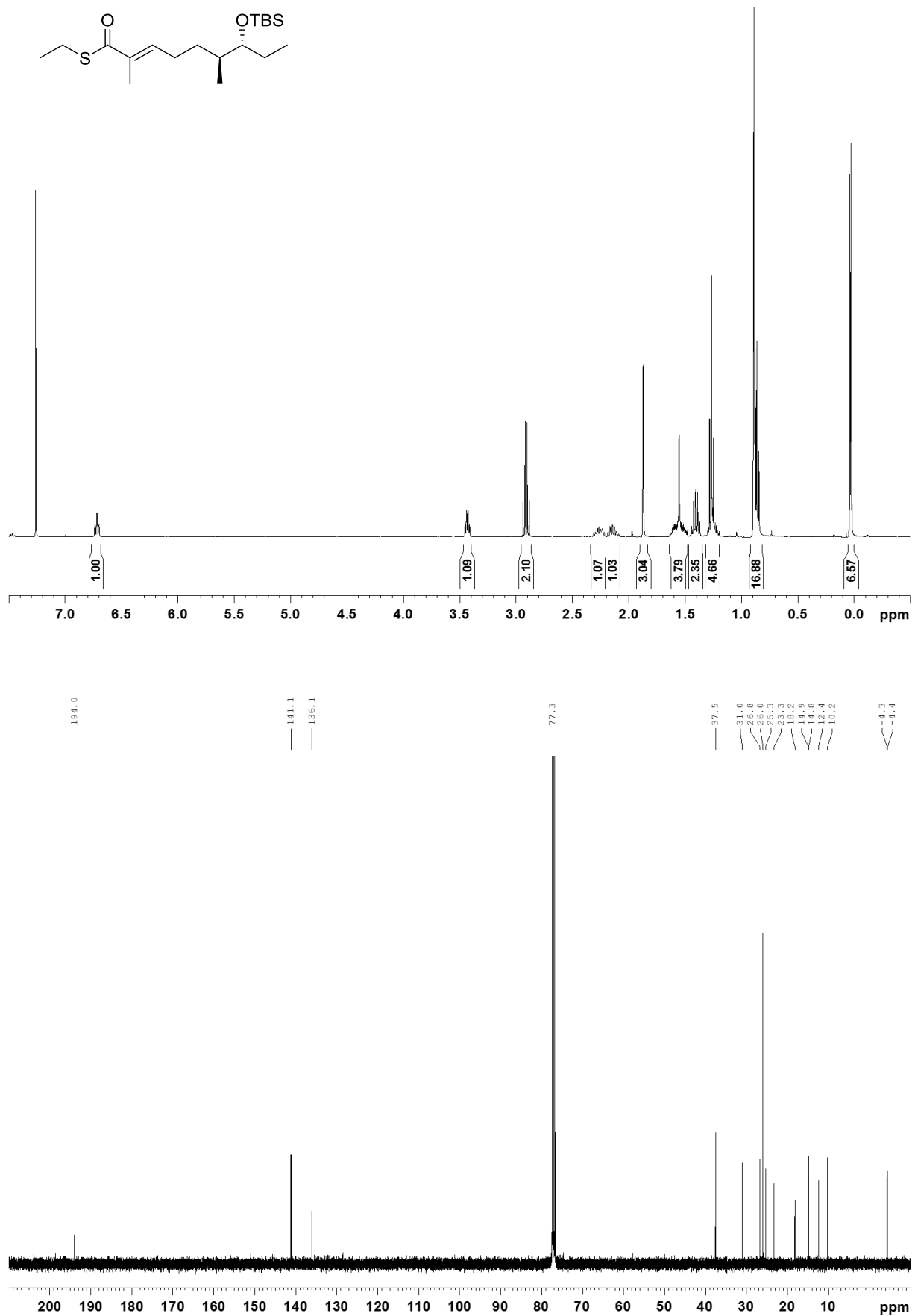
— 4.7

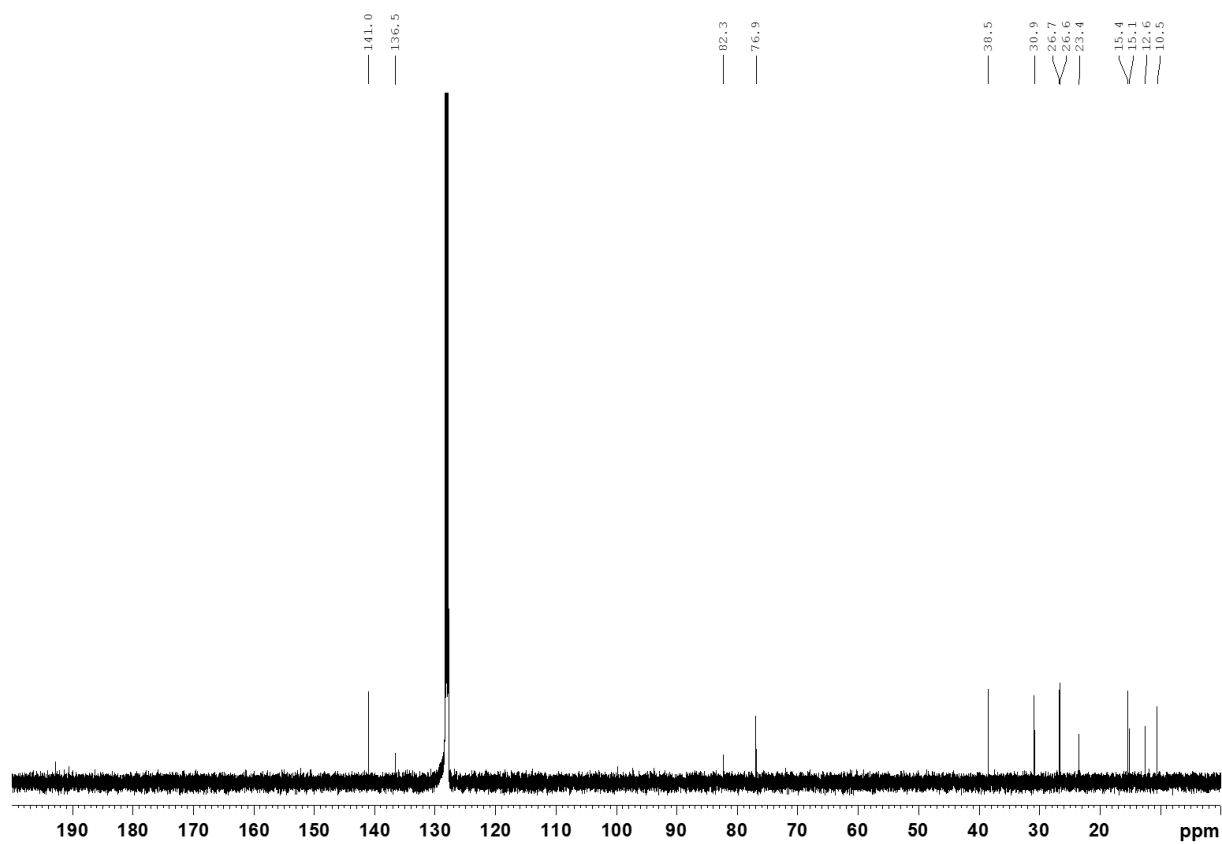
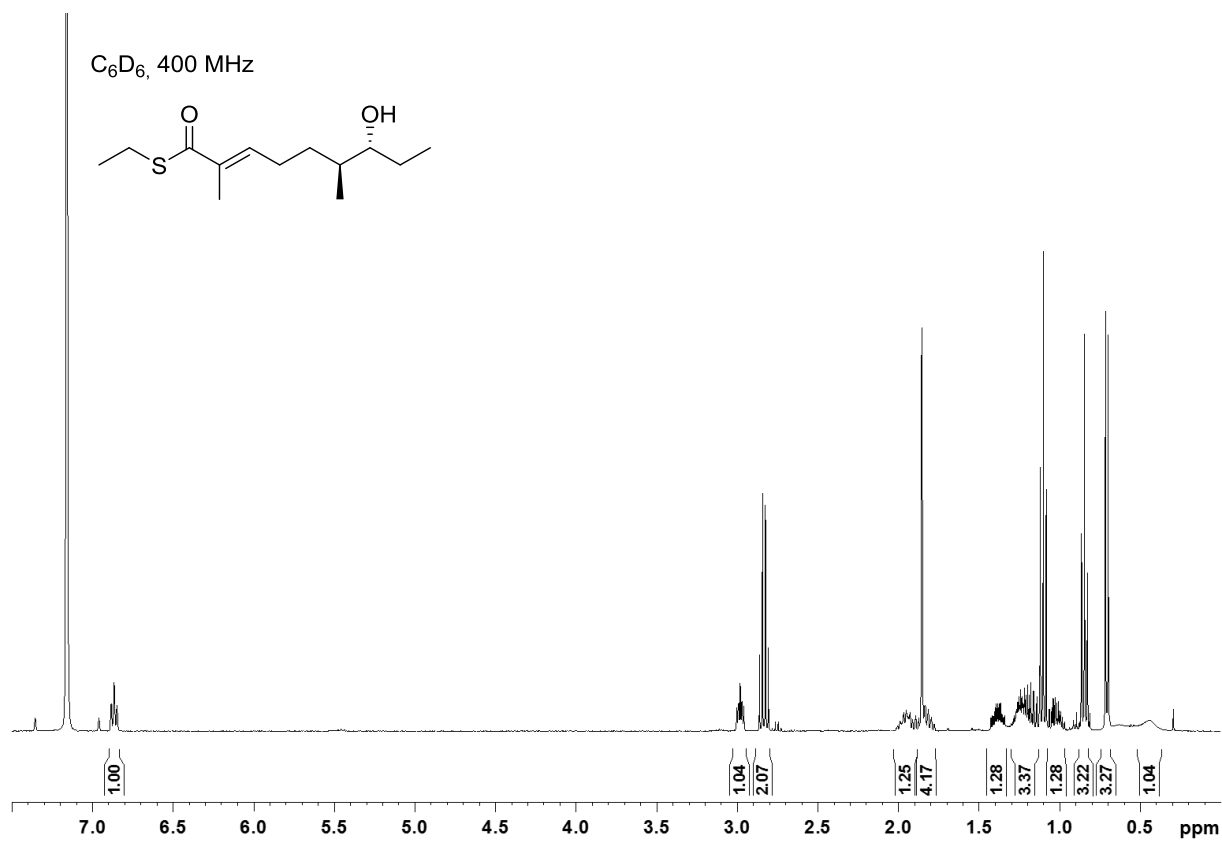
— 4.7

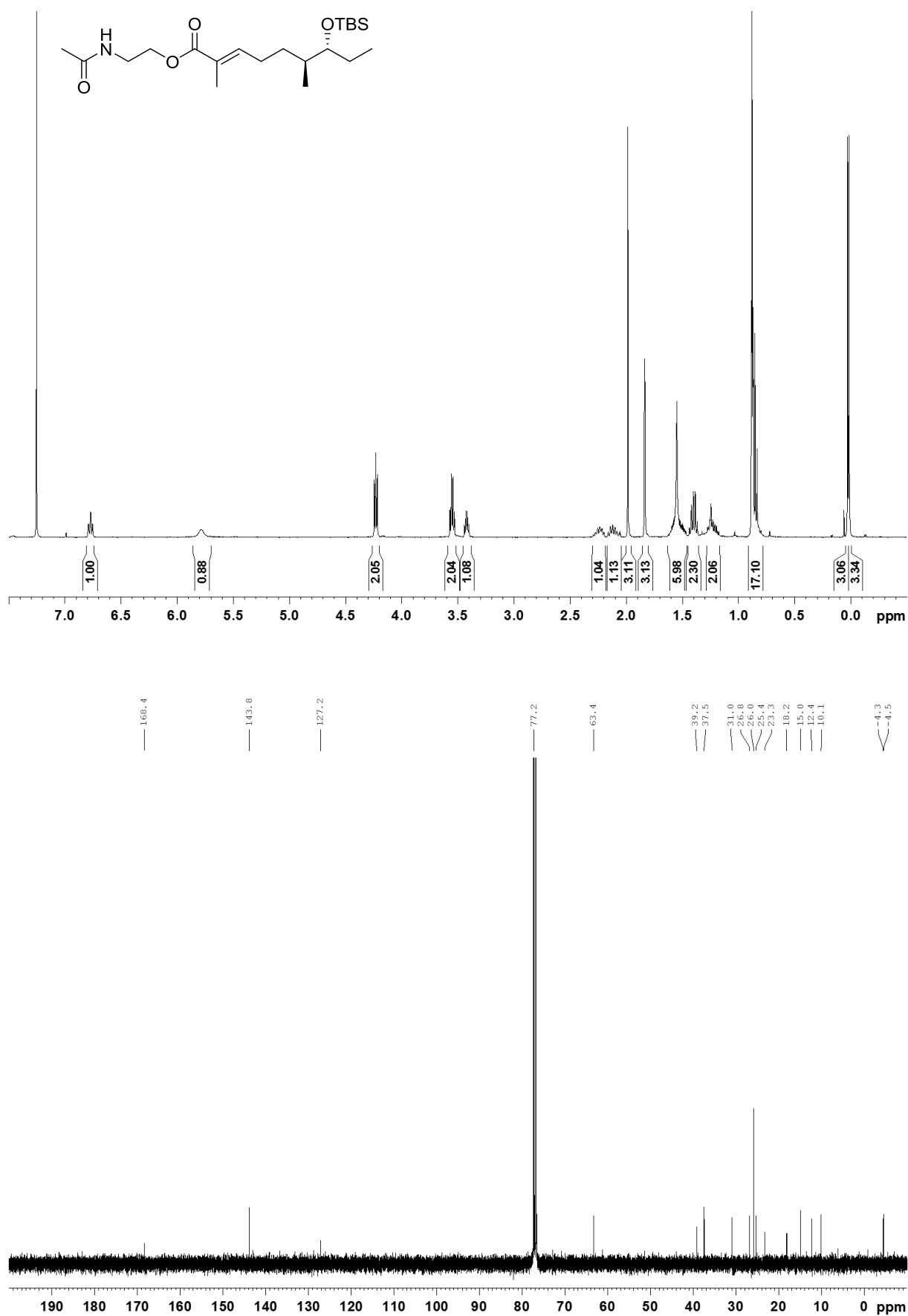


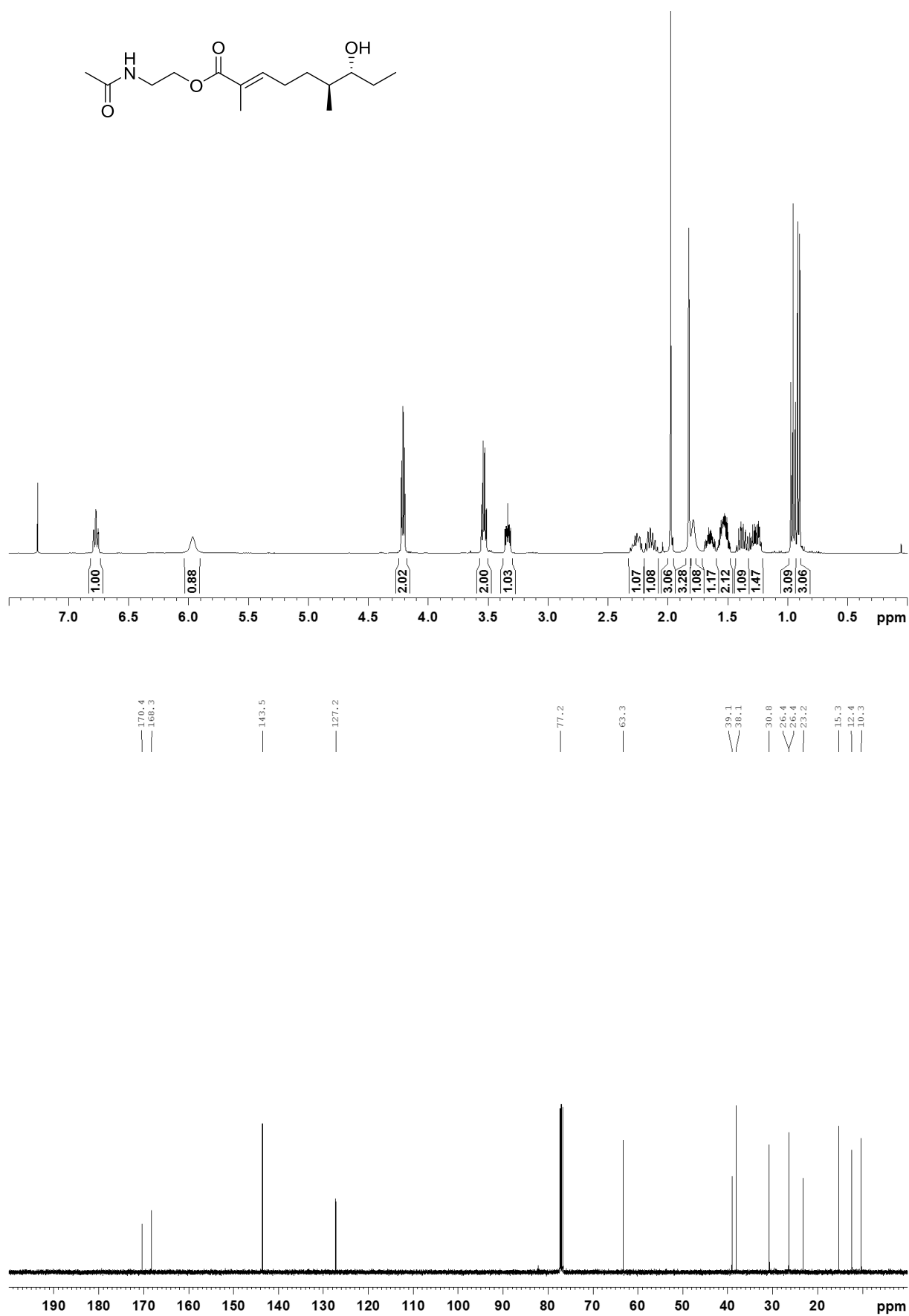


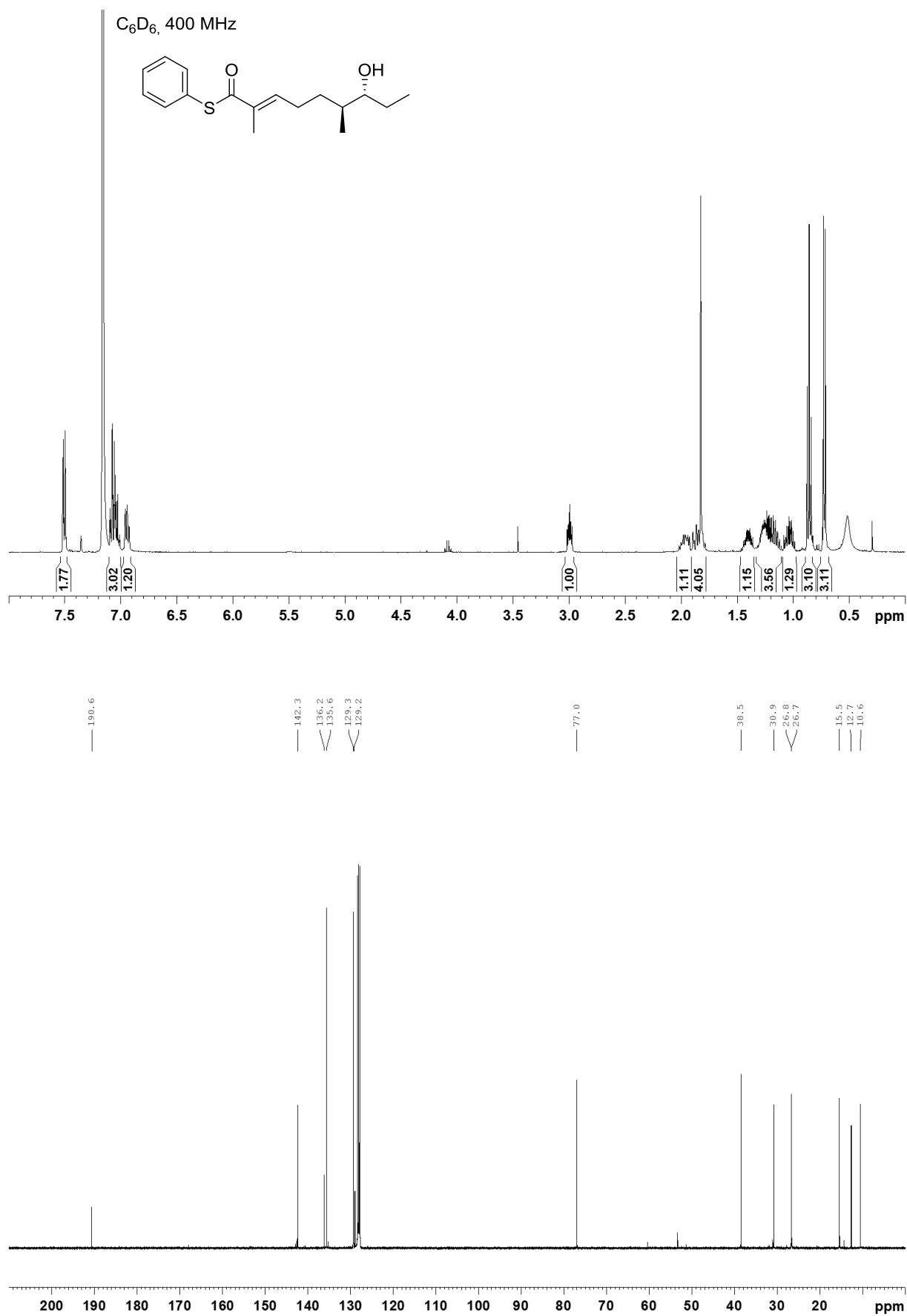


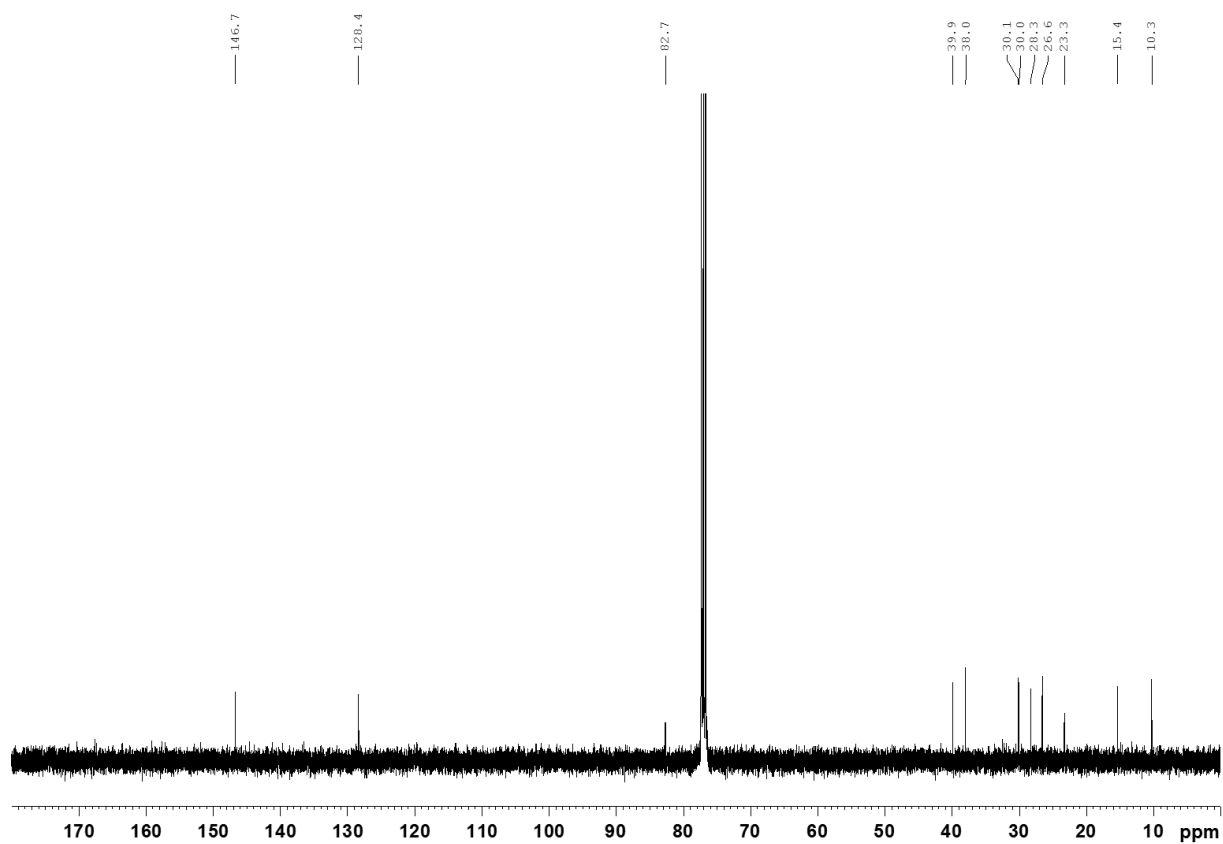
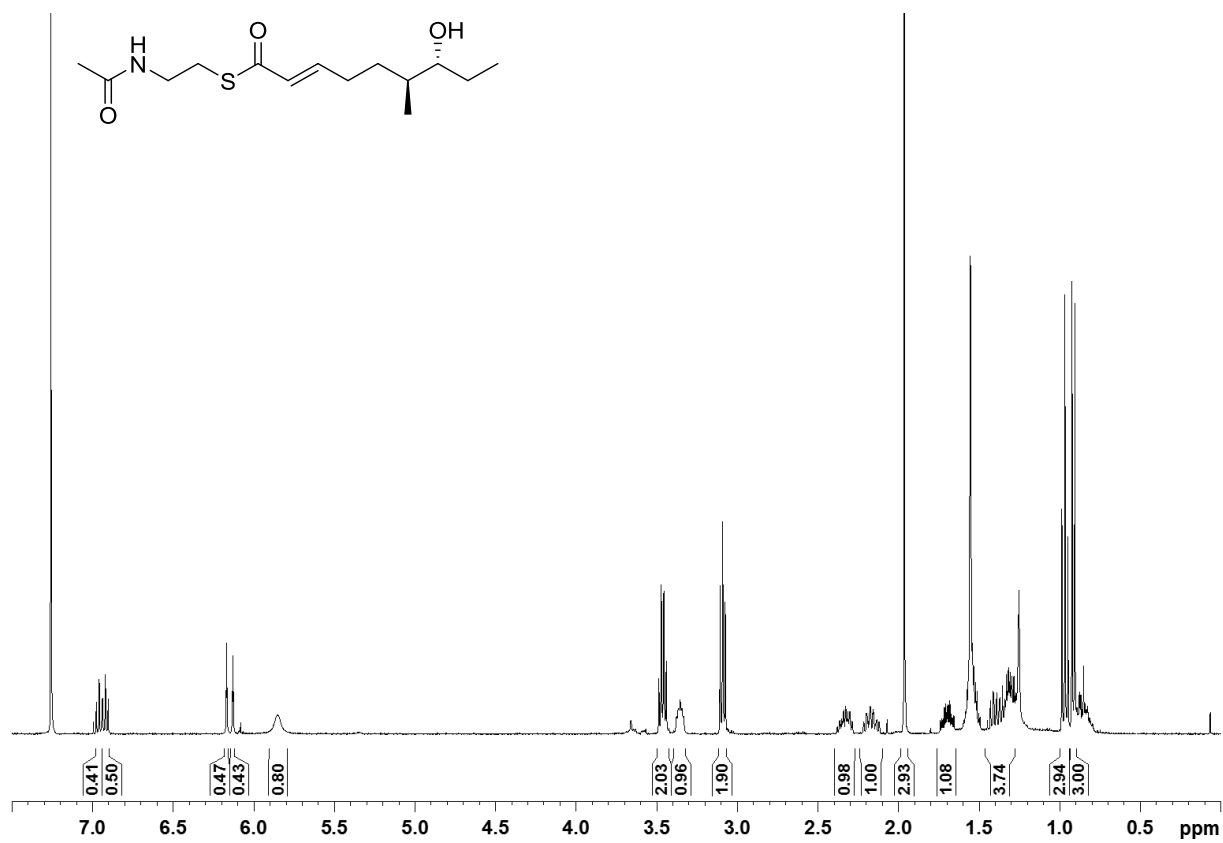


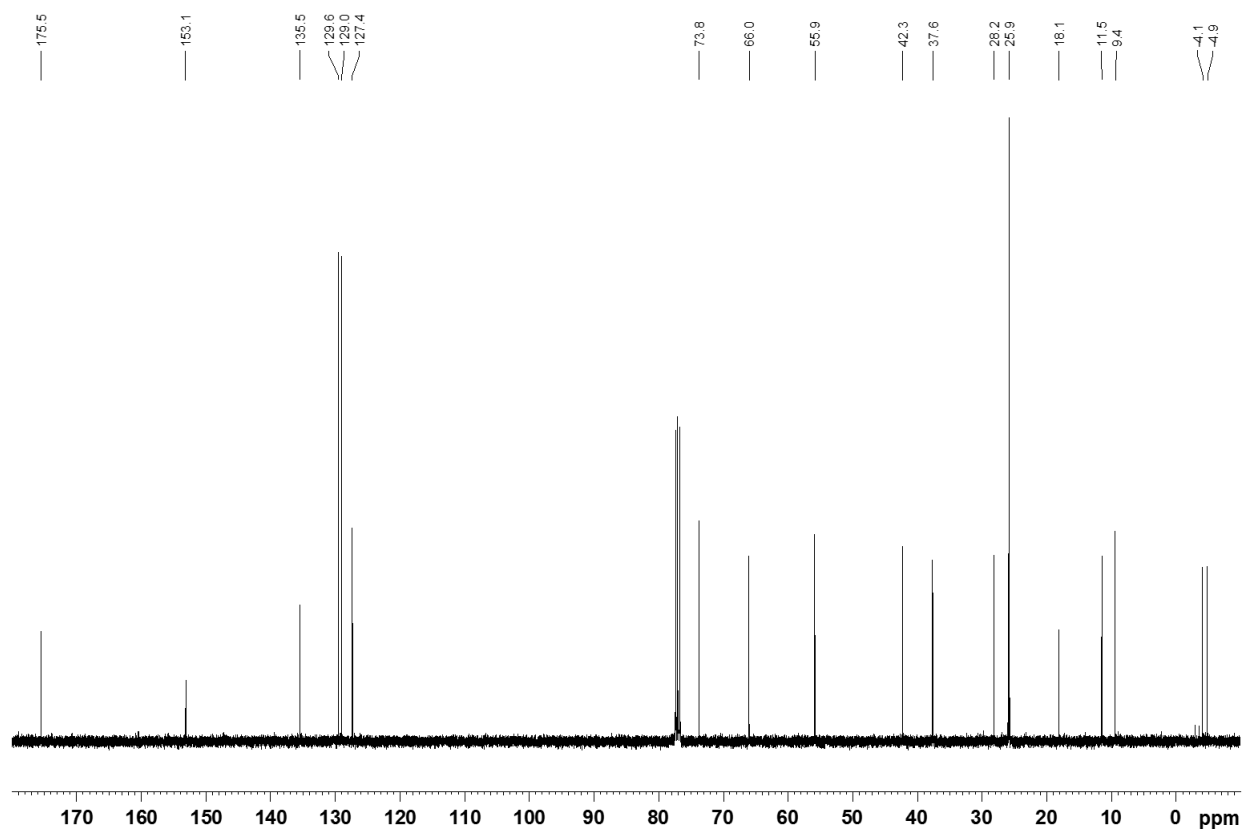
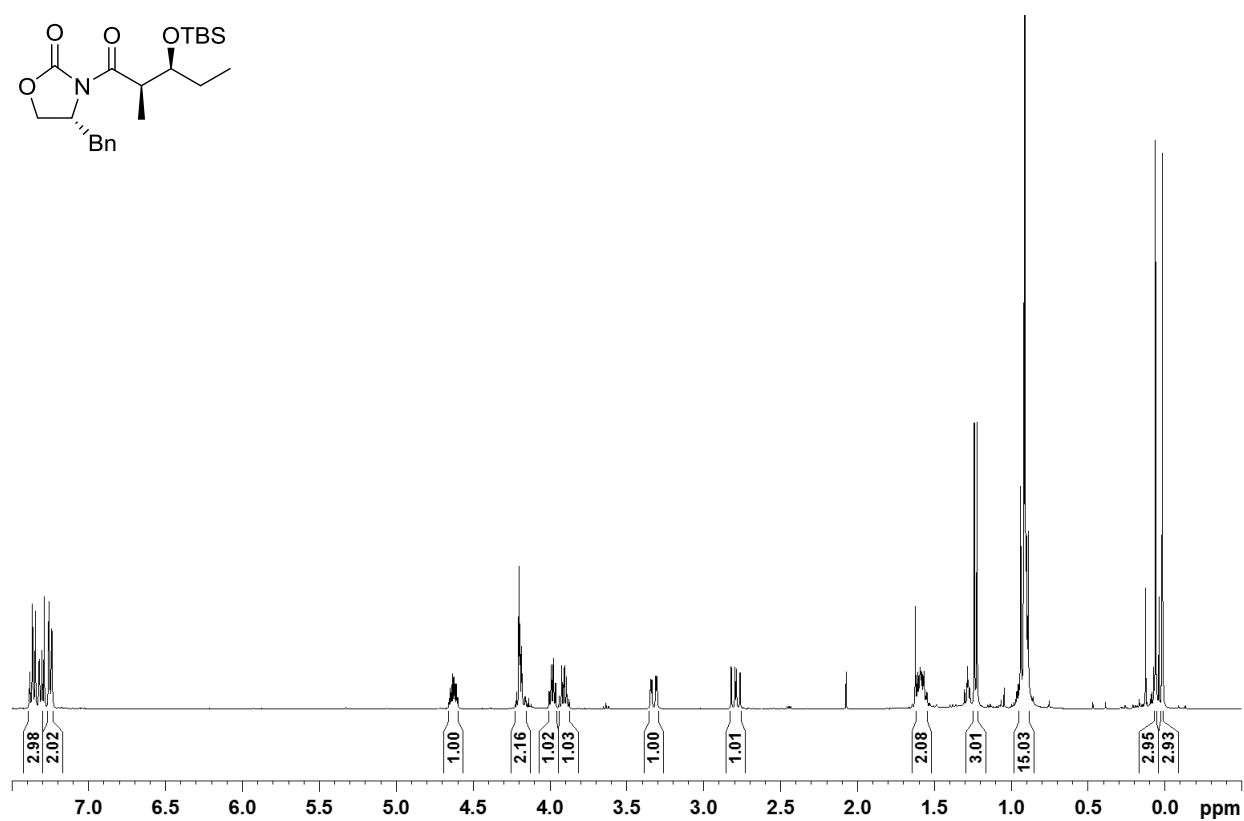
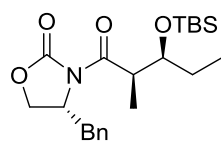


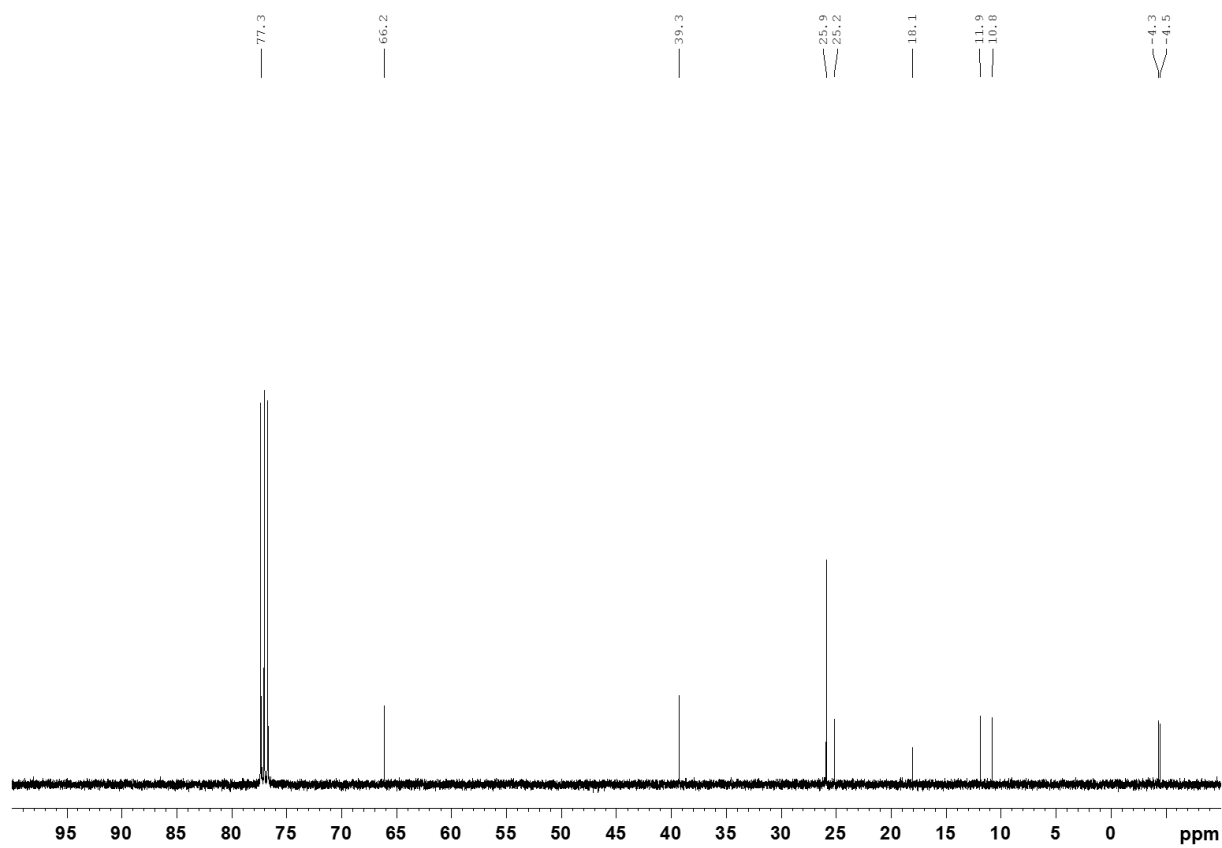
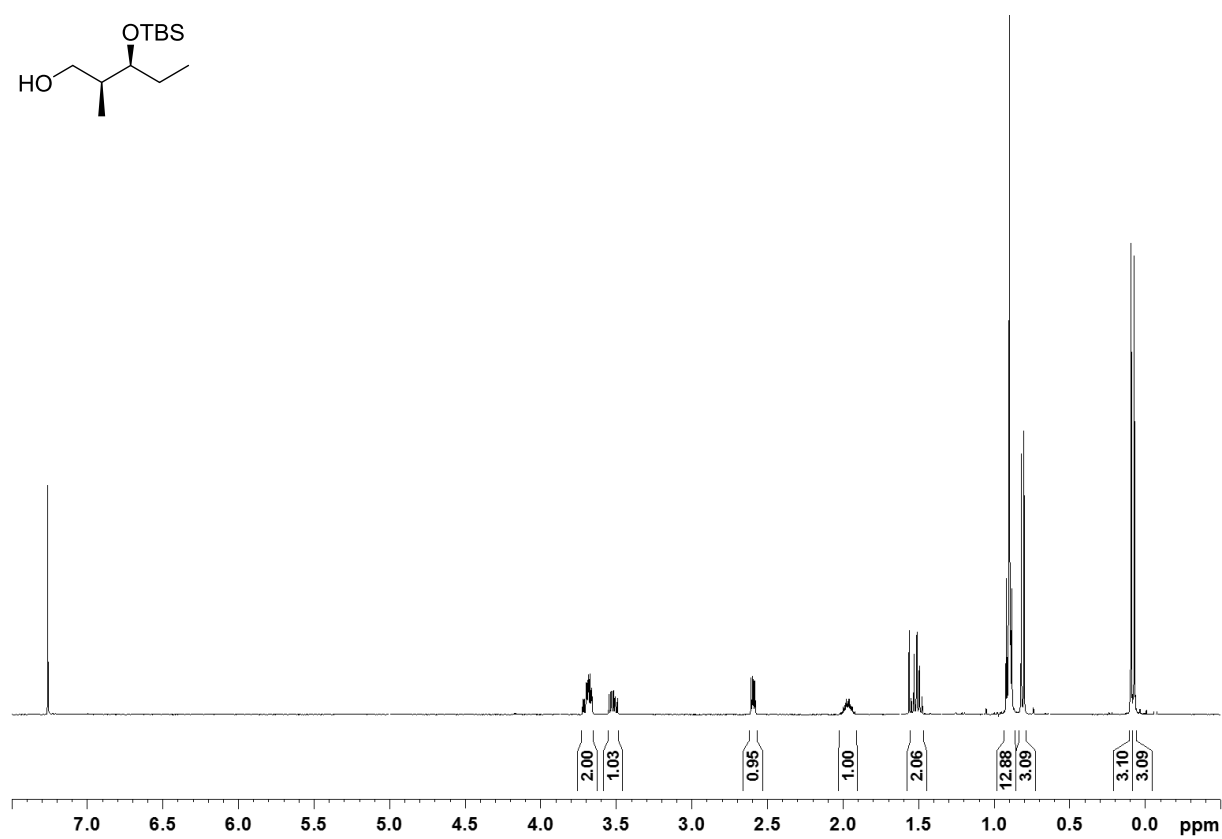
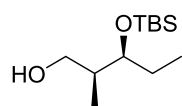


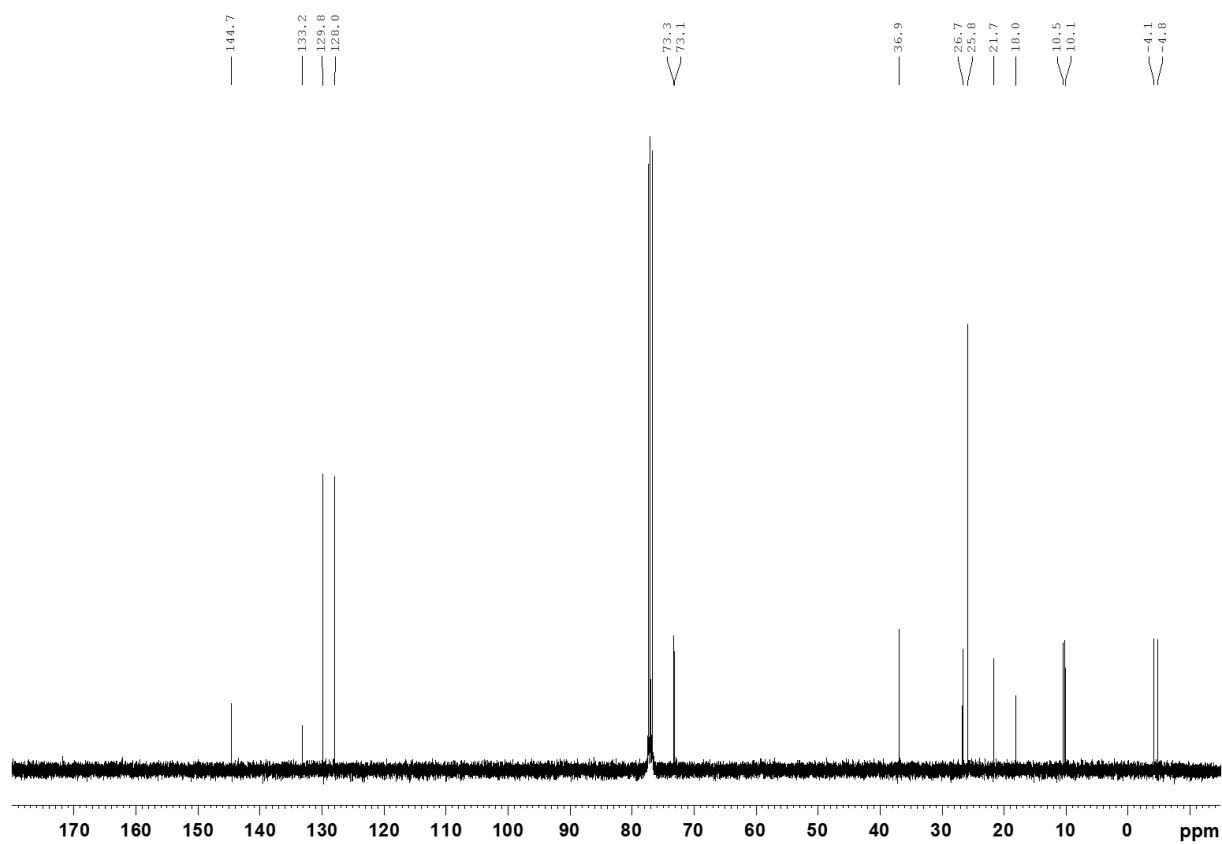
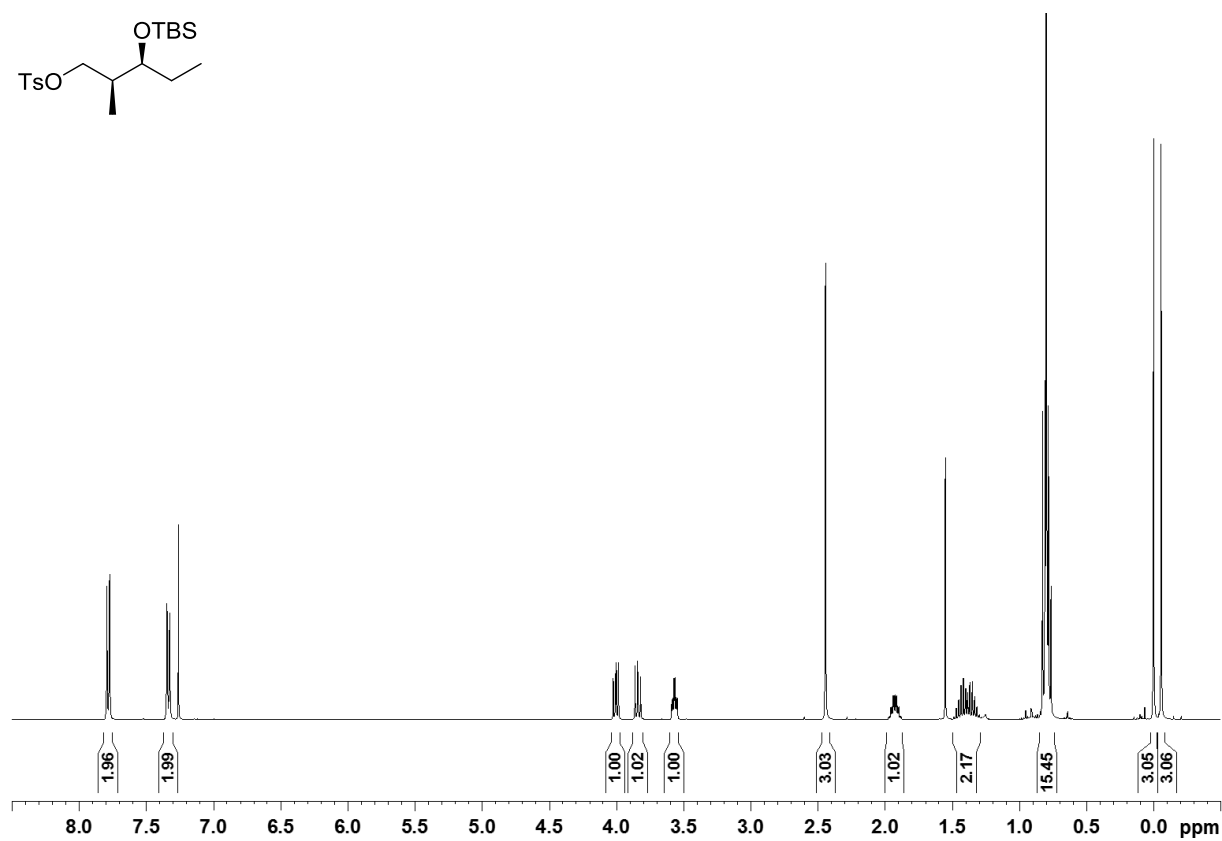
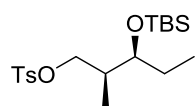


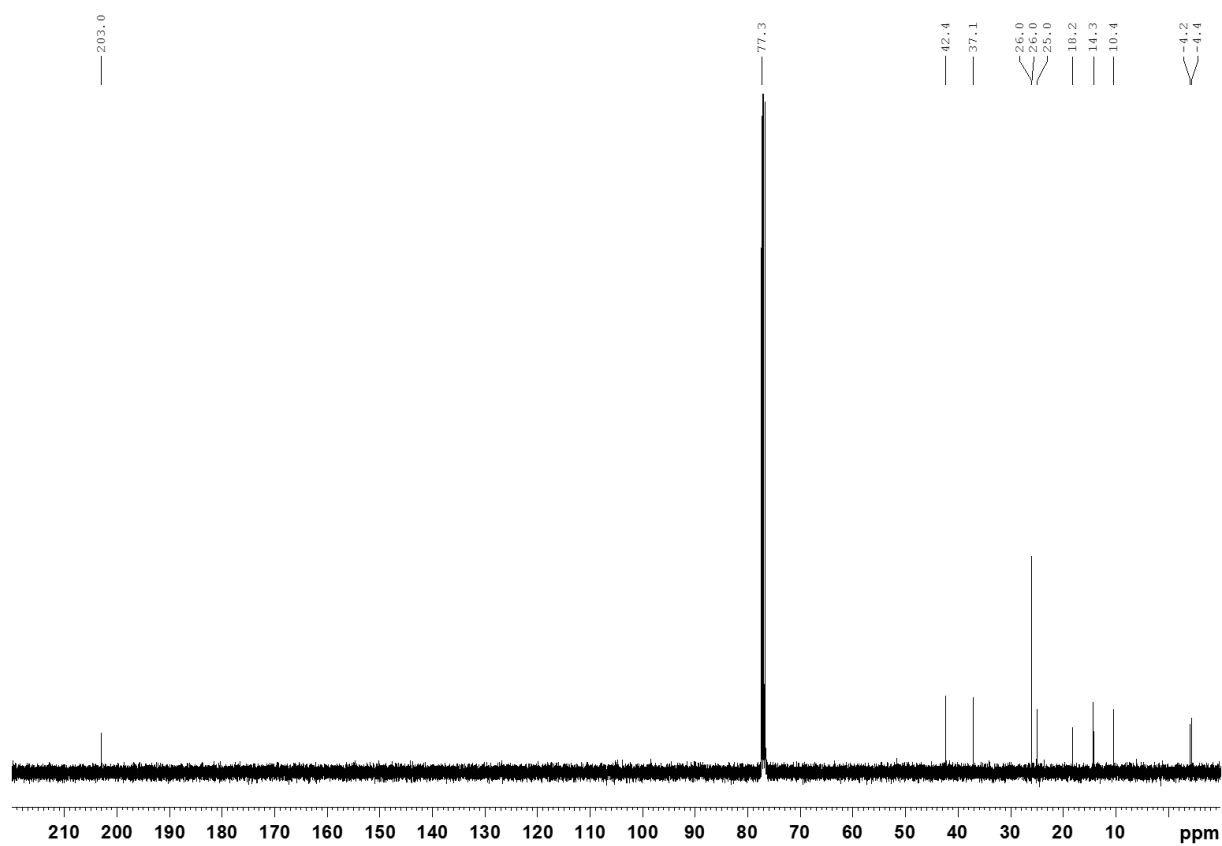
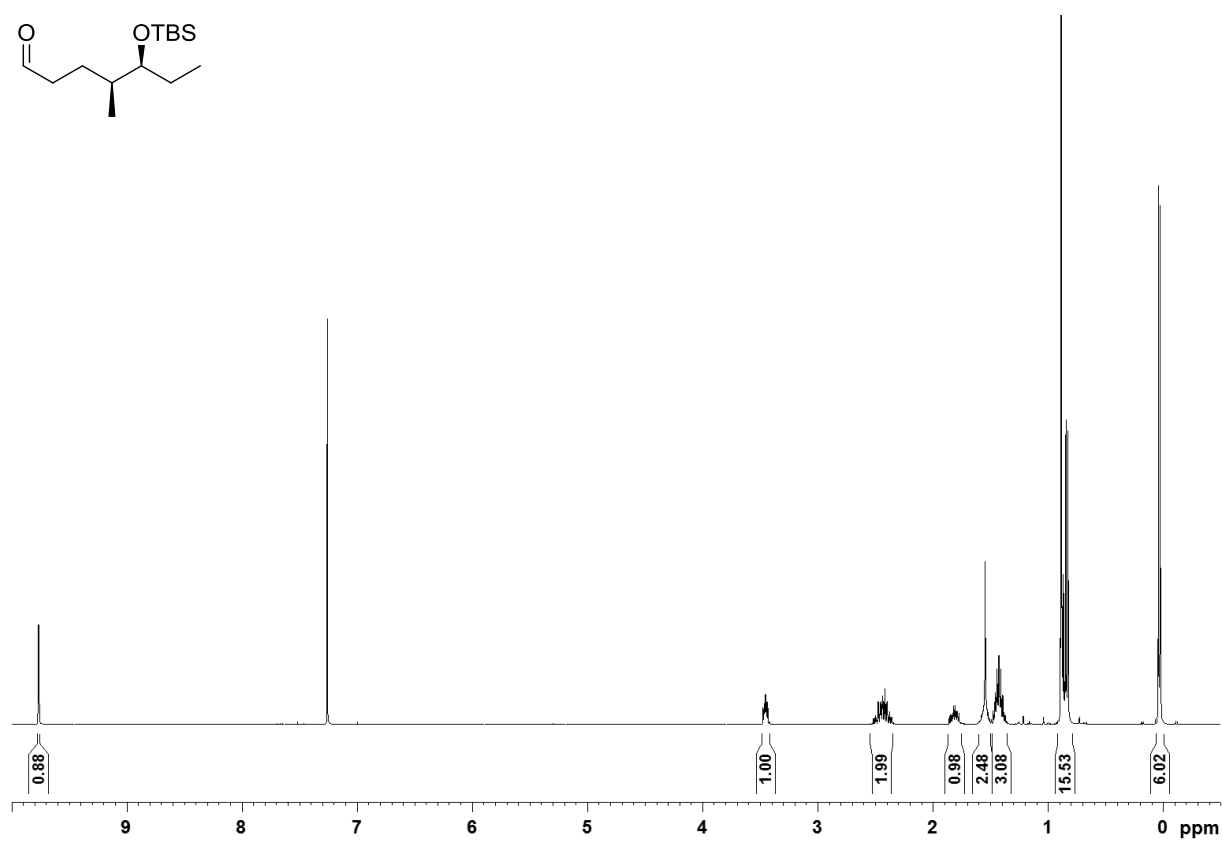
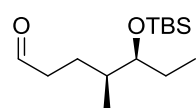


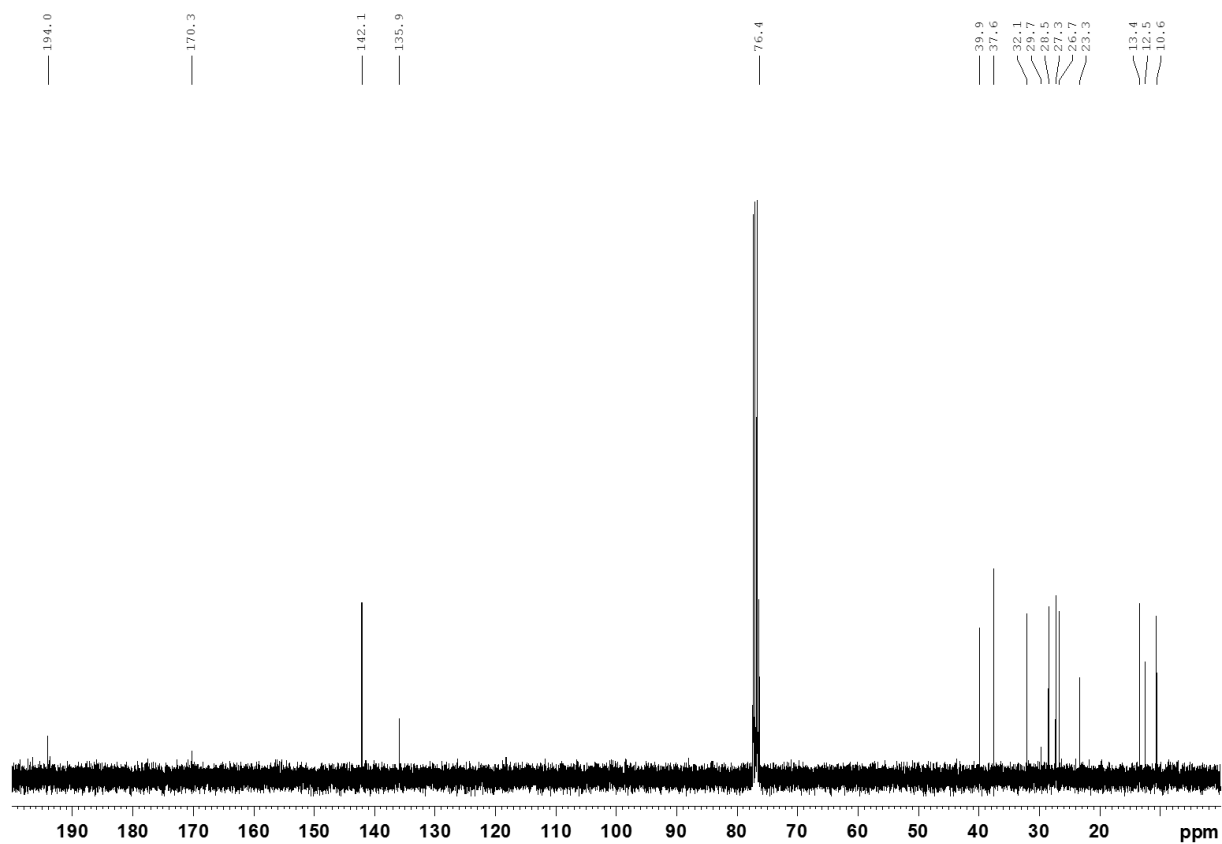
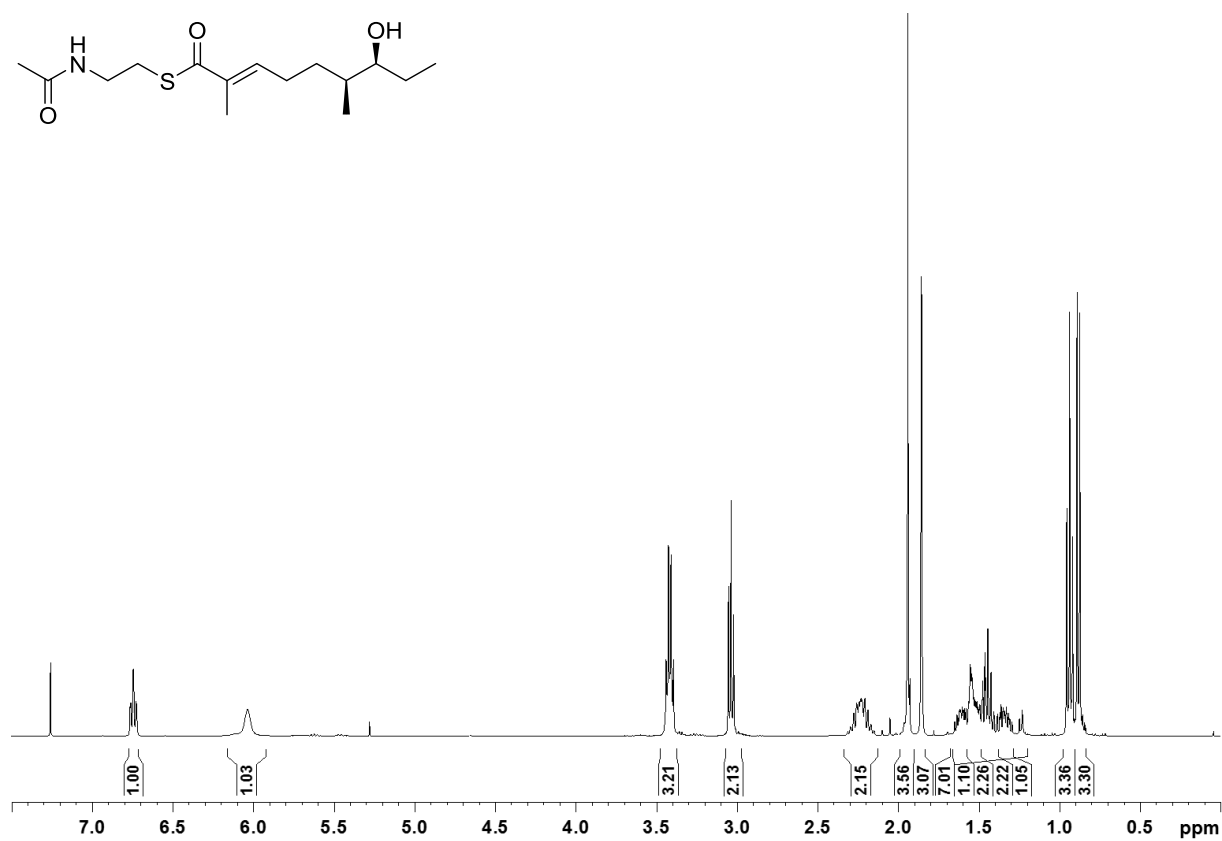
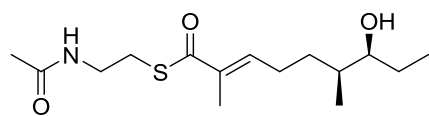


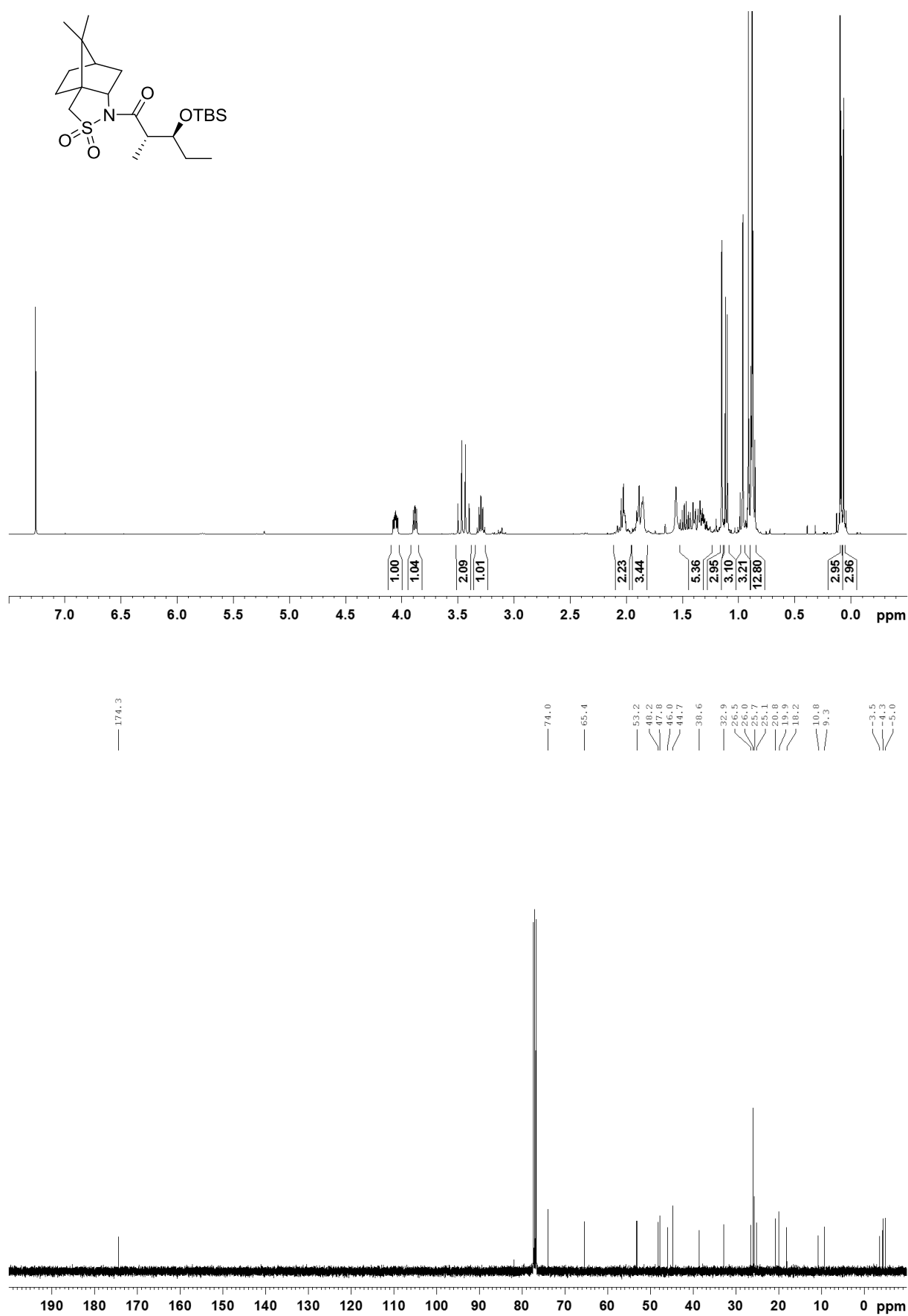


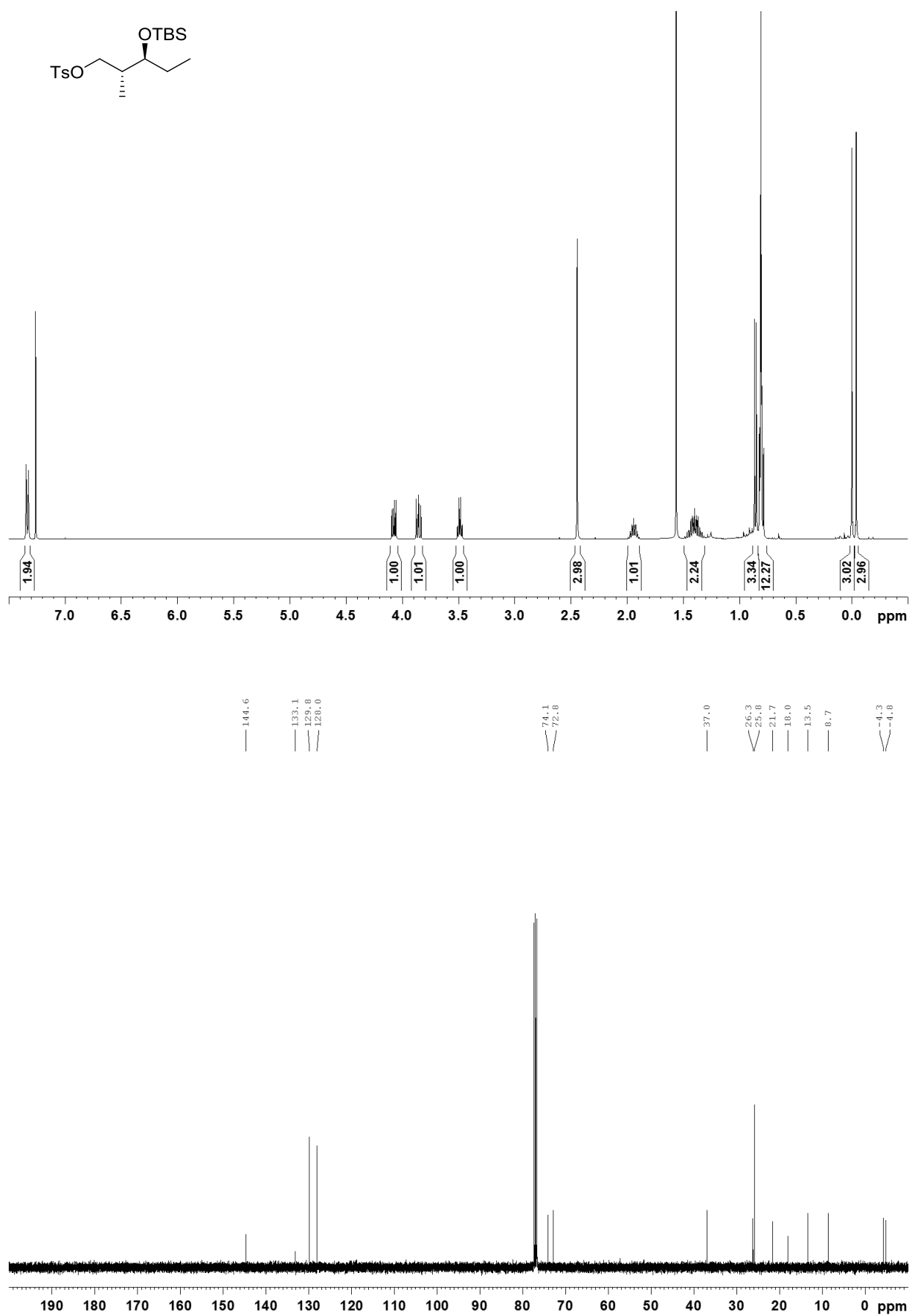


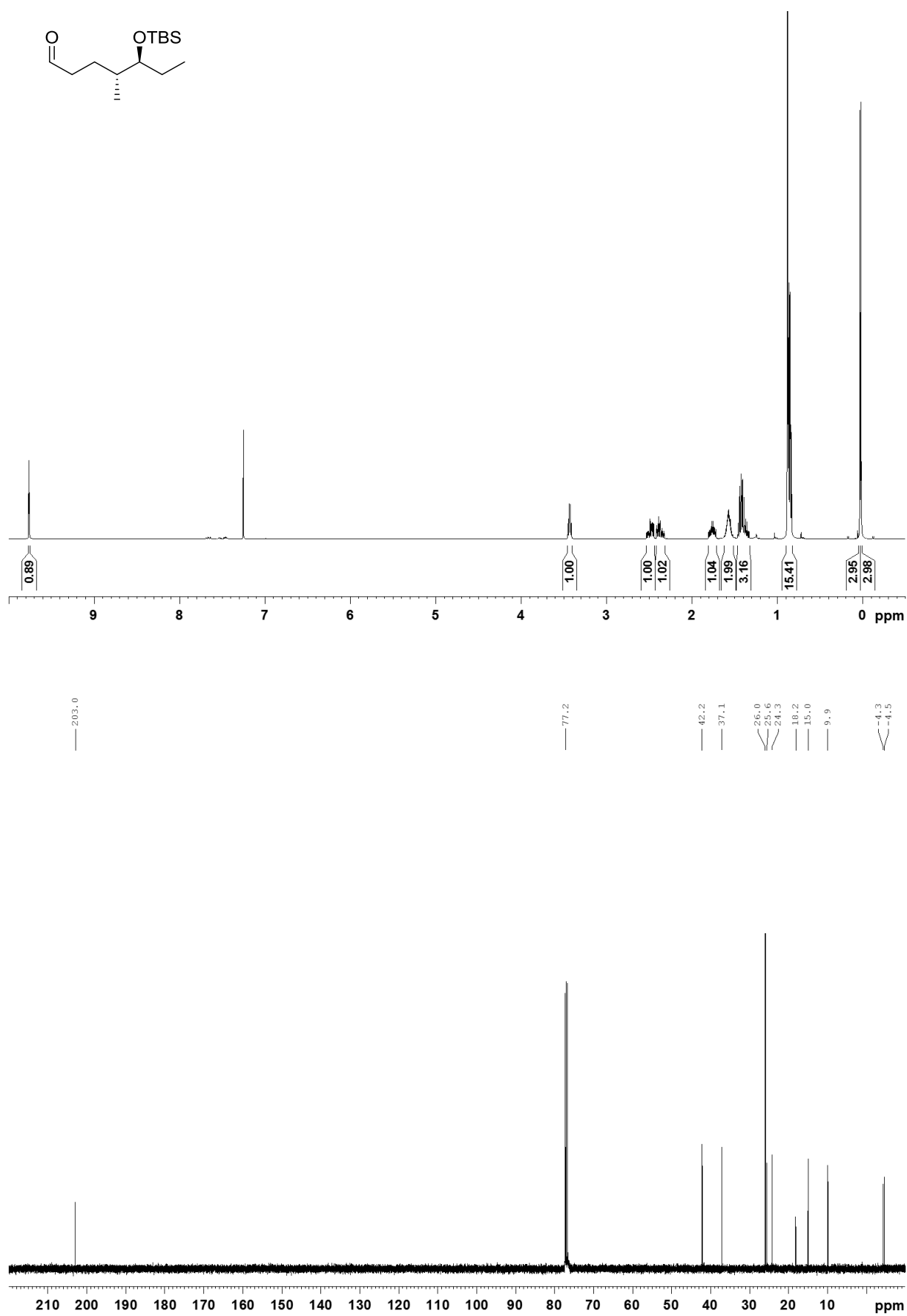


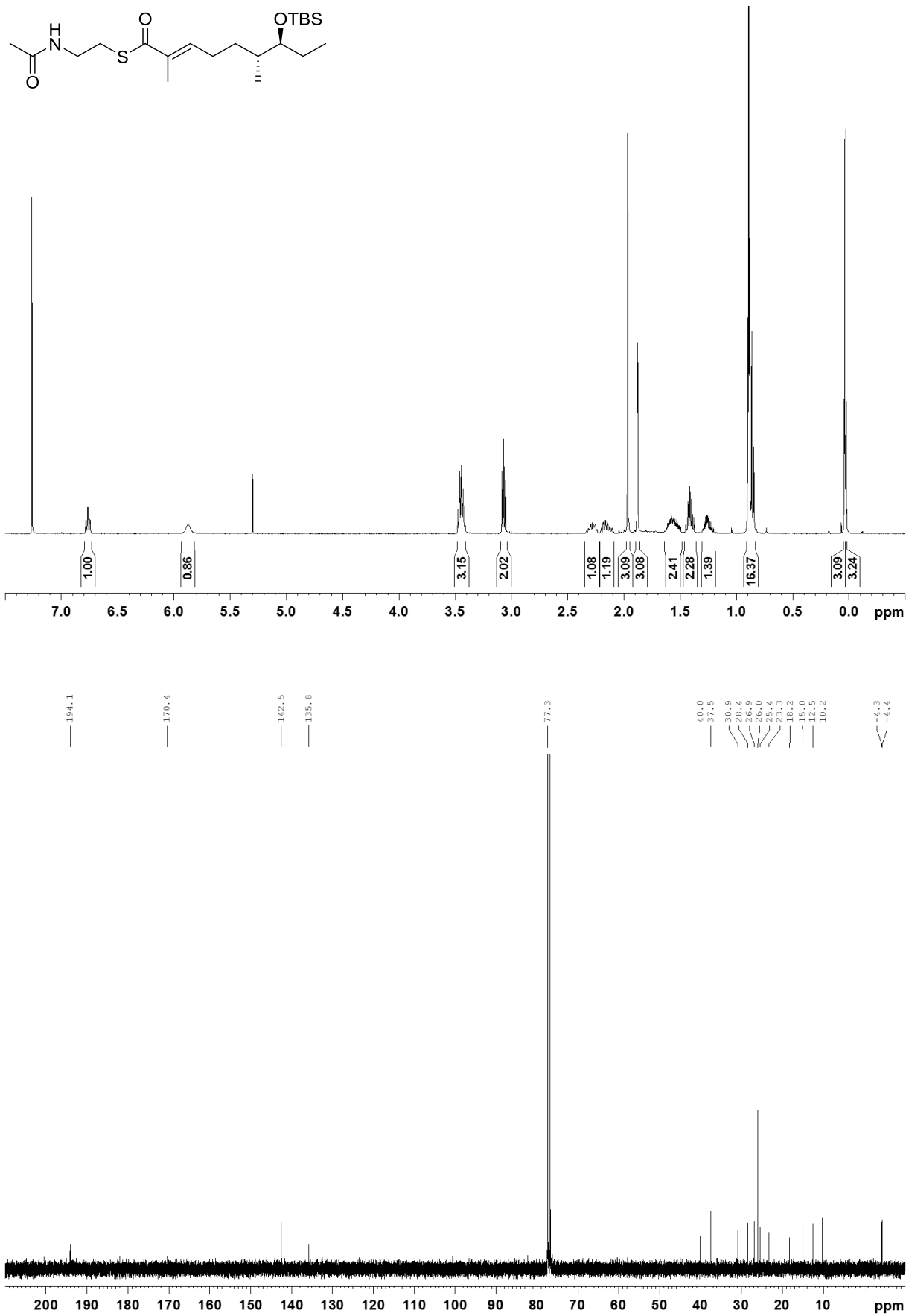


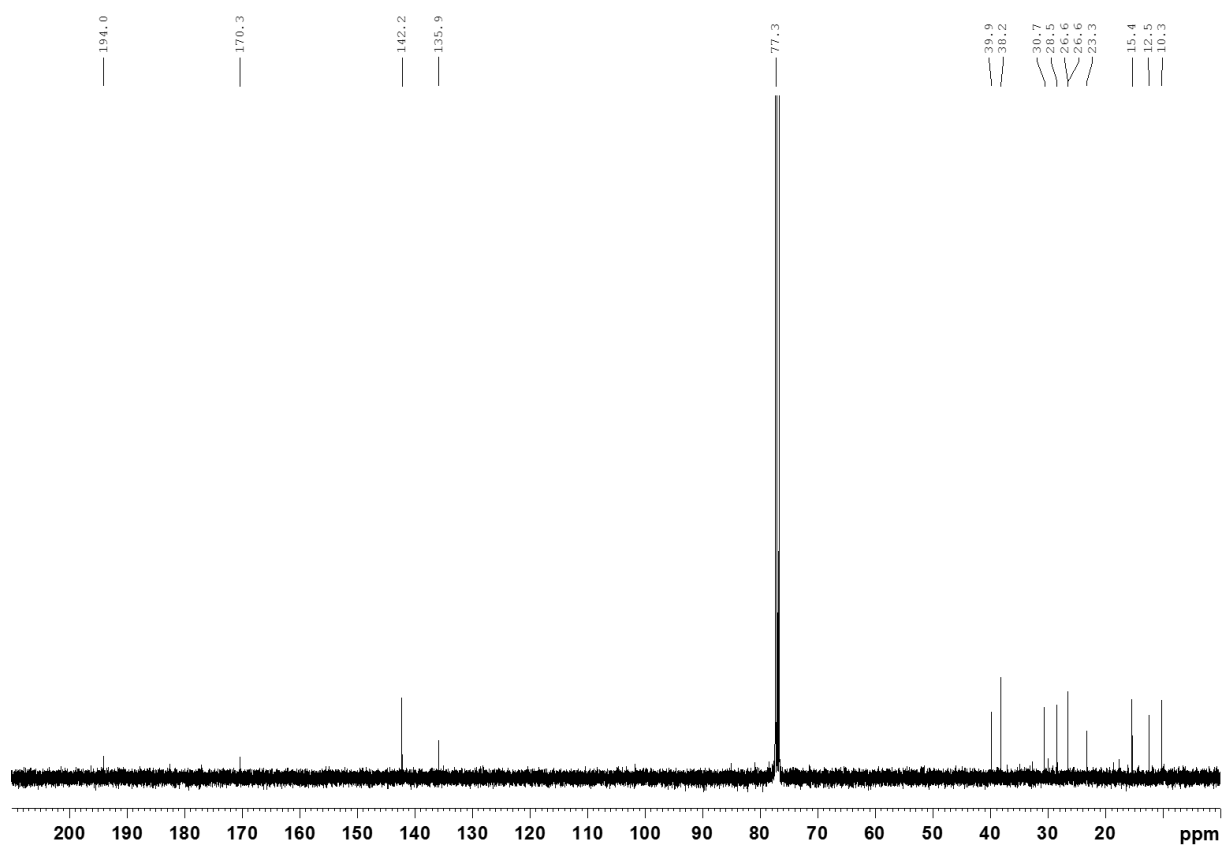
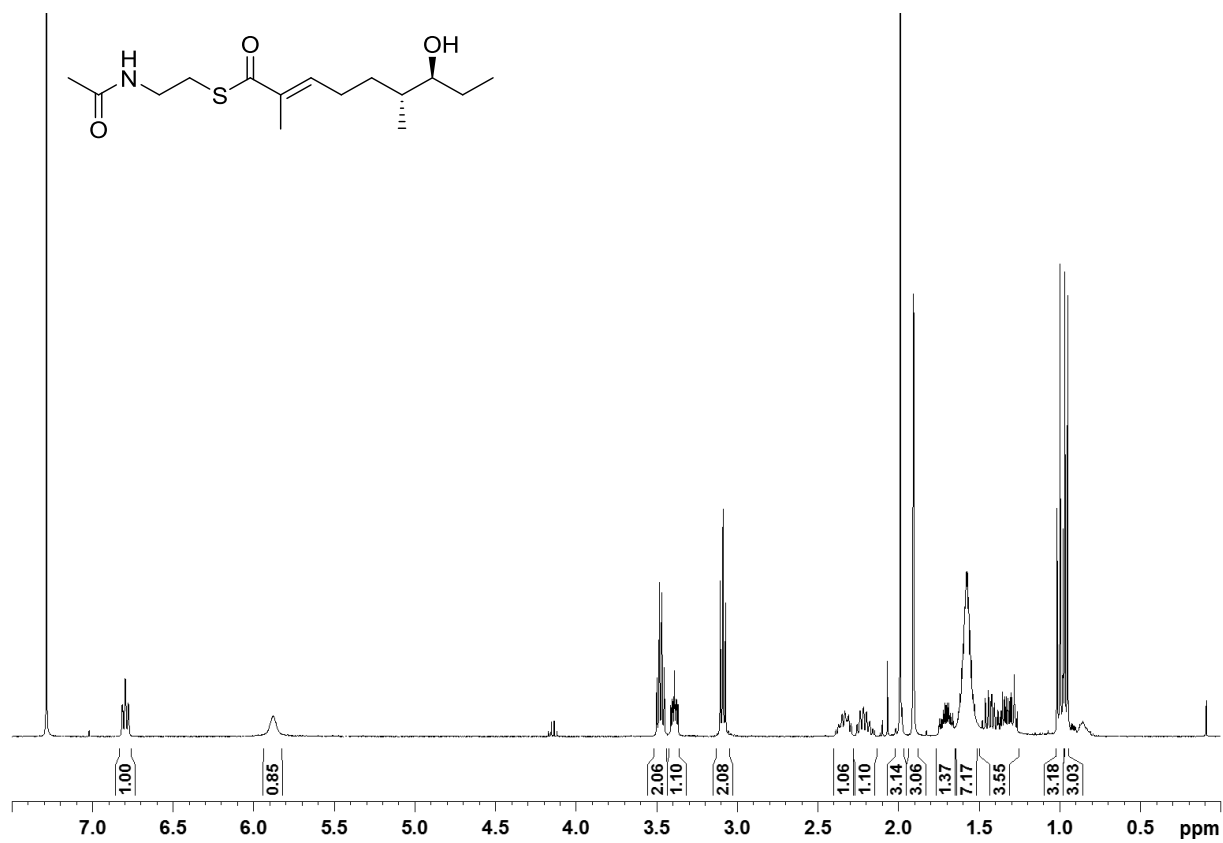


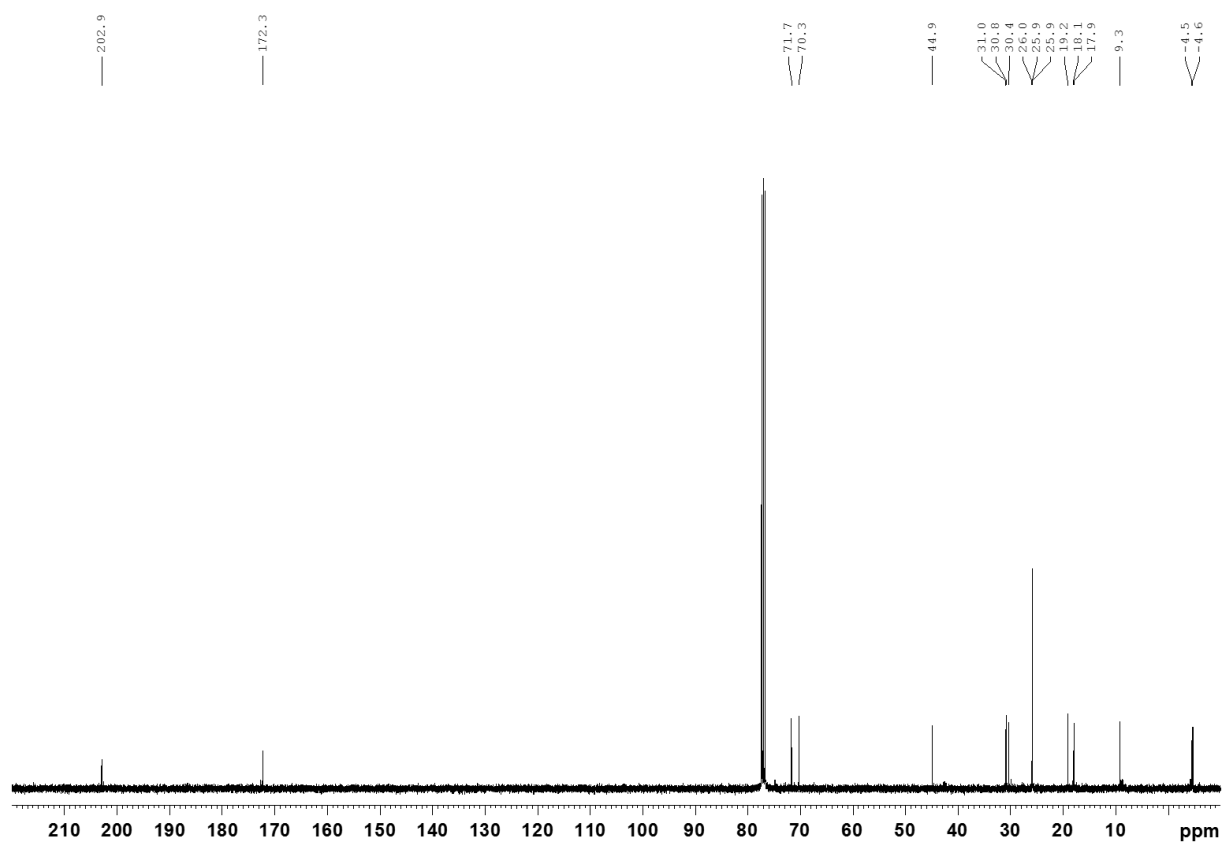
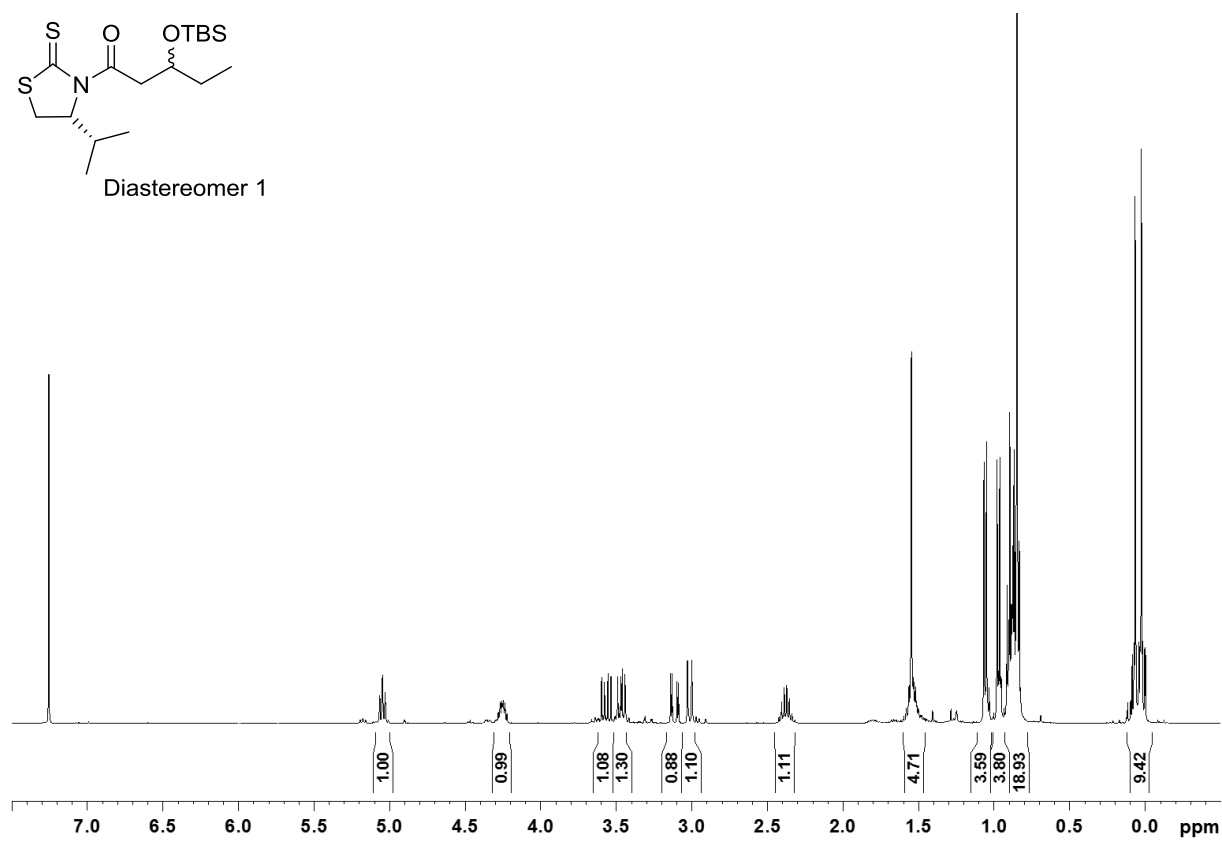
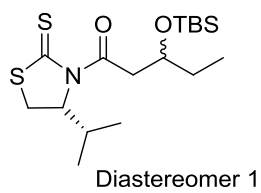


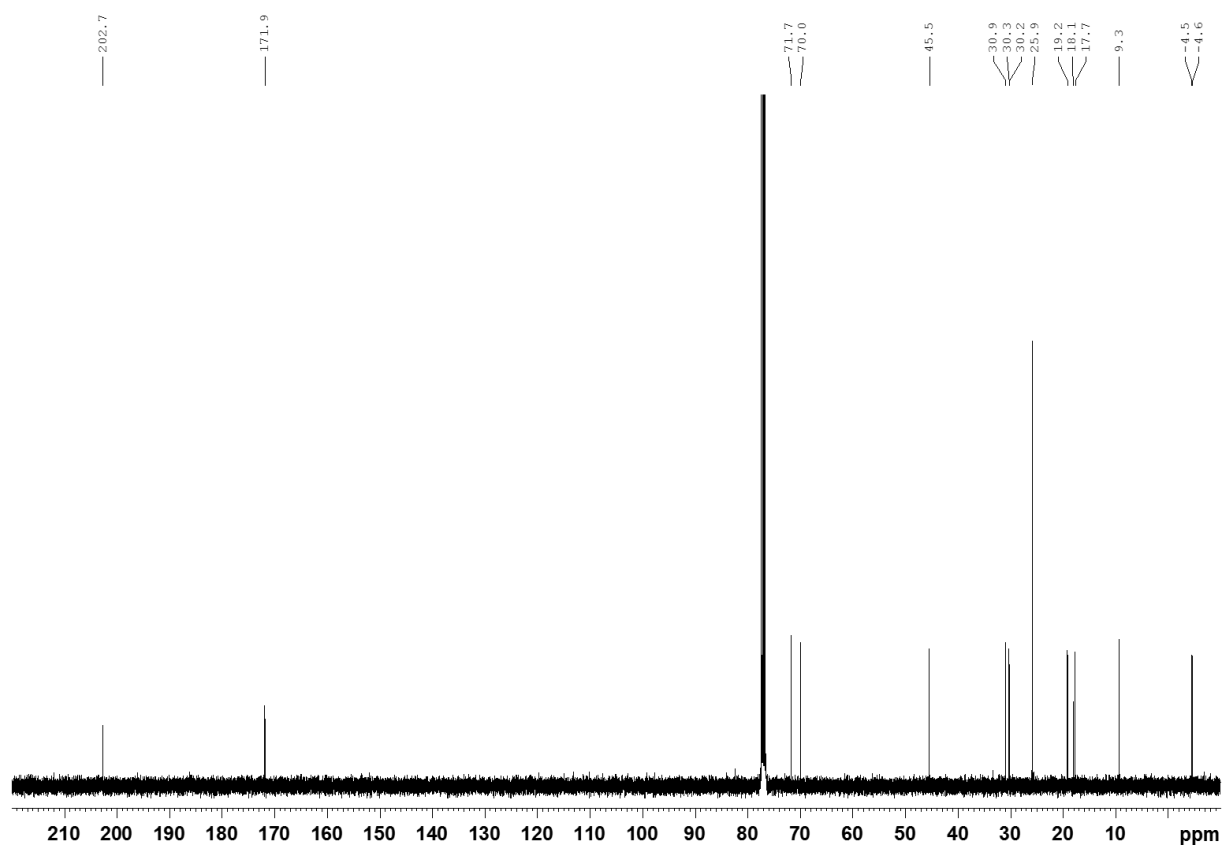
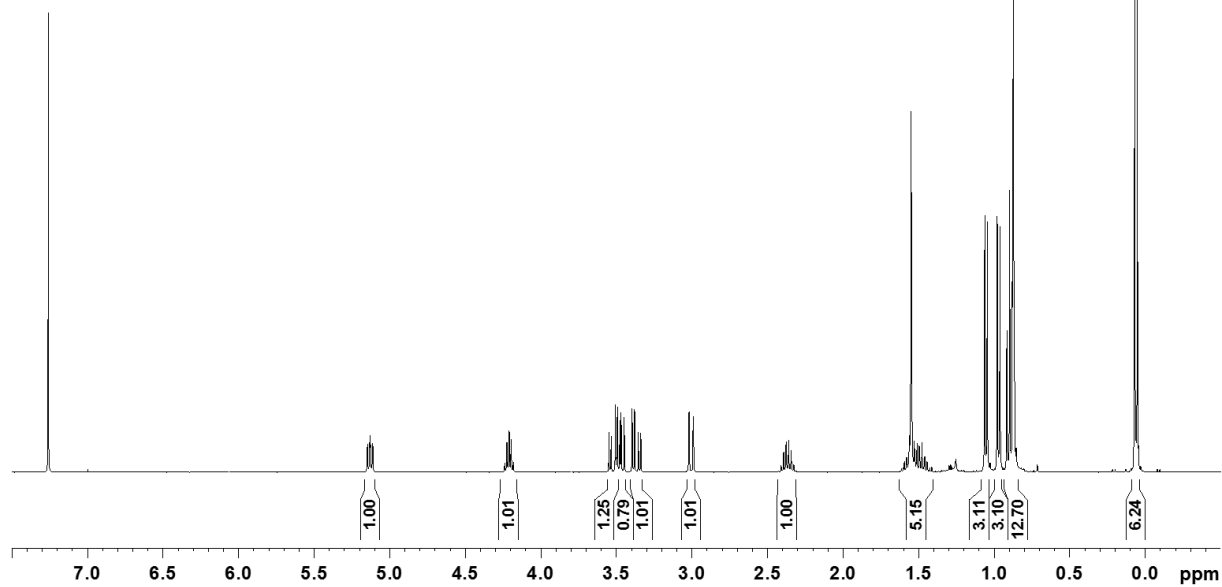
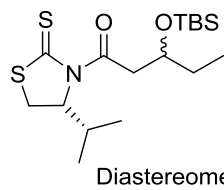


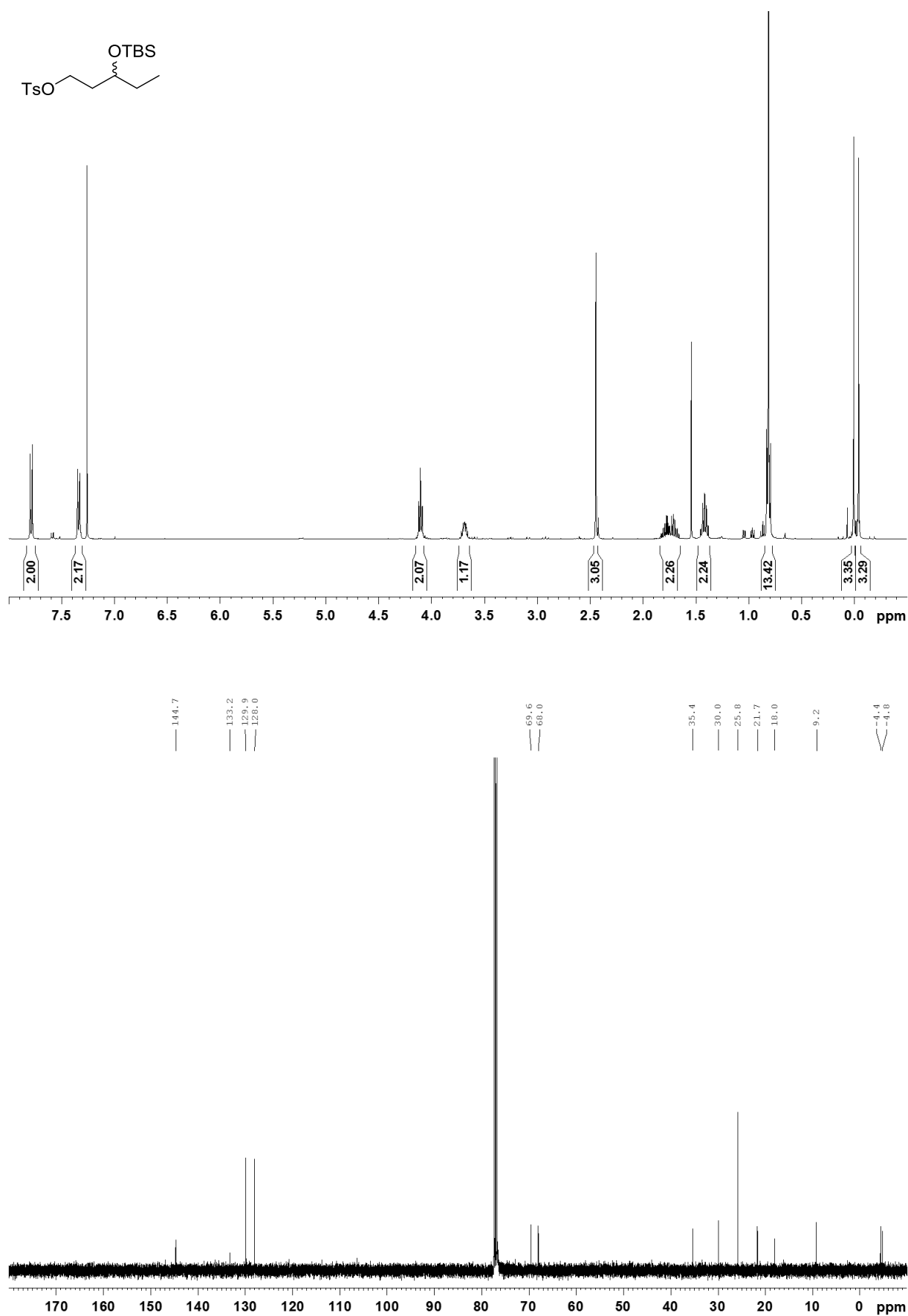


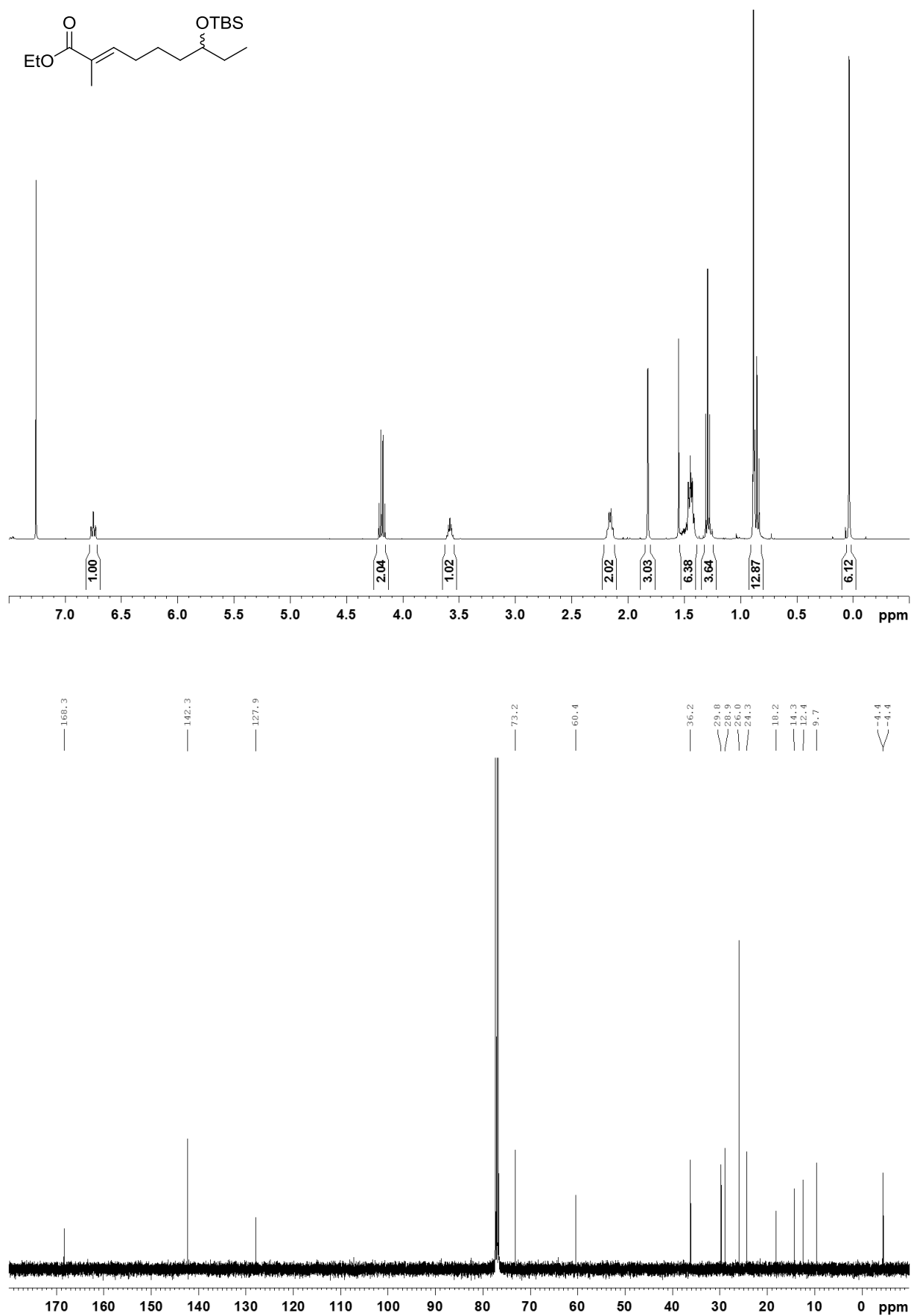


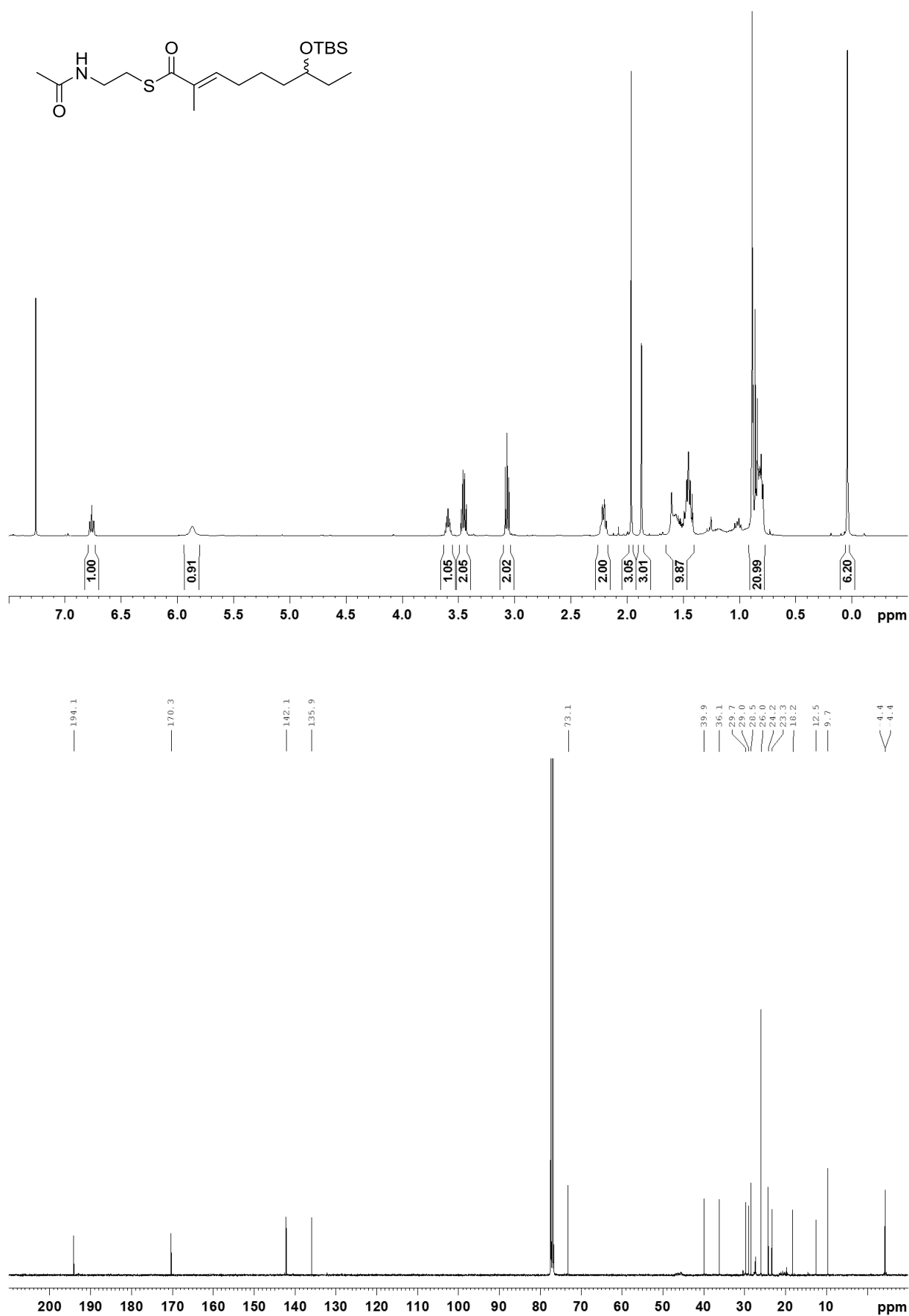


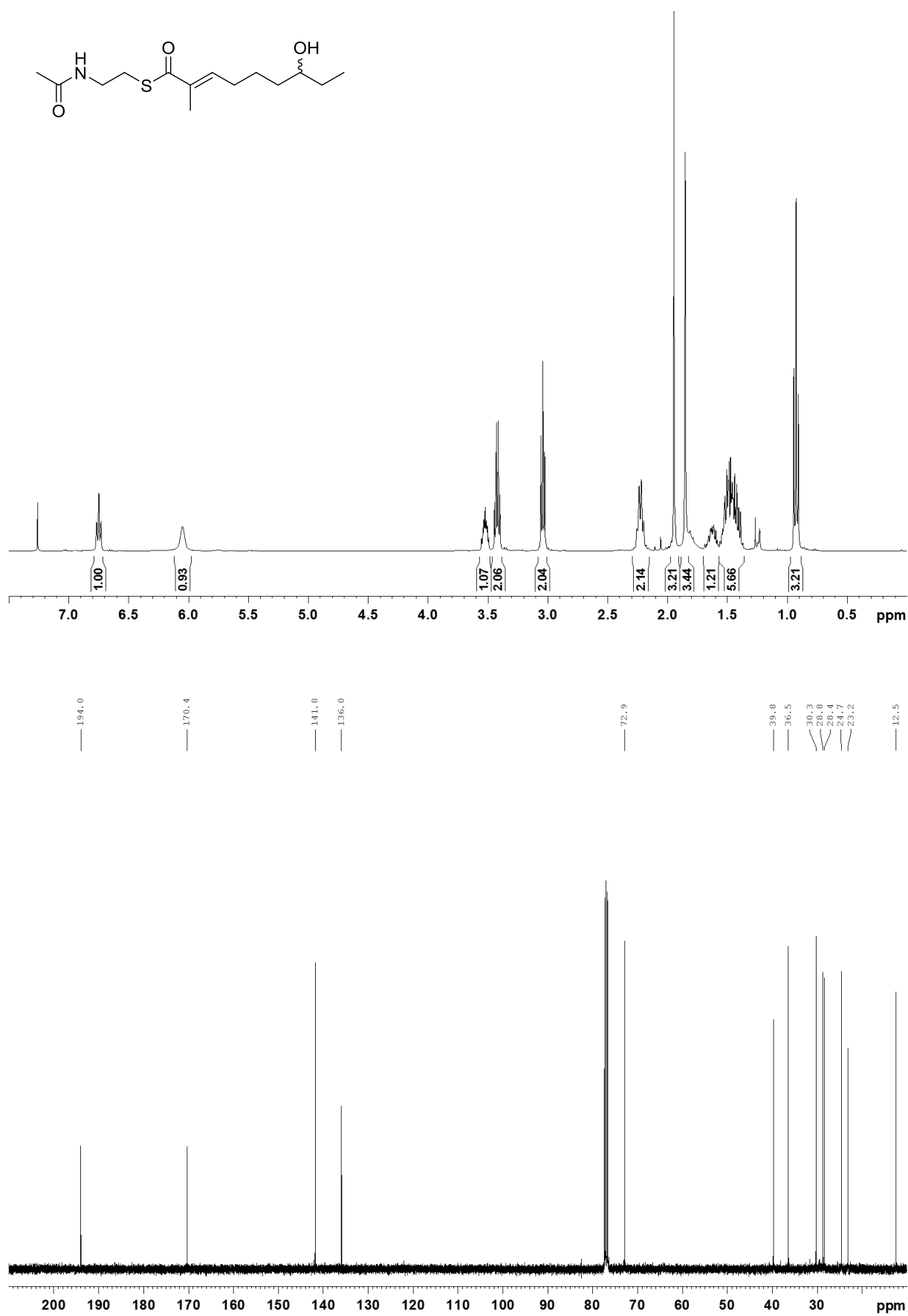


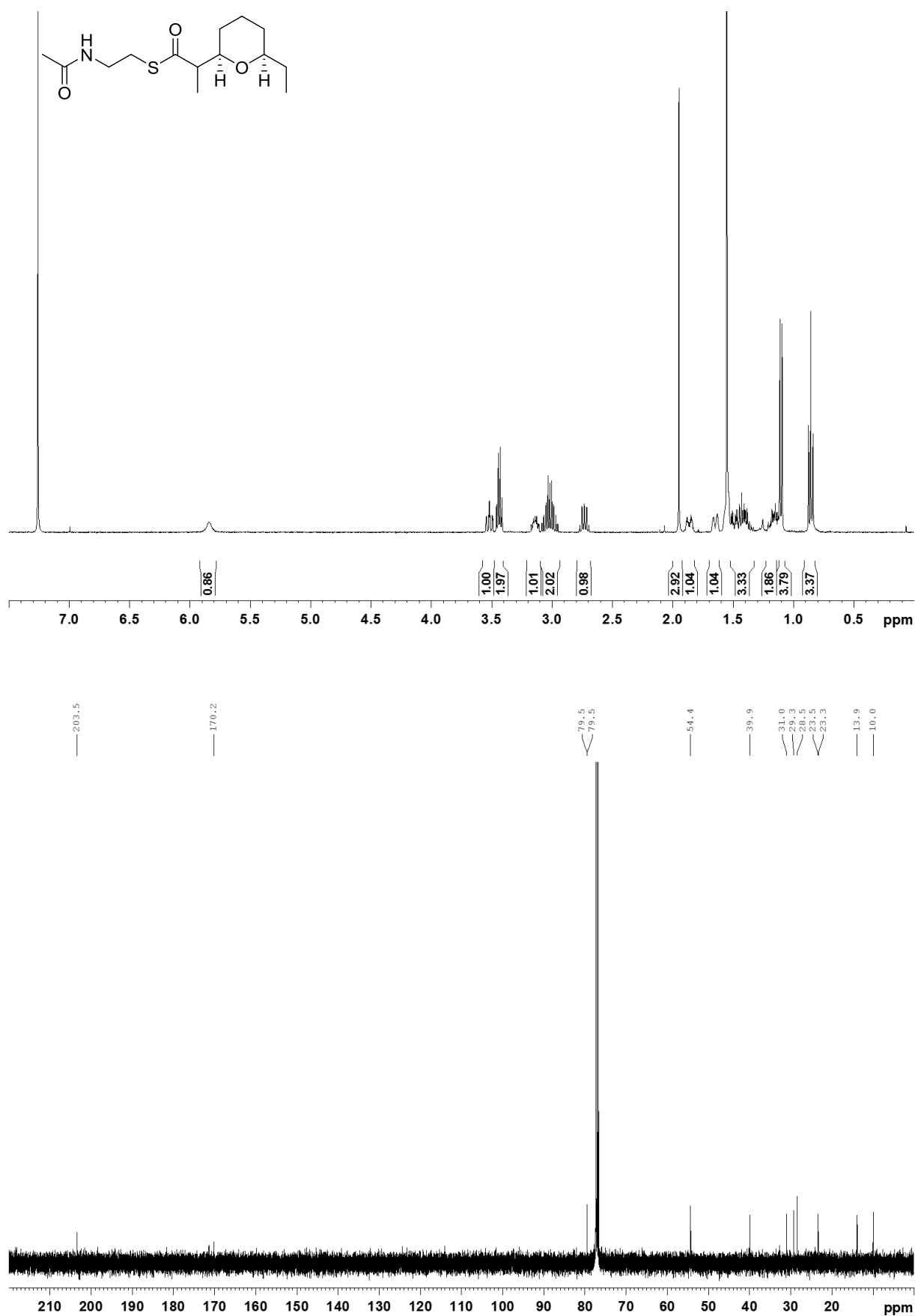


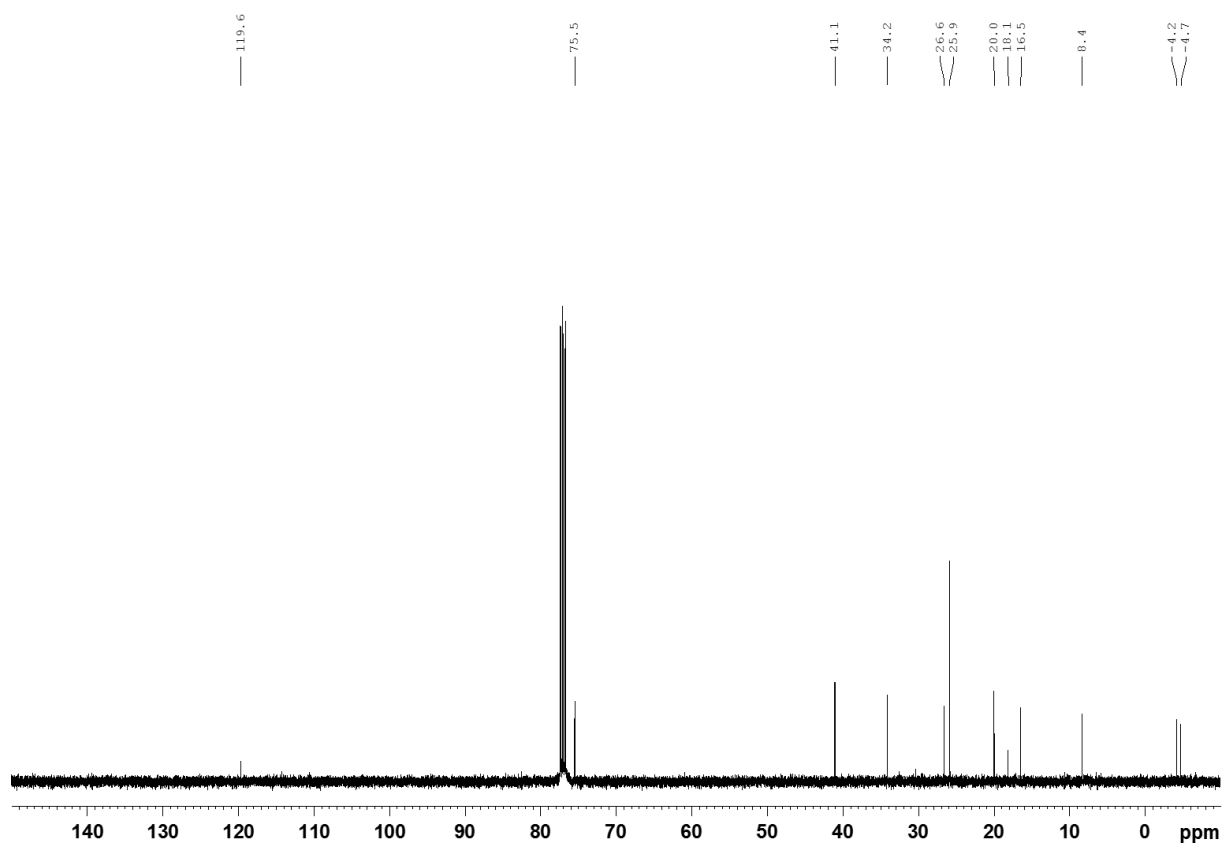
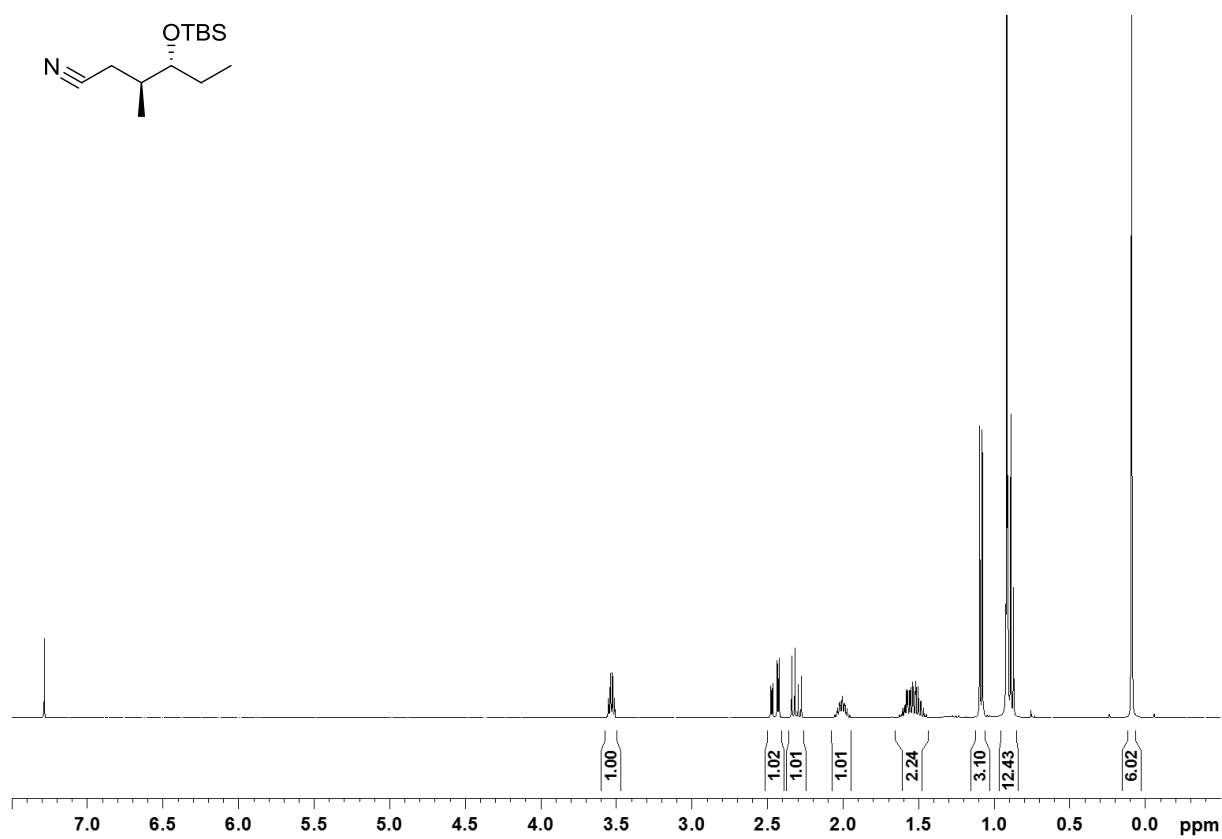
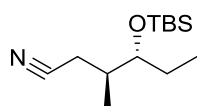


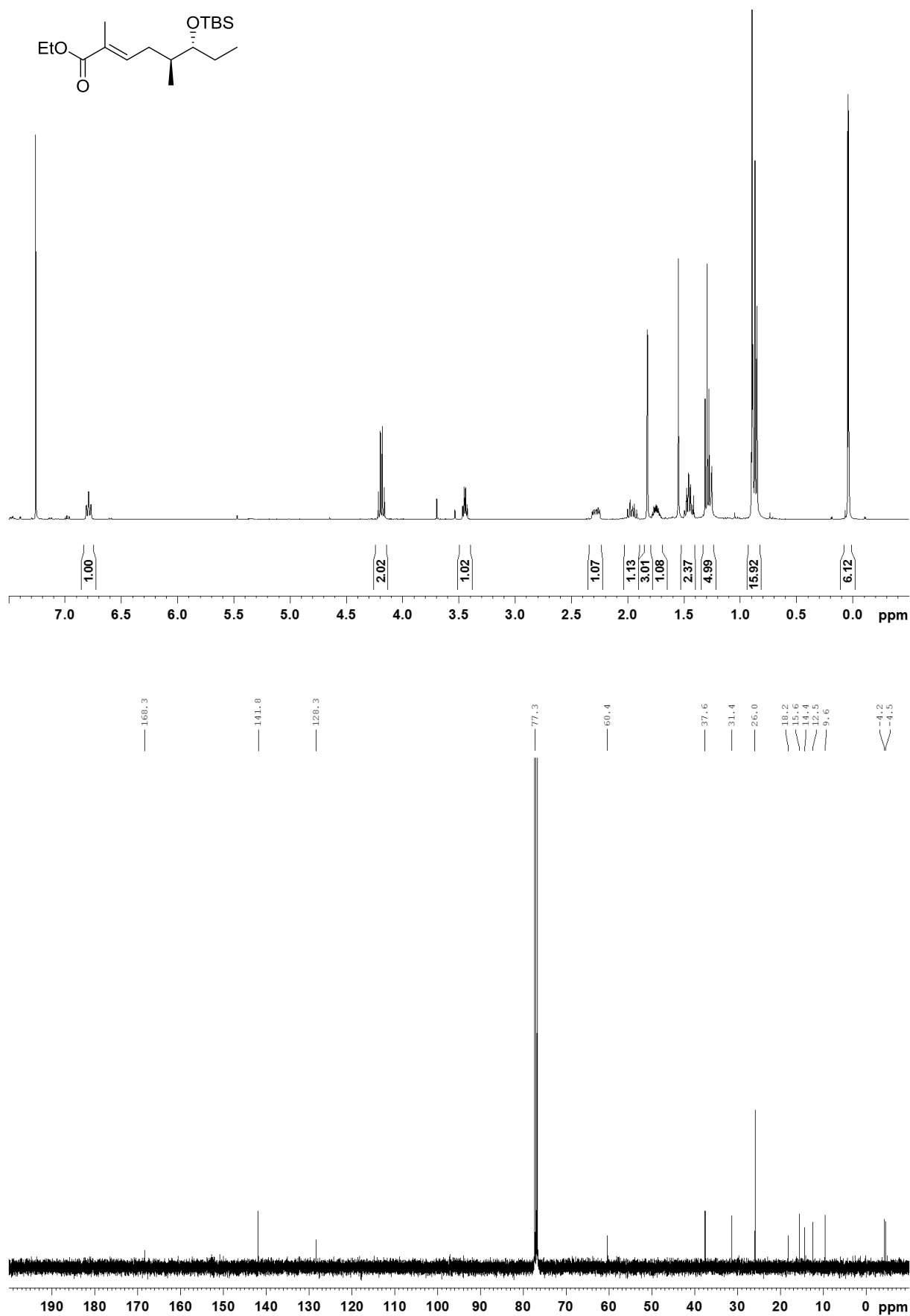


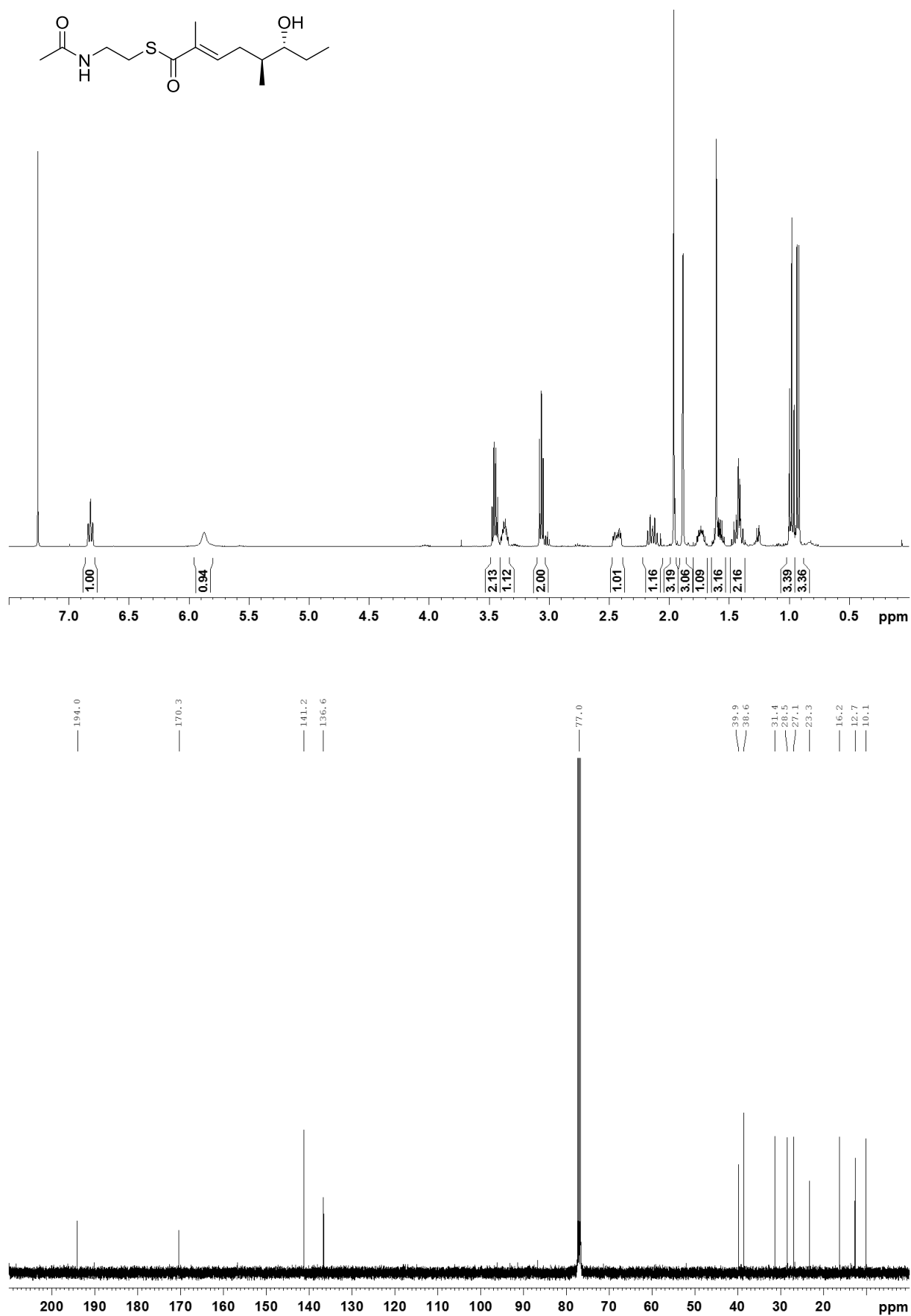


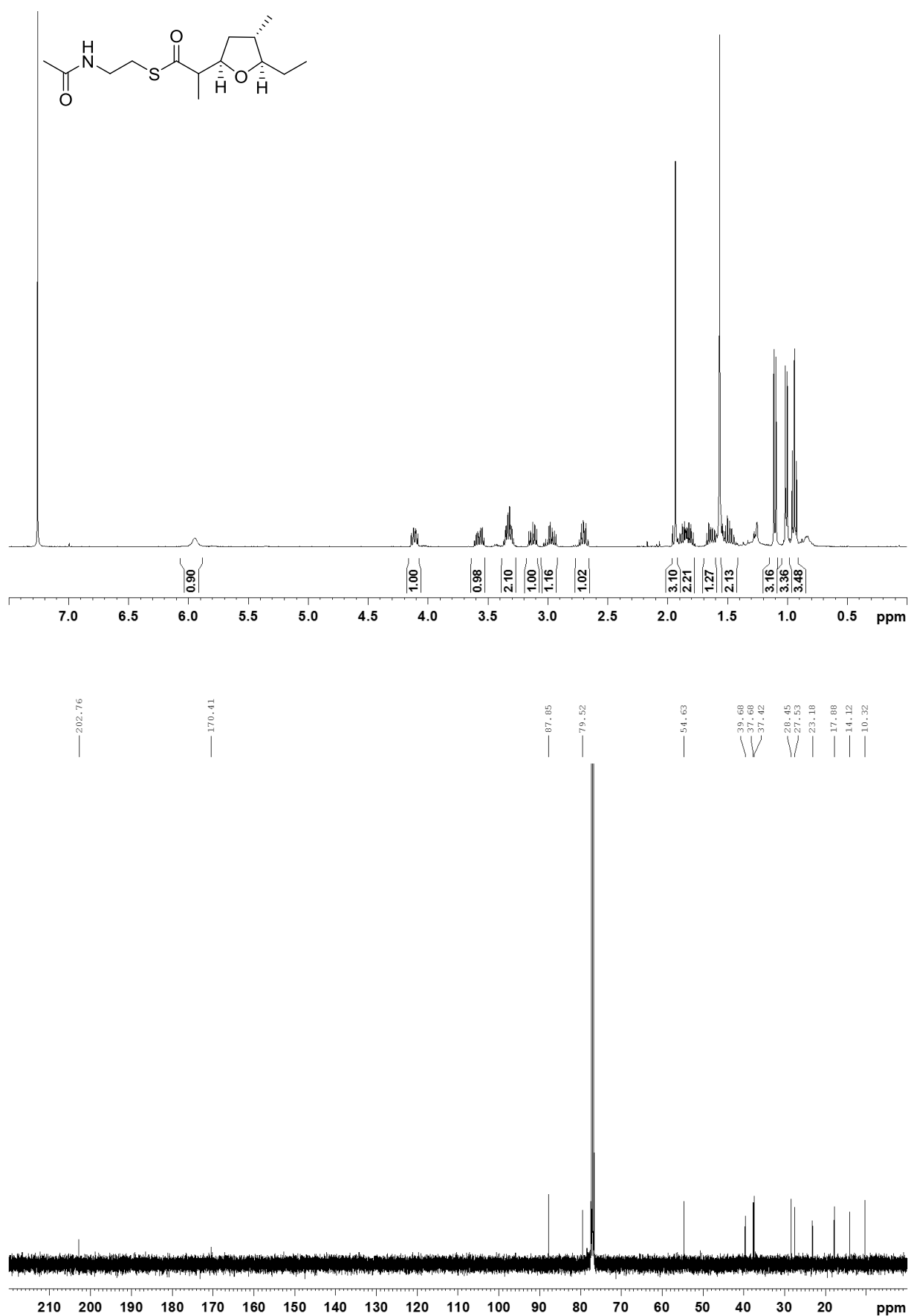


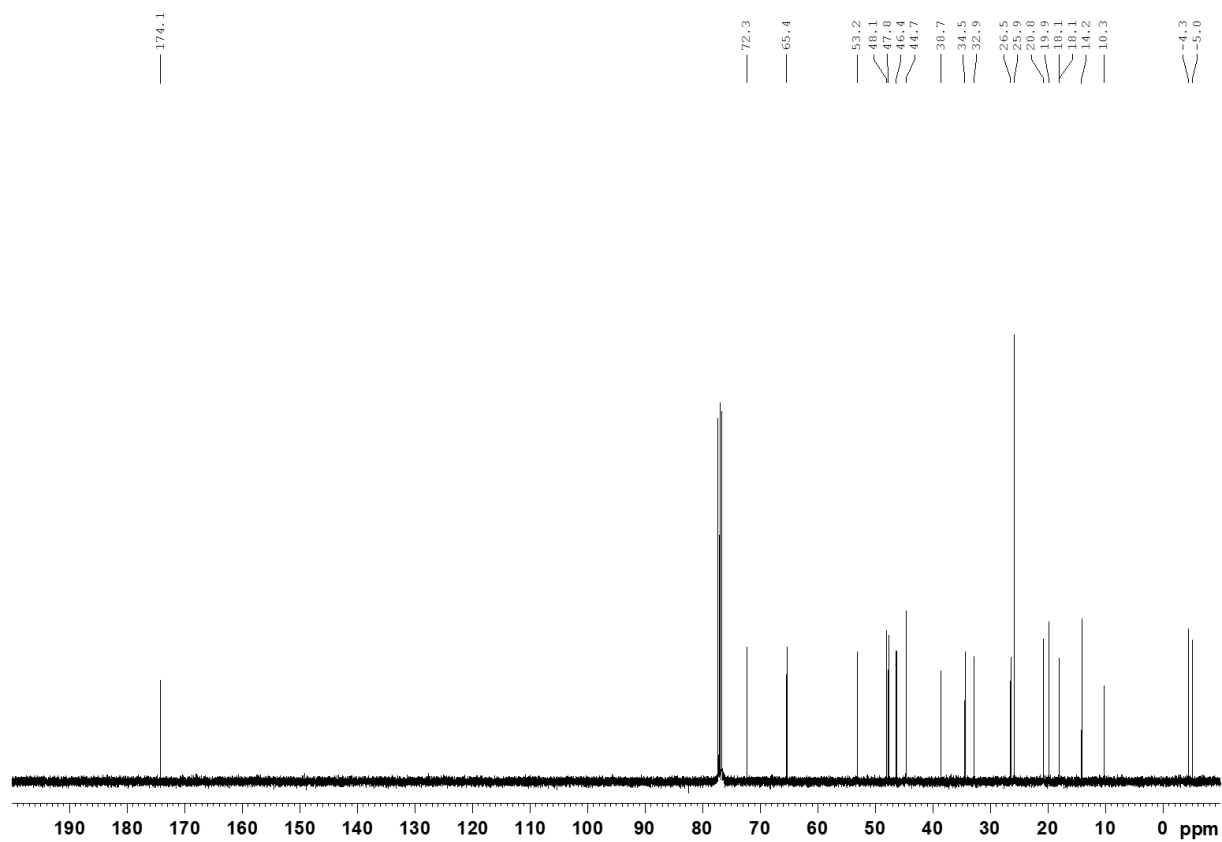
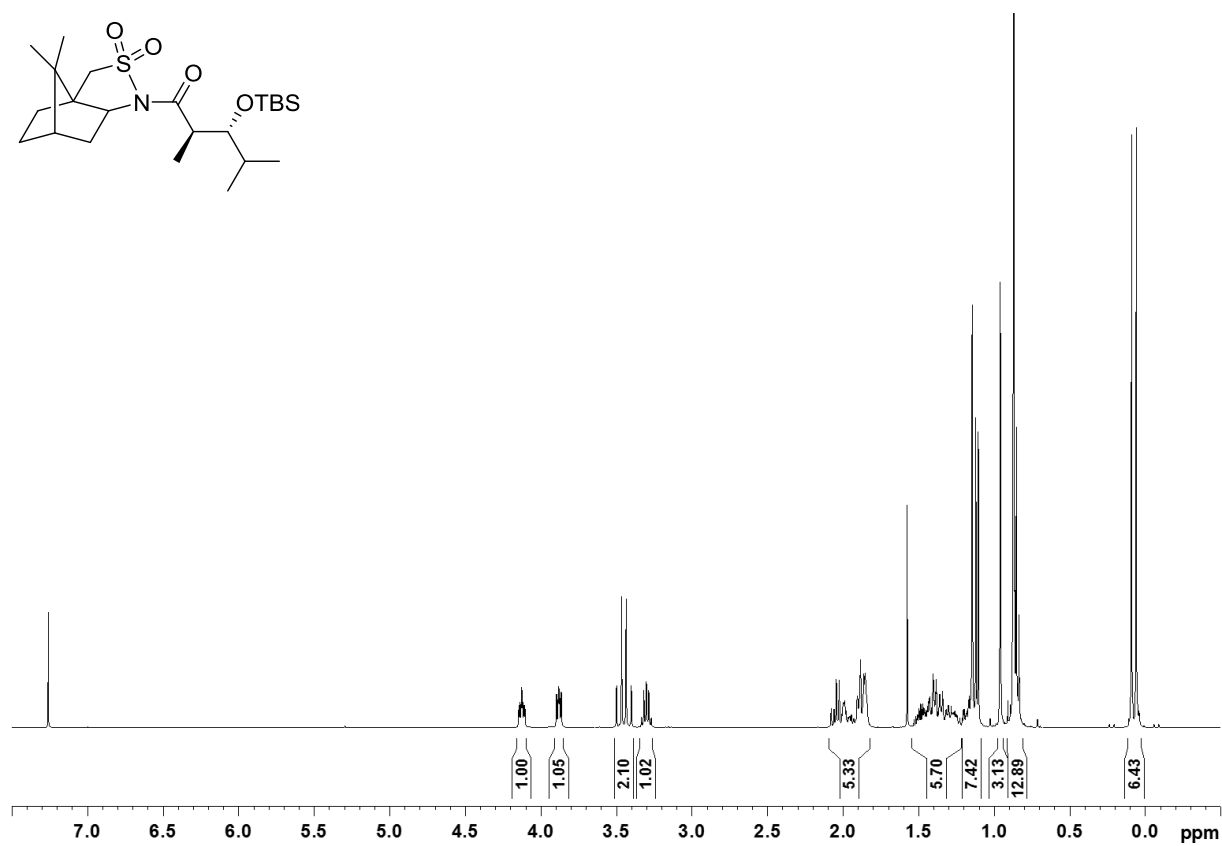
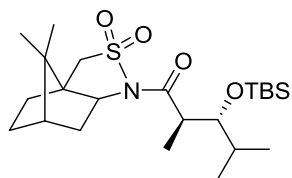


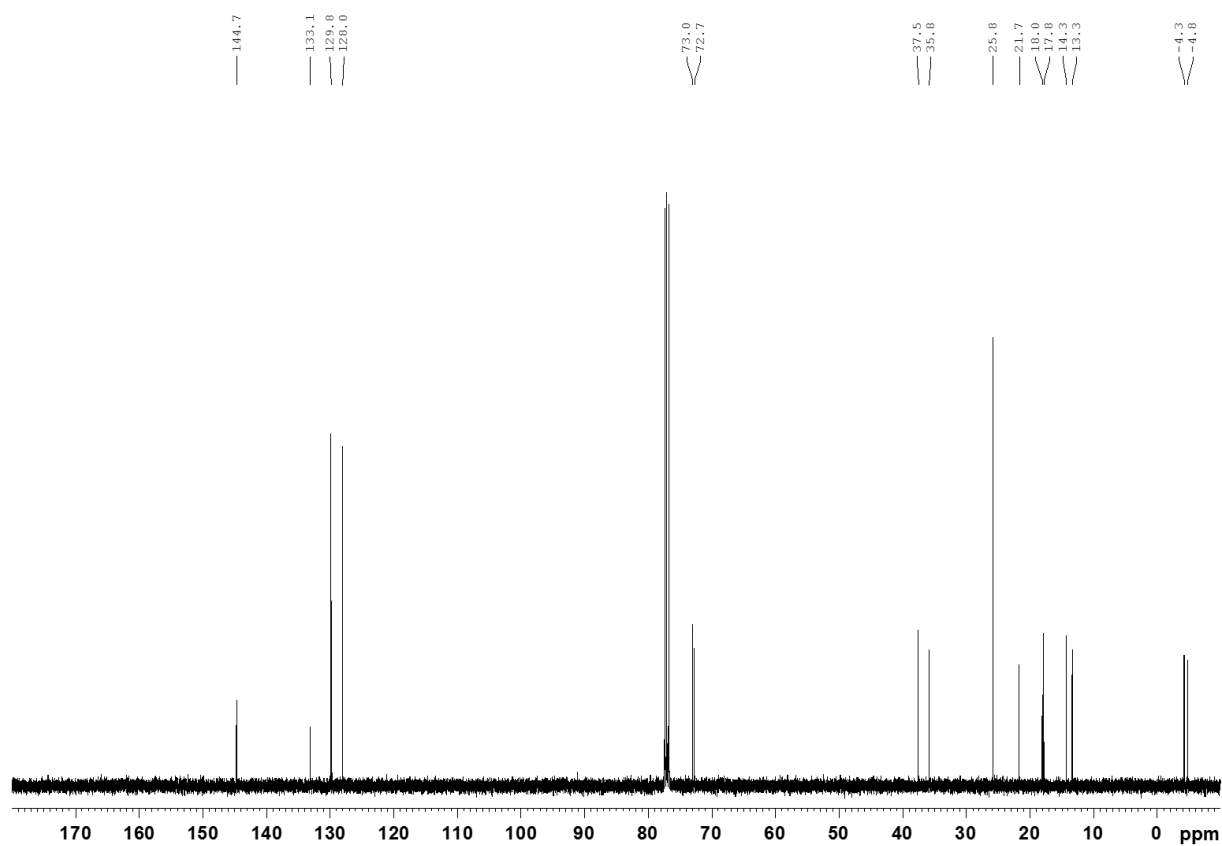
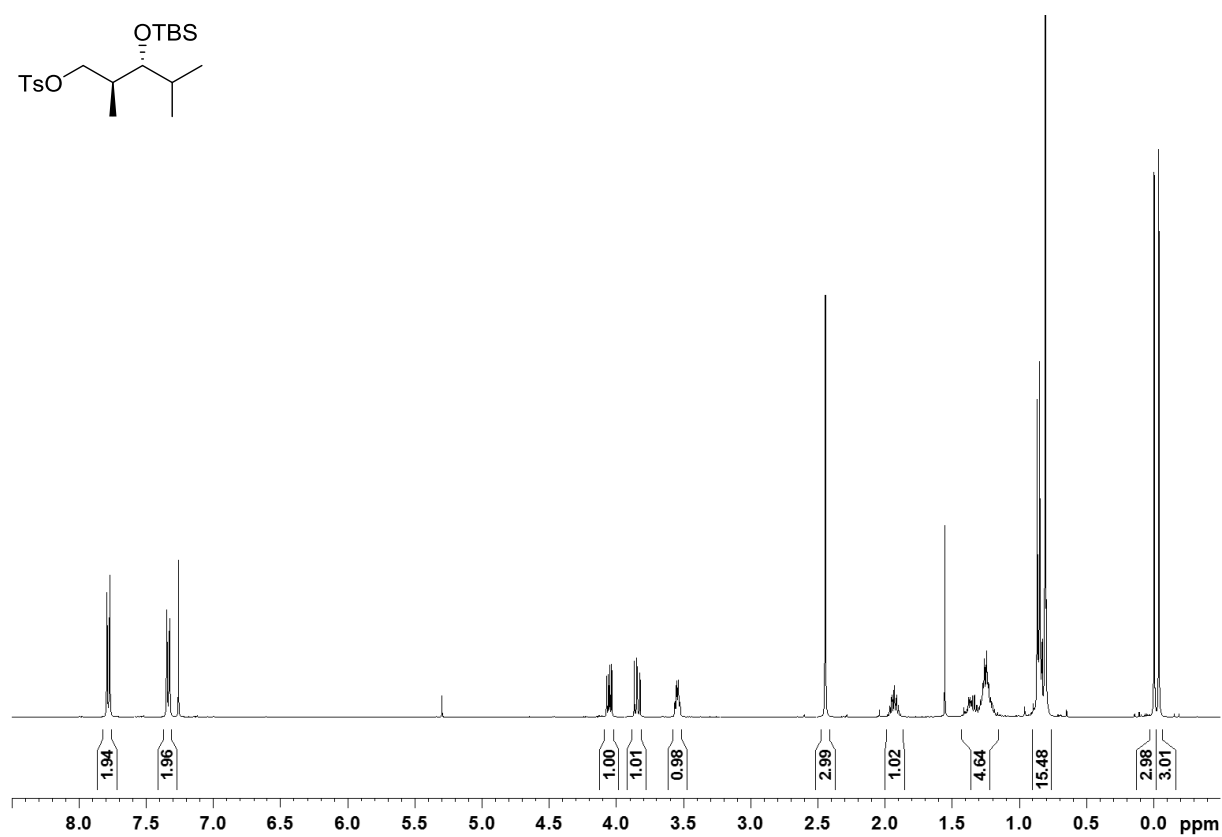
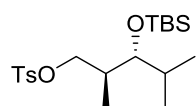


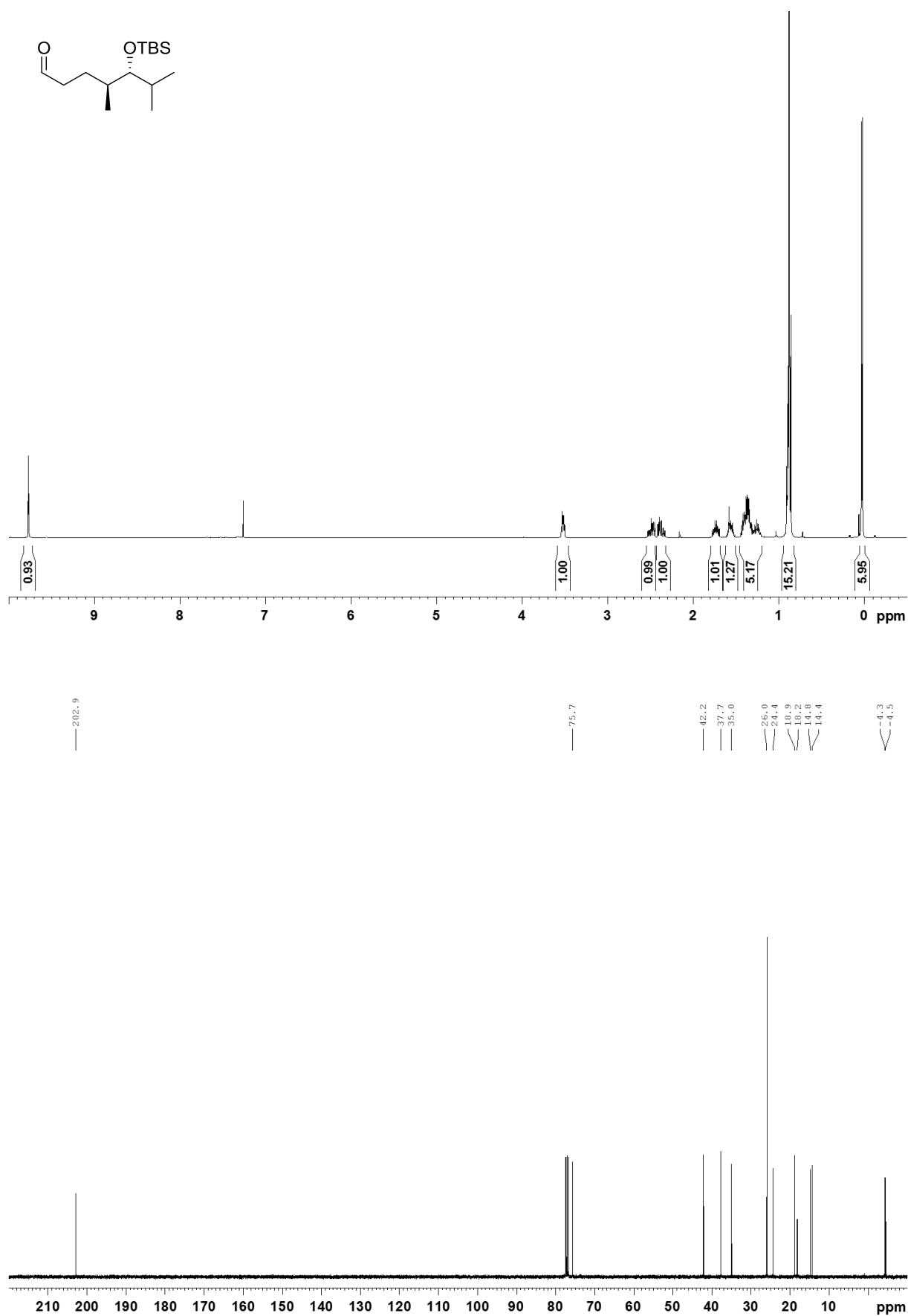


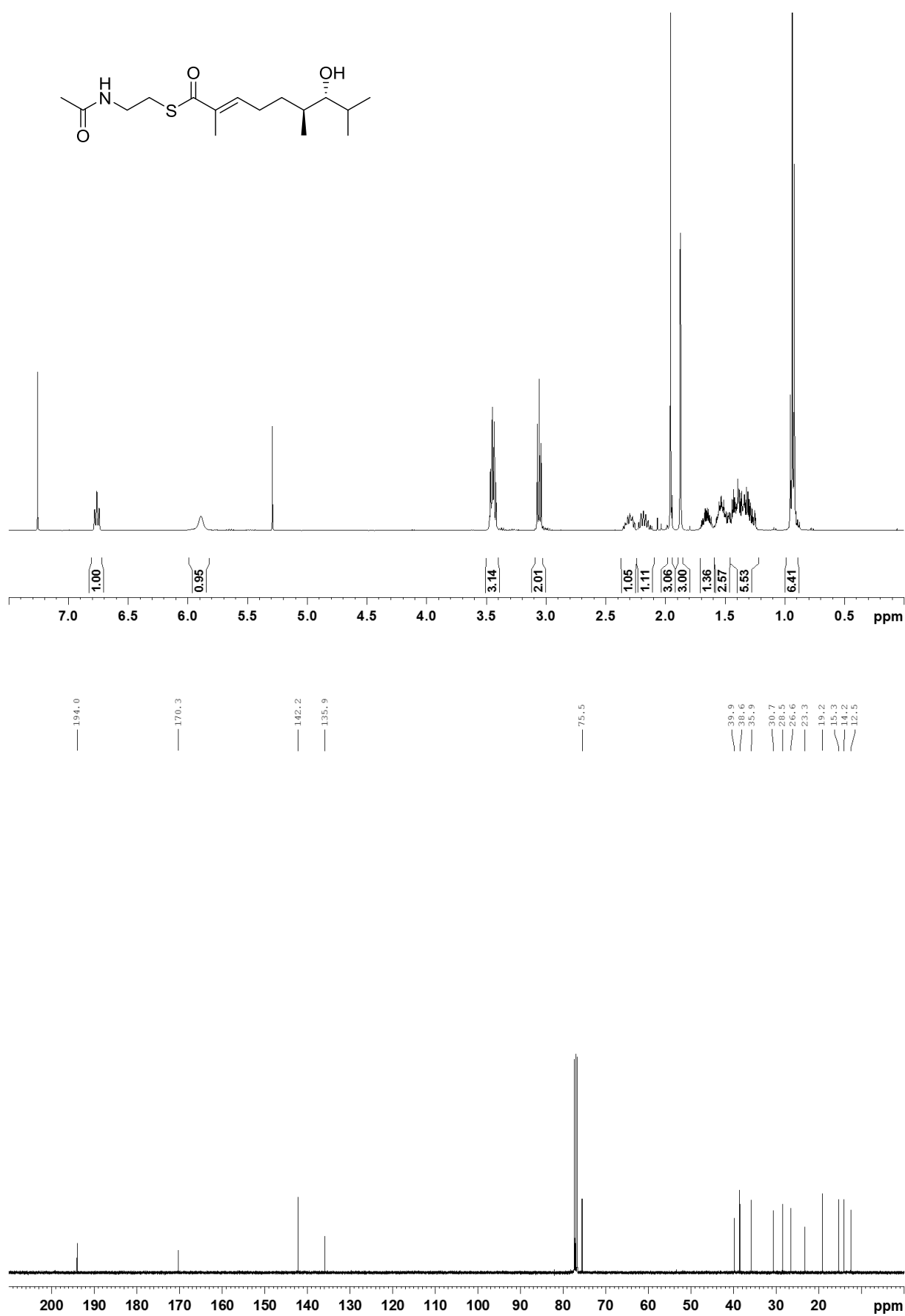


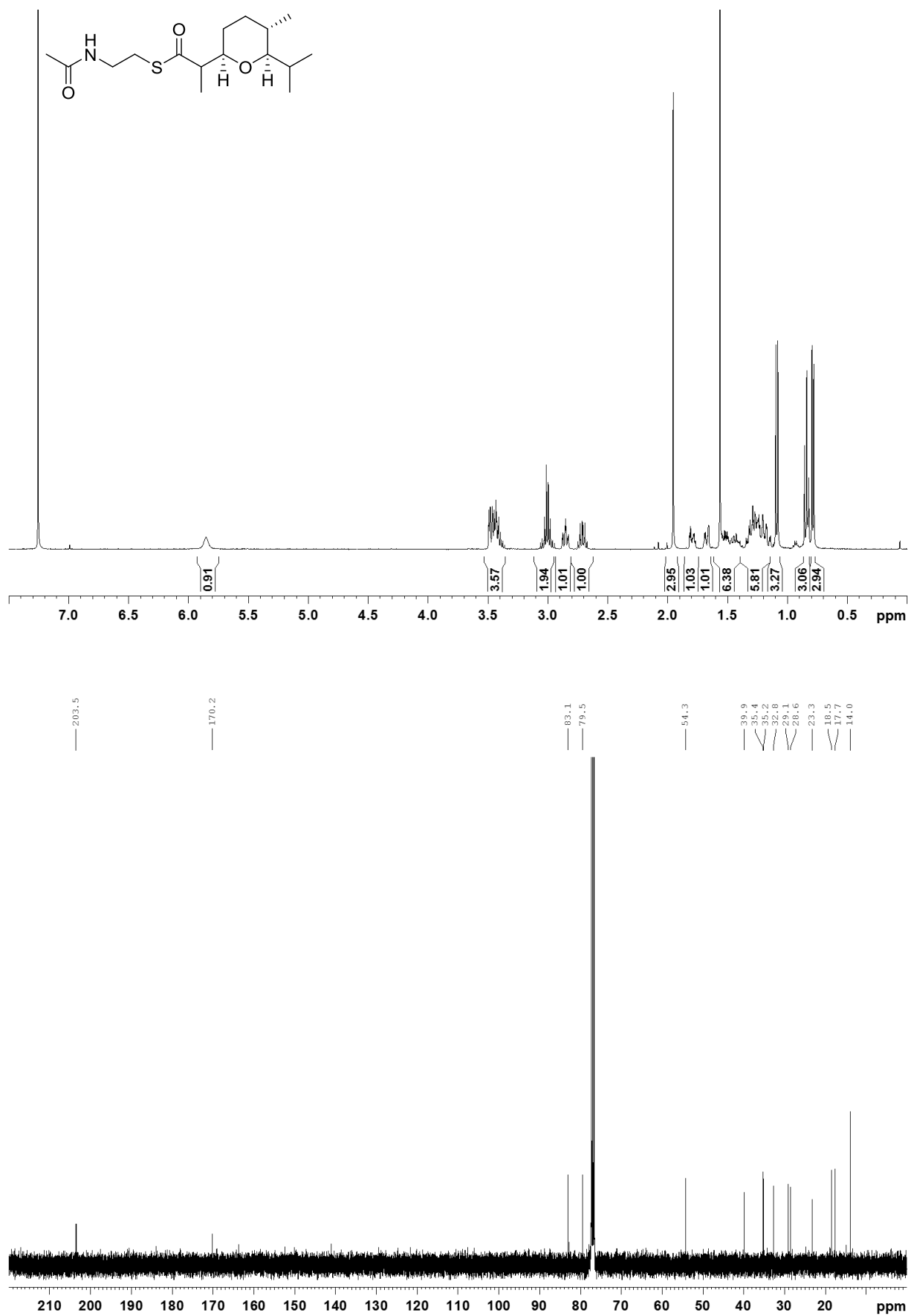












7.2 Studien zur biosynthetischen Rolle der Dehydratase-Domäne AmbDH3

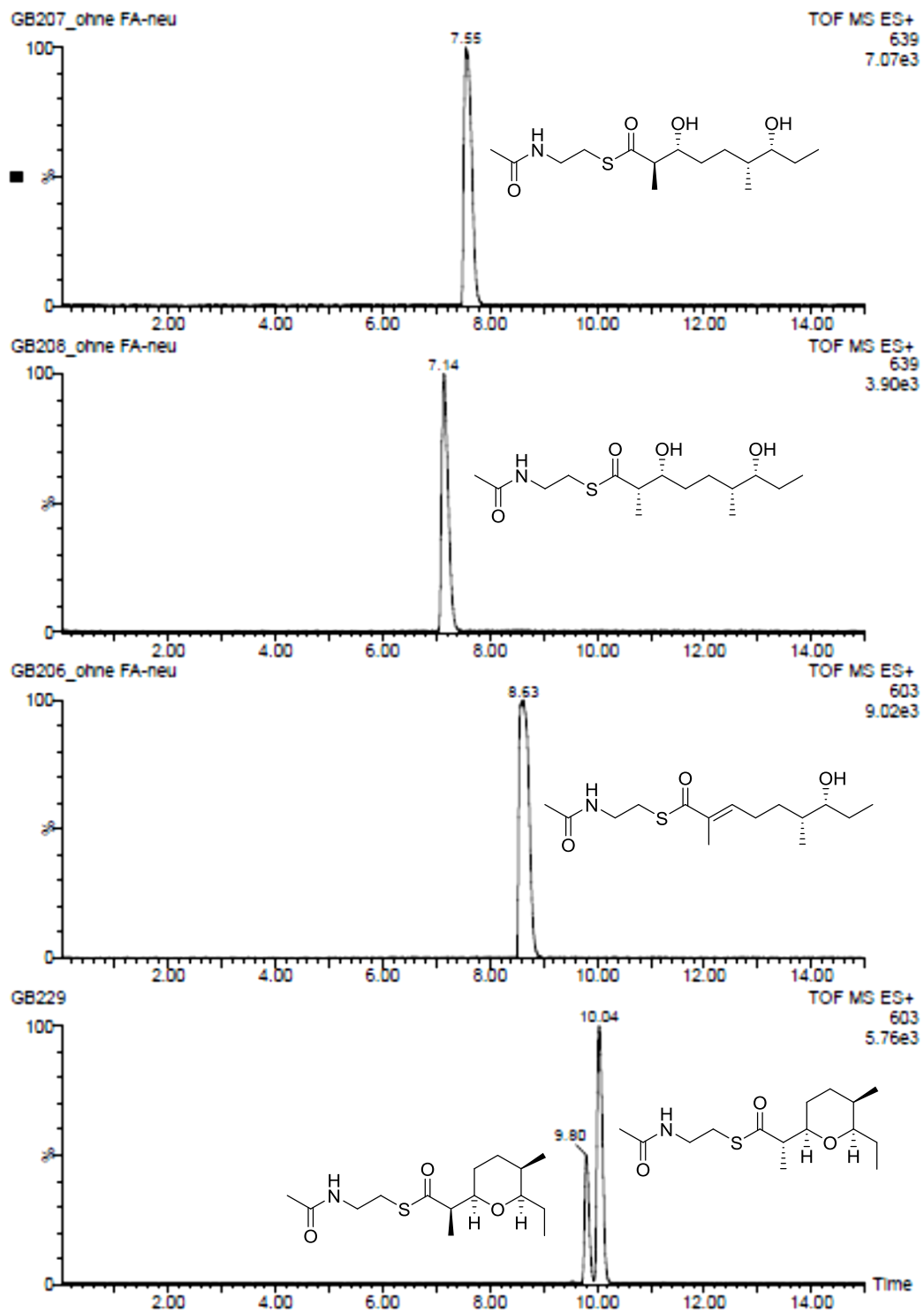


Abbildung A1: HPLC-MS Analyse der synthetischen Referenz Verbindungen. $[2M+Na]^+$ (104/106) = 639, $[2M+H]^+$ (102 oder 98 oder 100) = 603; x-Achse: Retentionszeit, y-Achse: relative Intensität.

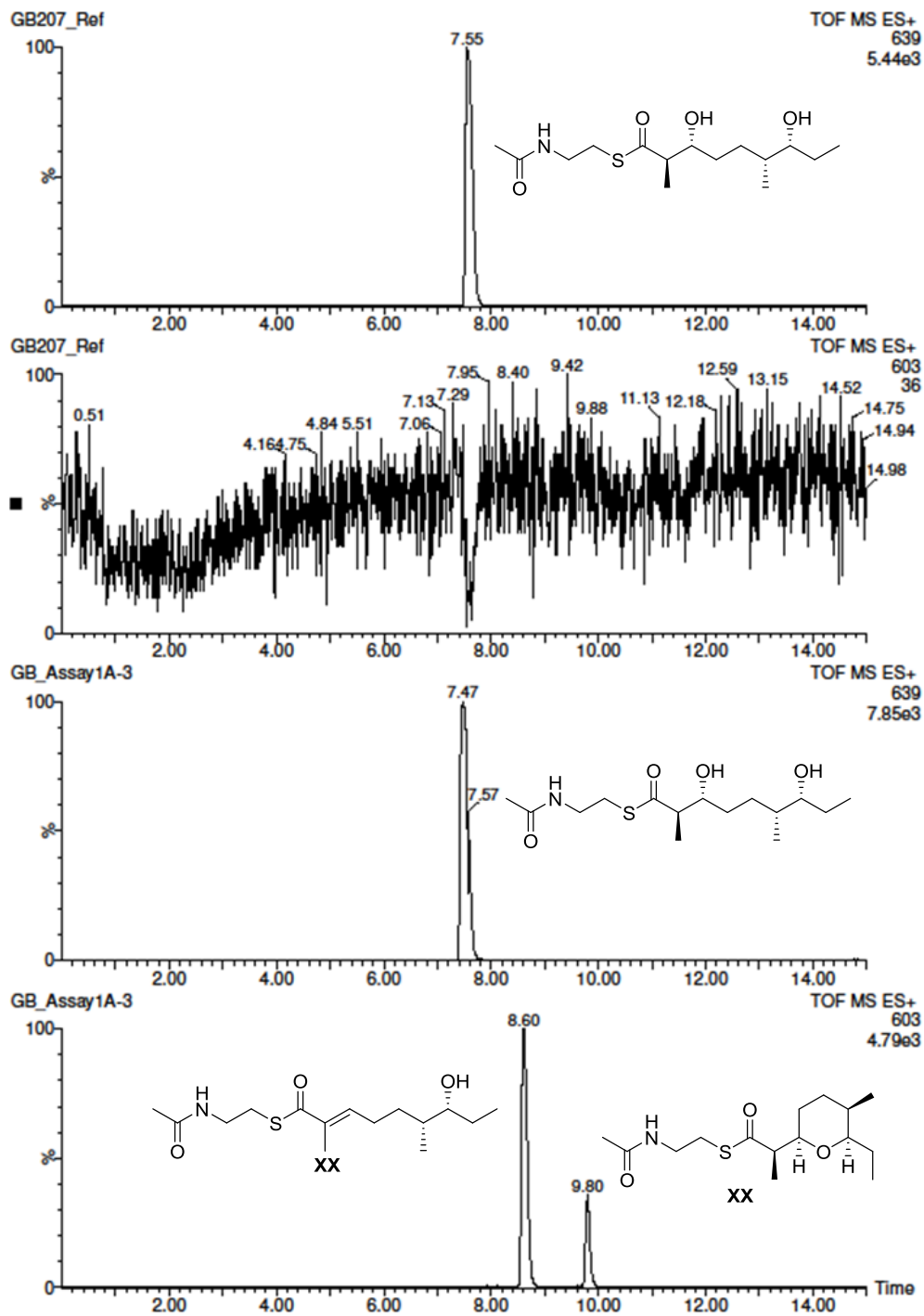


Abbildung A2: HPLC-MS Analyse der Enzymaktivitätstests mit **106**. a) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **106**, Massenspur für M = 639; b) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **106**, Massenspur für M = 603; c) Über Nacht Inkubation von **106** mit His₆-AmbDH3, Massenspur für M = 639; d) Über Nacht Inkubation von **106** mit His₆-AmbDH3, Massenspur für M = 603; [2M+Na]⁺ (**106**) = 639, [2M+H]⁺ (**102** oder **98** oder **100**) = 603; x-Achse: Retentionszeit, y-Achse: relative Intensität.

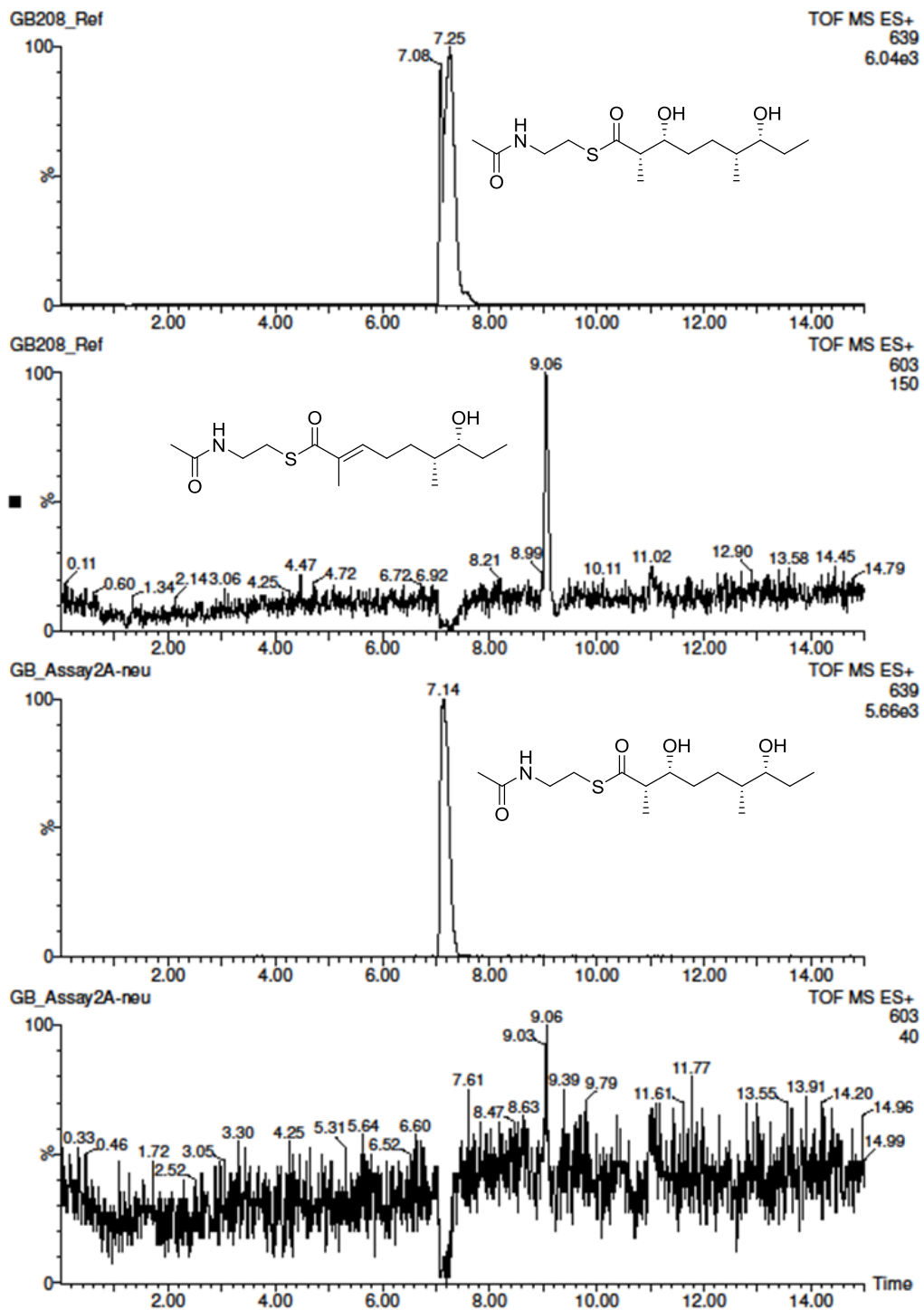


Abbildung A3: HPLC-MS Analyse der Enzymaktivitätstests mit **104**. a) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **104**, Massenspur für M = 639; b) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **104**, Massenspur für M = 603; c) Über Nacht Inkubation von **104** mit His₆-AmbDH3, Massenspur für M = 639; d) Über Nacht Inkubation von **104** mit His₆-AmbDH3, Massenspur für M = 603; [2M+Na]⁺ (**104**) = 639, [2M+H]⁺ (**102** oder **98** oder **100**) = 603; x-Achse: Retentionszeit, y-Achse: relative Intensität.

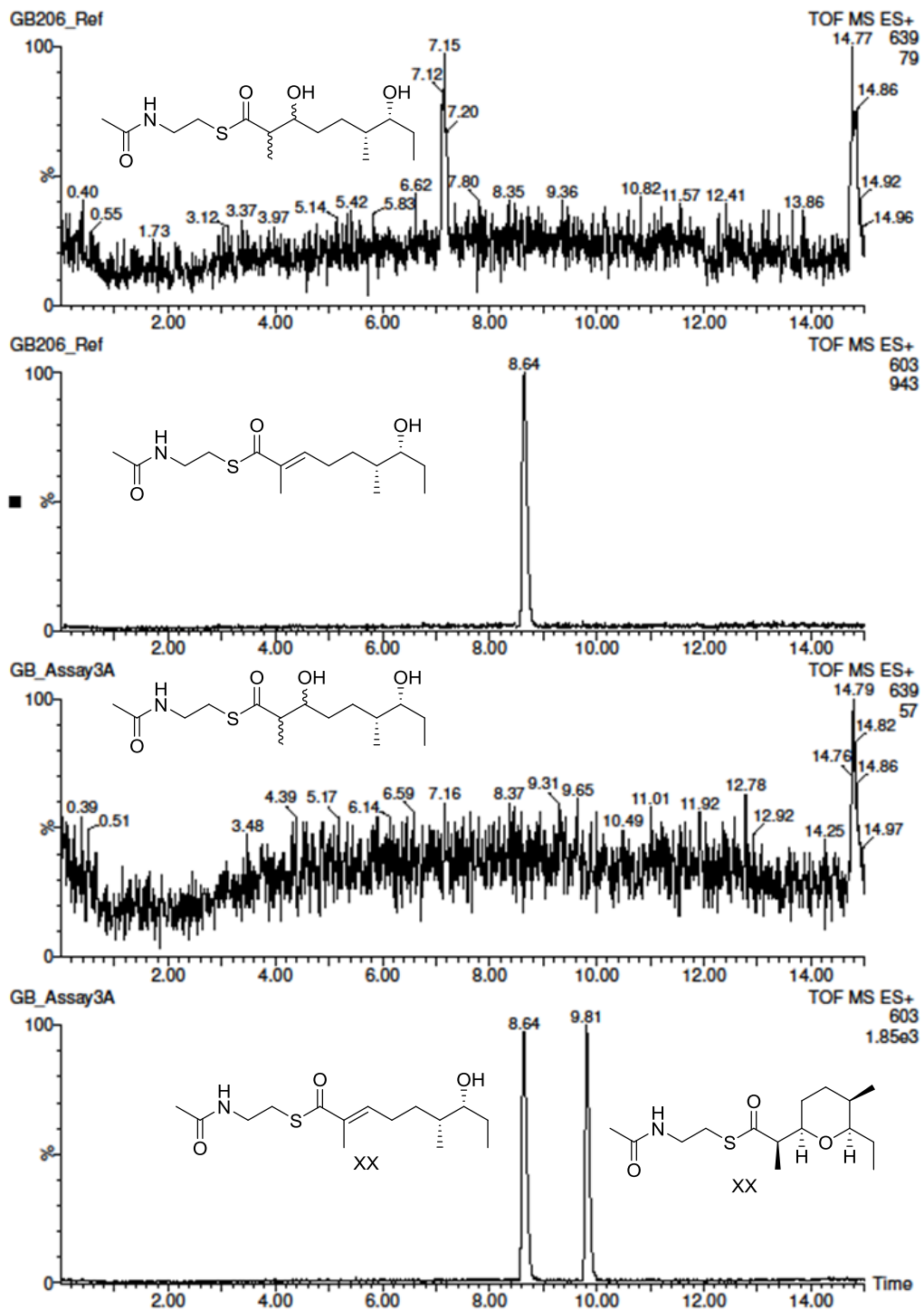


Abbildung A4: HPLC-MS Analyse der Enzymaktivitätstests mit **102**. a) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **102**, Massenspur M = 639; b) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **102**, Massenspur für M = 603; c) Über Nacht Inkubation von **102** mit His₆-AmbDH3, Massenspur für M = 639; d) Über Nacht Inkubation von **102** mit His₆-AmbDH3, Massenspur für M = 603; [2M+Na]⁺ (**104** oder **106**) = 639, [2M+H]⁺ (**102**) = 603; x-Achse: Retentionszeit, y-Achse: relative Intensität.

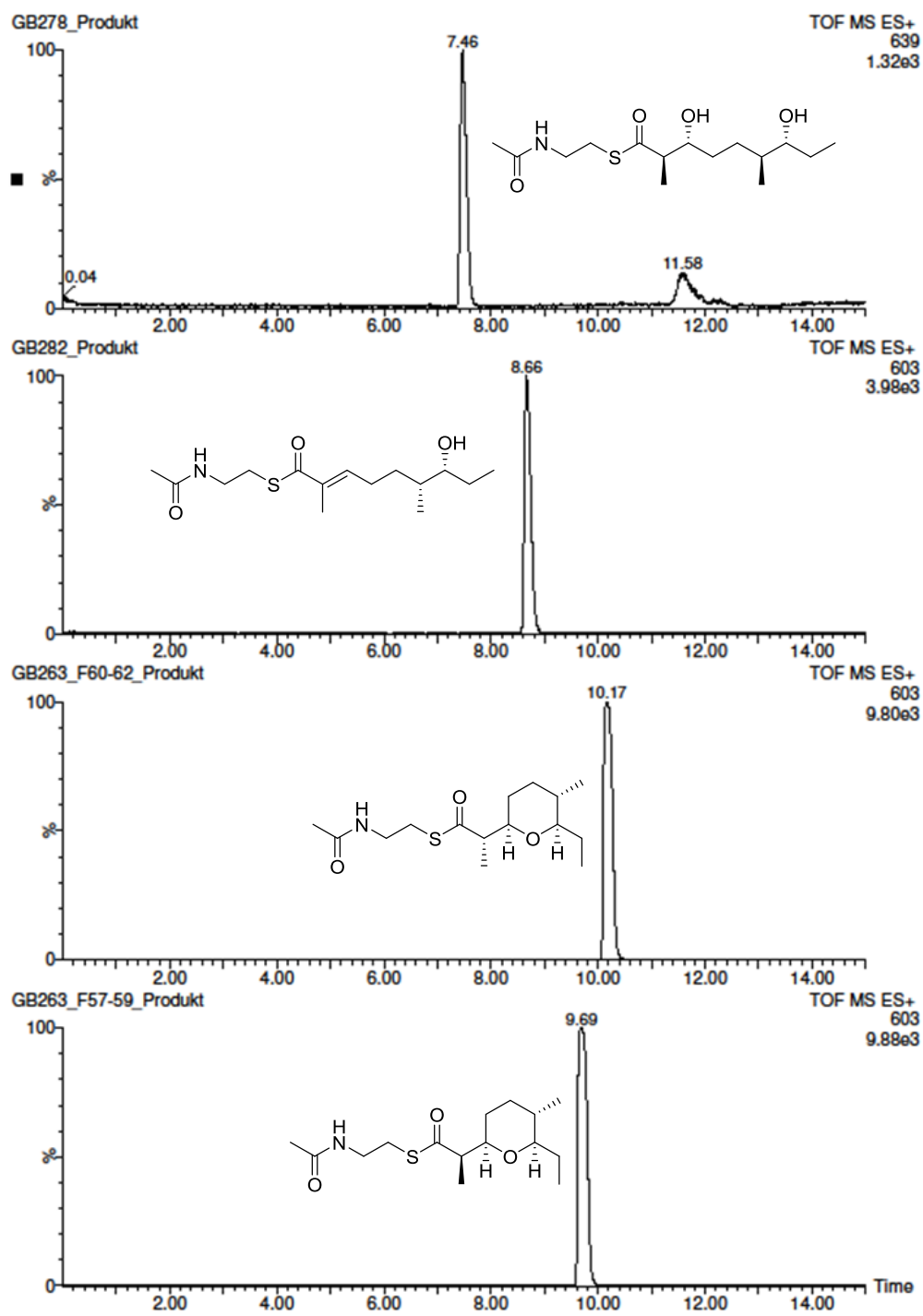


Abbildung A5: HPLC-MS Analyse der synthetischen Referenz Verbindungen **105**, **101**, **97** und **99**. $[2M+Na]^+$ (**105**) = 639, $[2M+H]^+$ (**101** oder **97** oder **99**) = 603; x-Achse: Retentionszeit, y-Achse: relative Intensität.

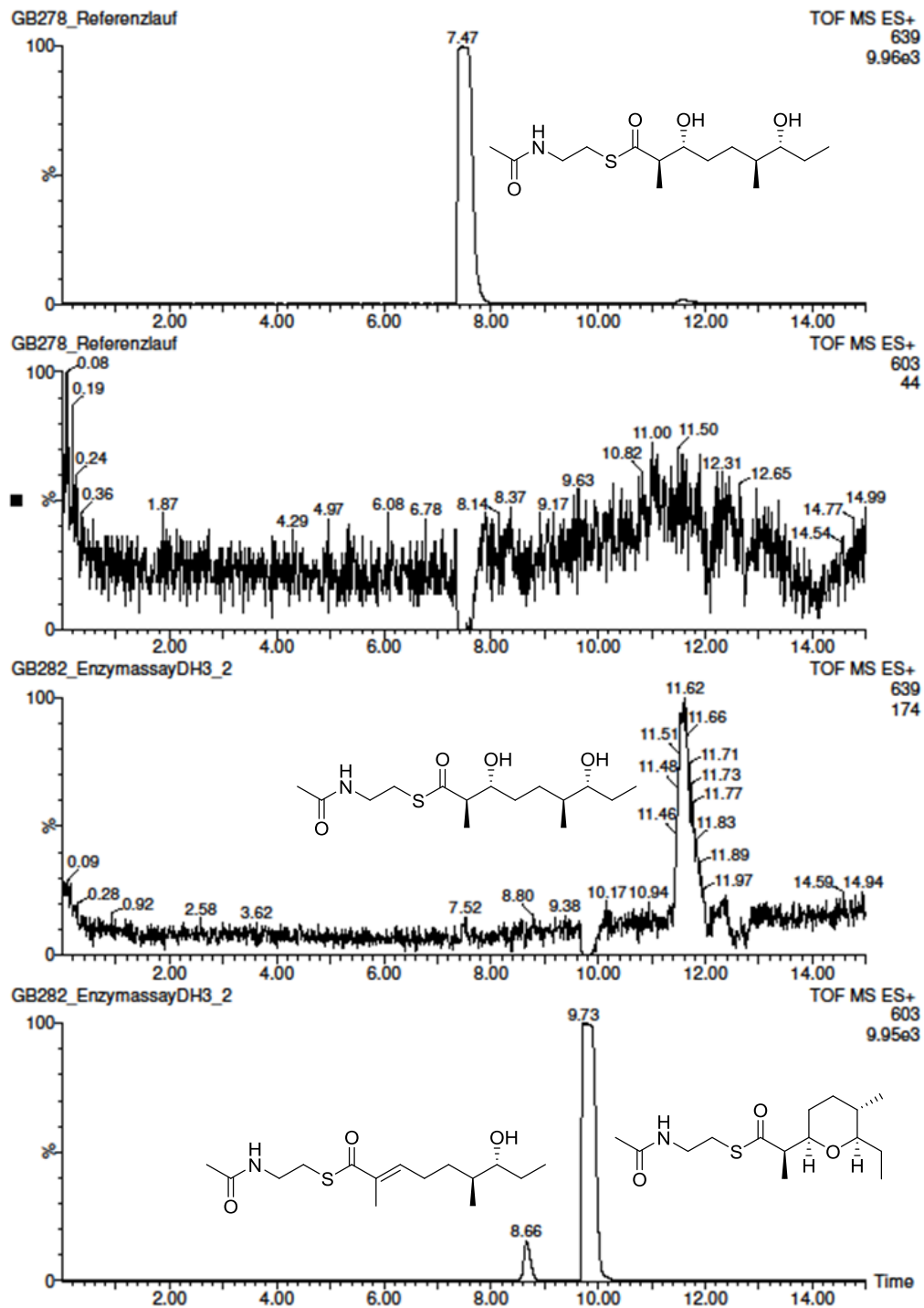


Abbildung A6: HPLC-MS Analyse der Enzymaktivitätstests mit **105**. a) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **105**, Massenspür für M = 639; b) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **105**, Massenspür für M = 603; c) Über Nacht Inkubation von **105** mit His₆-AmbDH3, Massenspür für M = 639; d) Über Nacht Inkubation von **105** mit His₆-AmbDH3, Massenspür für M = 603; [2M+Na]⁺ (**105**) = 639, [2M+H]⁺ (**101** oder **99**) = 603; x-Achse: Retentionszeit, y-Achse: relative Intensität.

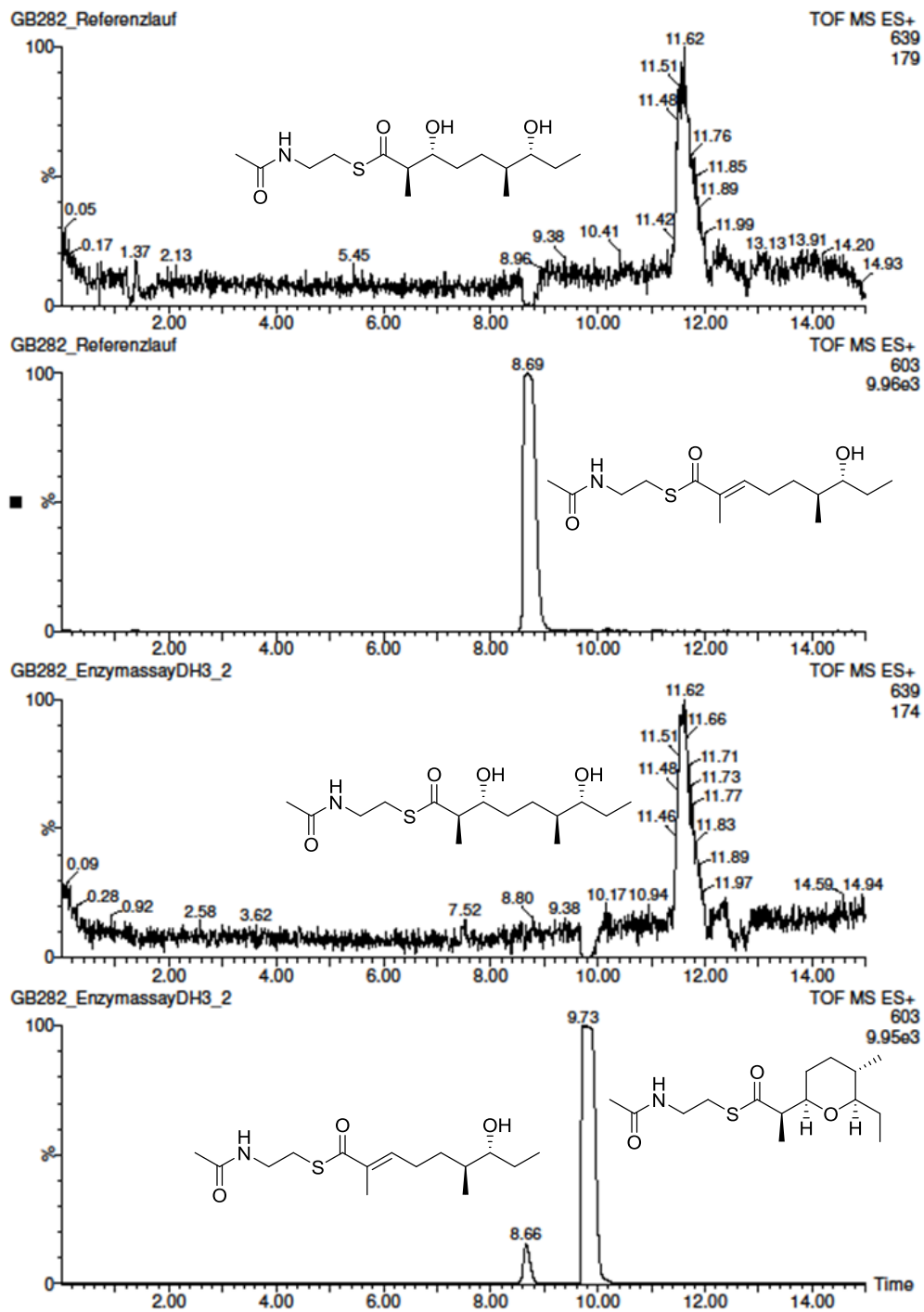


Abbildung A7: HPLC-MS Analyse der Enzymaktivitätstests mit **101**. a) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **101**, Massenspür für $M = 639$; b) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **101**, Massenspür für $M = 603$; c) Über Nacht Inkubation von **101** mit His₆-AmbDH3, Massenspür für $M = 639$; d) Über Nacht Inkubation von **101** mit His₆-AmbDH3, Massenspür für $M = 603$; $[2M+Na]^+$ (**105**) = 639, $[2M+H]^+$ (**101** oder **99**) = 603; x-Achse: Retentionszeit, y-Achse: relative Intensität.

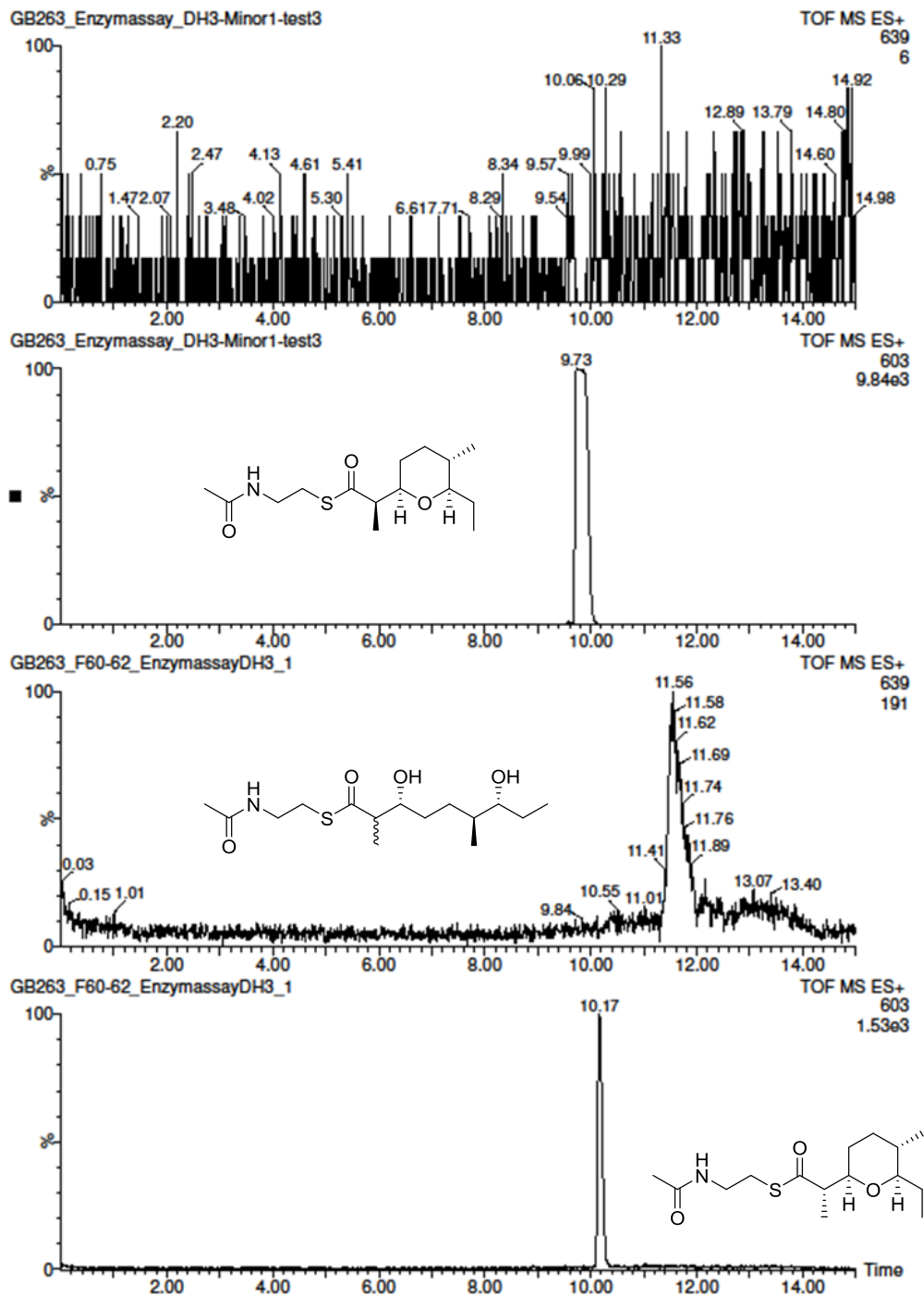


Abbildung A8: HPLC-MS Analyse der Enzymaktivitätstests mit **99** und **97**. a) Über Nacht Inkubation von **99** mit His₆-AmbDH3, Massenspur für M = 639; b) Über Nacht Inkubation von **99** mit His₆-AmbDH3, Massenspur für M = 603; c) Über Nacht Inkubation von **97** mit His₆-AmbDH3, Massenspur für M = 639; d) Über Nacht Inkubation von **97** mit His₆-AmbDH3, Massenspur für M = 603; [2M+Na]⁺ (**105** oder **106**) = 639, [2M+H]⁺ (**99** oder **97**) = 603; x-Achse: Retentionszeit, y-Achse: relative Intensität.

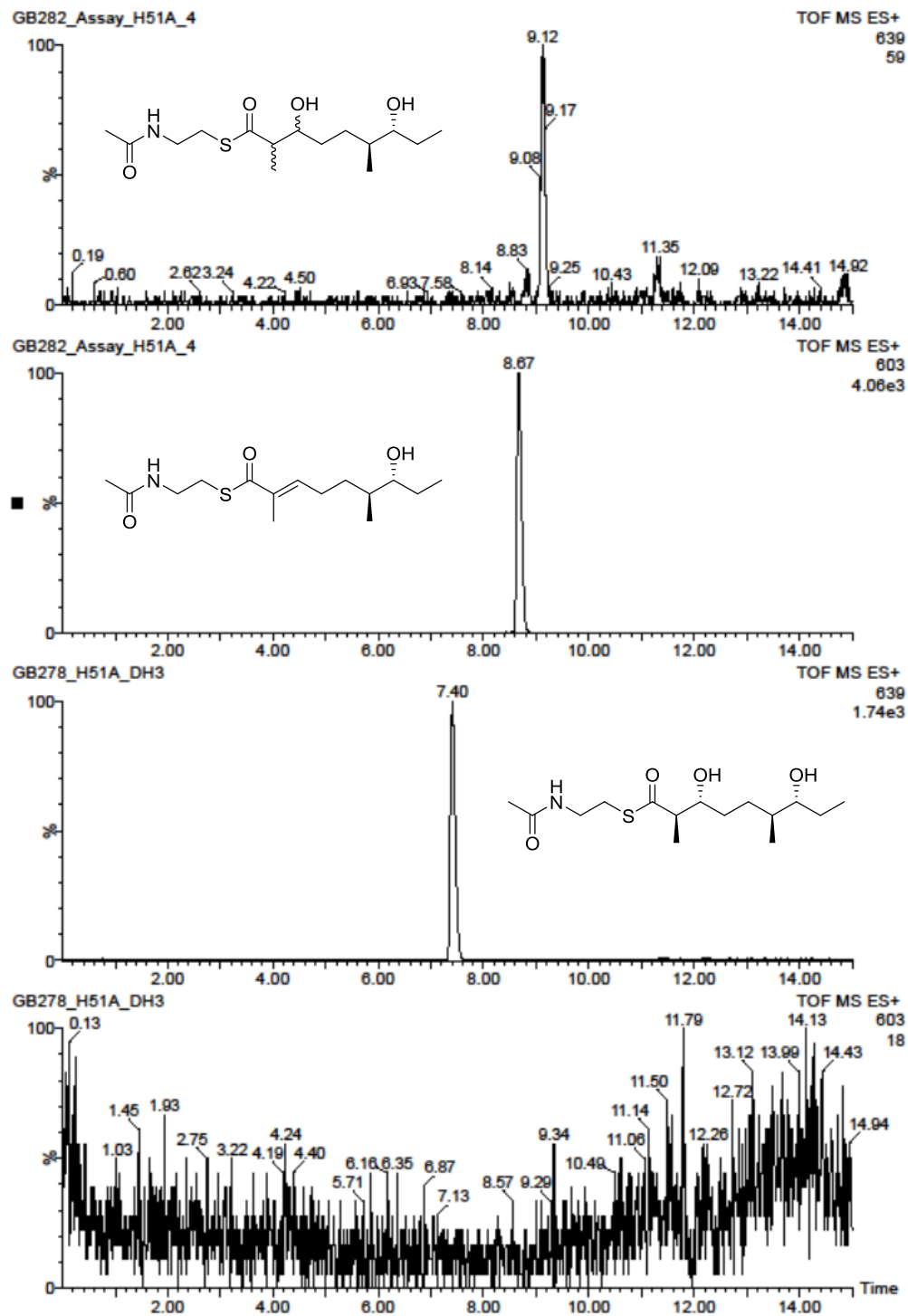


Abbildung A9: HPLC-MS Analyse der Enzymaktivitätstests mit **105** und **101**. a) Über Nacht Inkubation von **101** mit His₆-AmbDH3-H51A, Massenspur für M = 639; b) Über Nacht Inkubation von **101** mit His₆-AmbDH3-H51A, Massenspur für M = 603; c) Über Nacht Inkubation von **105** mit His₆-AmbDH3-H51A, Massenspur für M = 639; d) Über Nacht Inkubation von **105** mit His₆-AmbDH3-H51A, Massenspur für M = 603; $[2M+Na]^+$ (**105** oder **106**) = 639, $[2M+H]^+$ (**102** oder **97** oder **99**) = 603; x-Achse: Retentionszeit, y-Achse: relative Intensität.

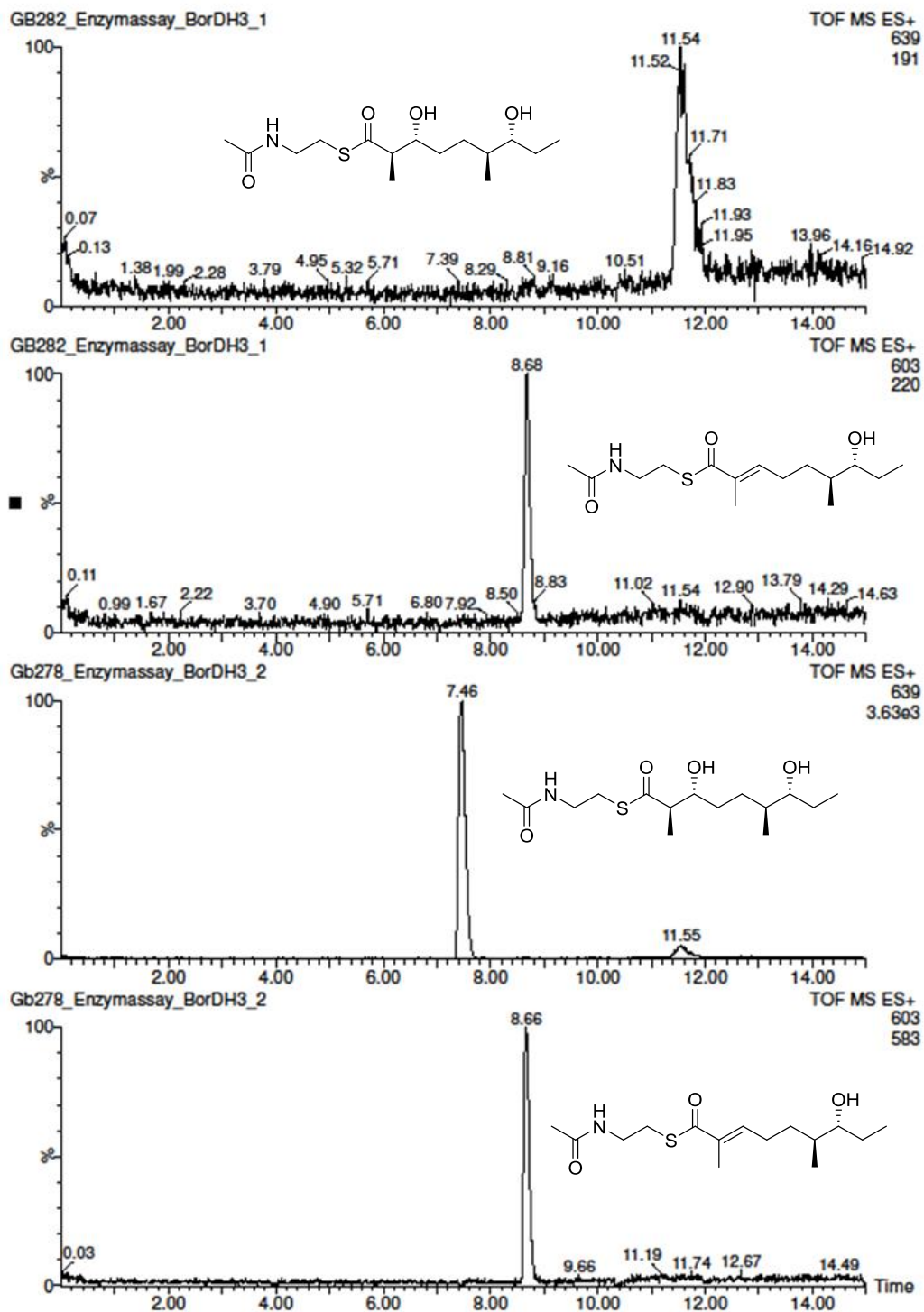


Abbildung A10: HPLC-MS Analyse der Enzymaktivitätstests mit **105** und **101**. a) Über Nacht Inkubation von **101** mit His₆-BorDH3, Massenspur für M = 639; b) Über Nacht Inkubation von **101** mit His₆-BorDH3, Massenspur für M = 603; c) Über Nacht Inkubation von **105** mit His₆-BorDH3, Massenspur für M = 639; d) Über Nacht Inkubation von **105** mit His₆-BorDH3, Massenspur für M = 603; [2M+Na]⁺ (**105** oder **106**) = 639, [2M+H]⁺ (**102** oder **97** oder **99**) = 603; x-Achse: Retentionszeit, y-Achse: relative Intensität.

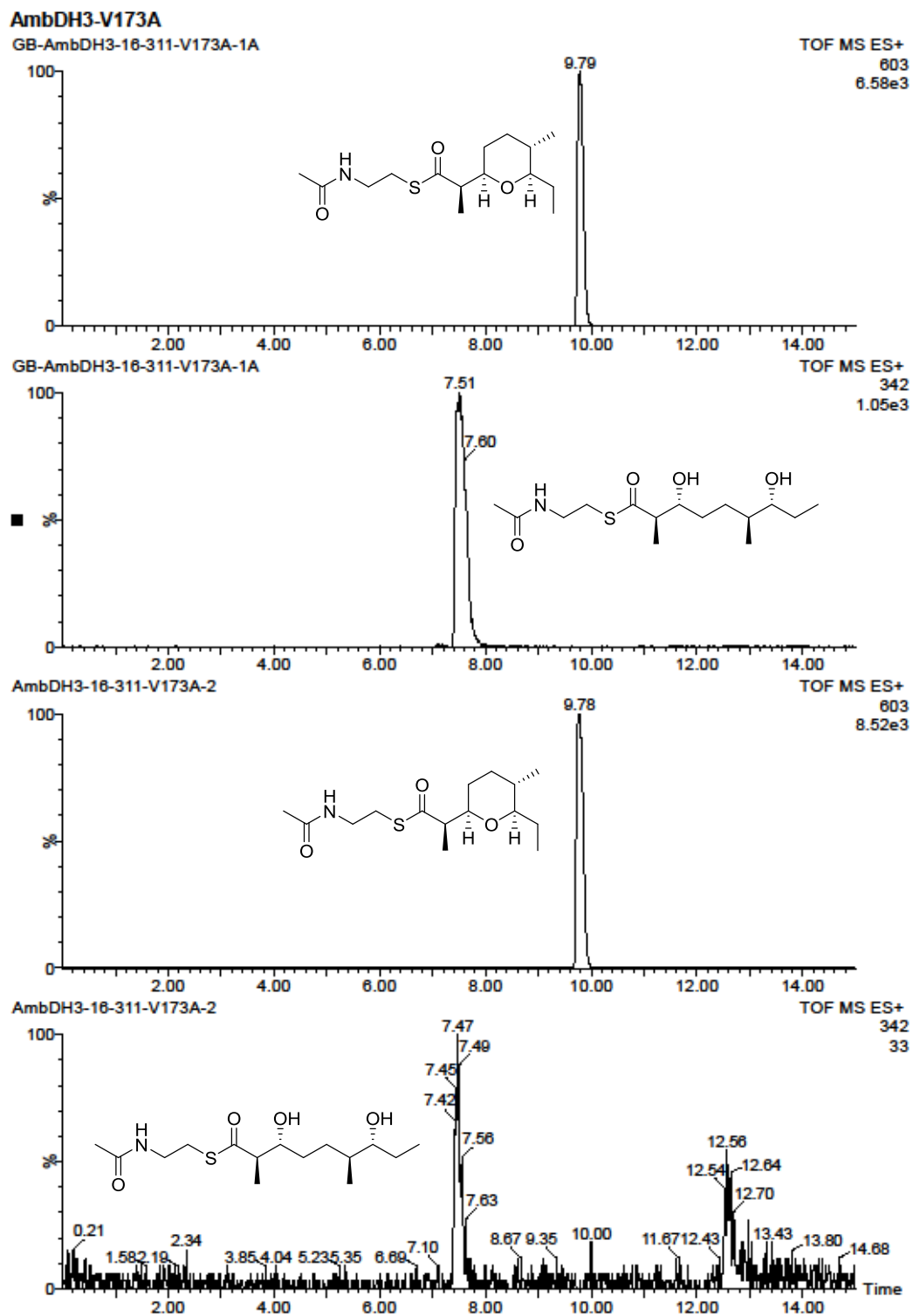


Abbildung A11: HPLC-MS Analyse der Enzymaktivitätstests mit **105** und **101**. a) Über Nacht Inkubation von **105** mit His₆-AmbDH3_V173A, Massenspur für M = 603; b) Über Nacht Inkubation von **105** mit His₆-AmbDH3_V173A, Massenspur für M = 342; c) Über Nacht Inkubation von **101** mit His₆-AmbDH3_V173A, Massenspur für M = 603; d) Über Nacht Inkubation von **101** mit His₆-AmbDH3_V173A, Massenspur für M = 342; [M+Na]⁺ (**105**) = 342, [2M+H]⁺ (**99** oder **101**) = 603; x-Achse: Retentionszeit, y-Achse: relative Intensität.

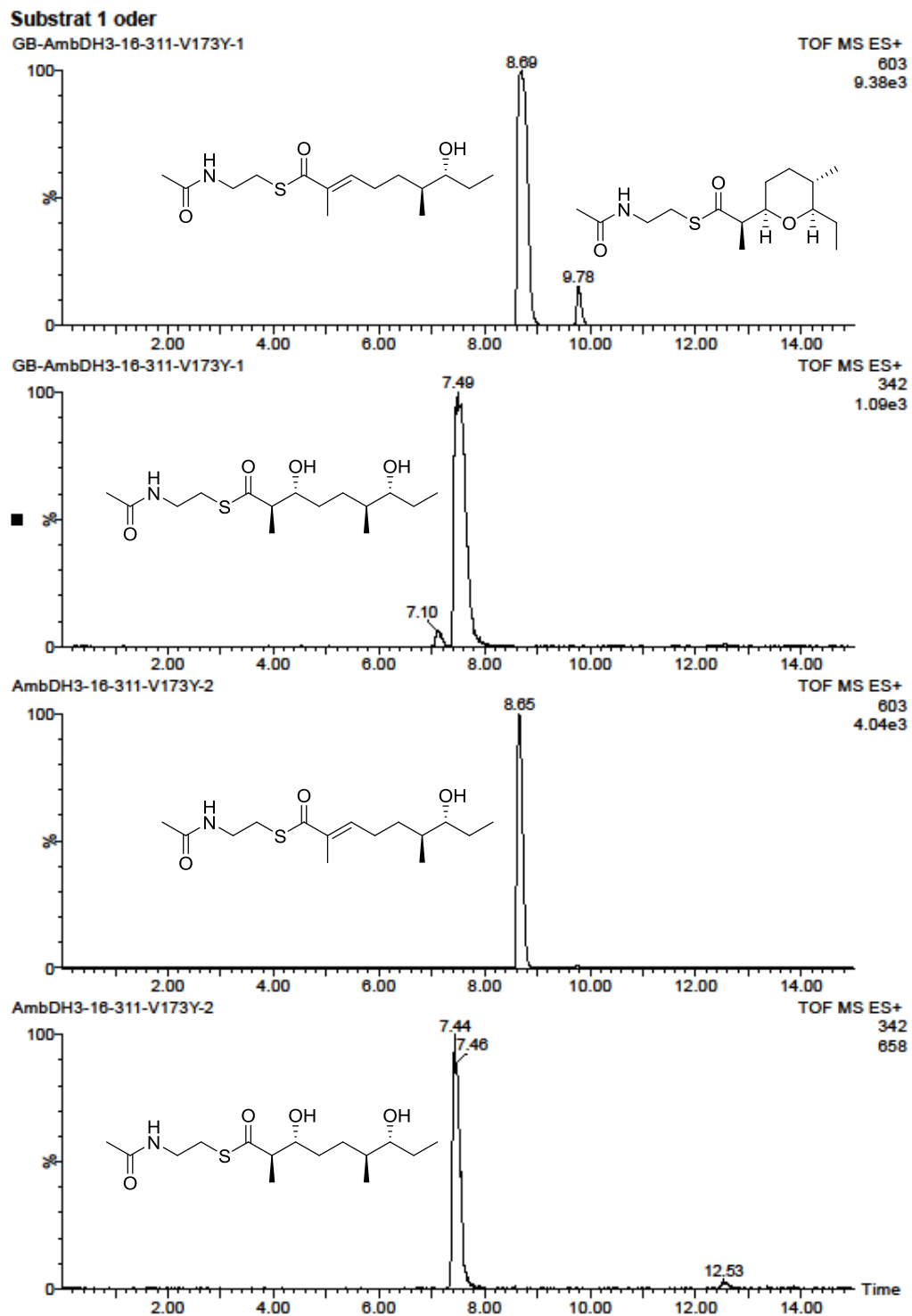
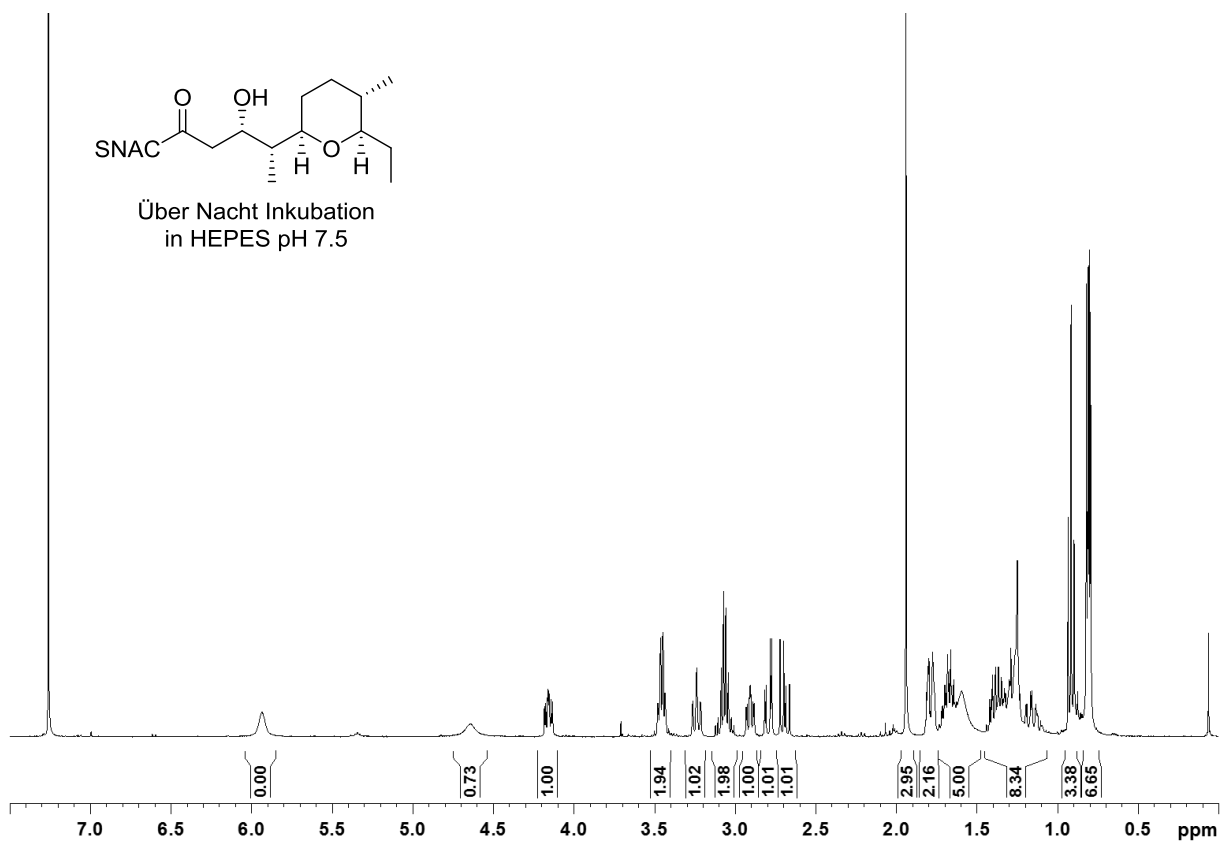
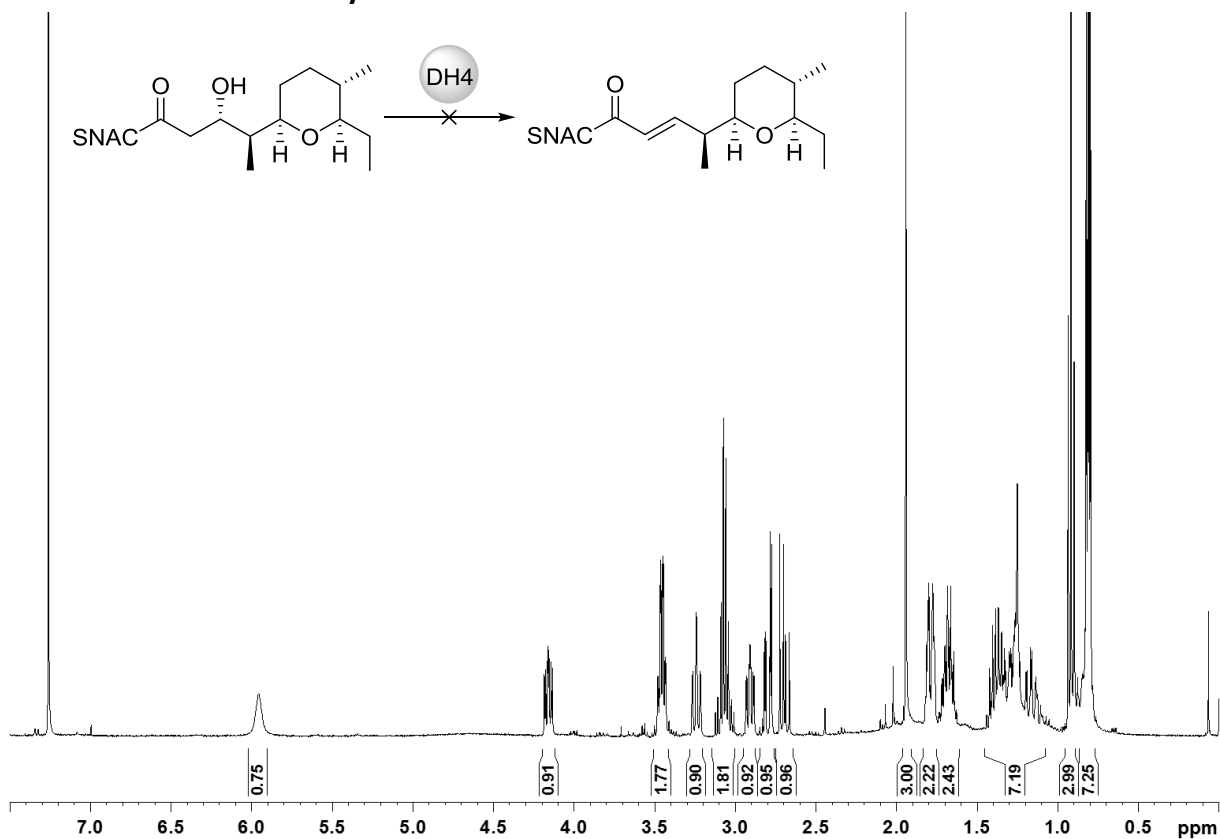
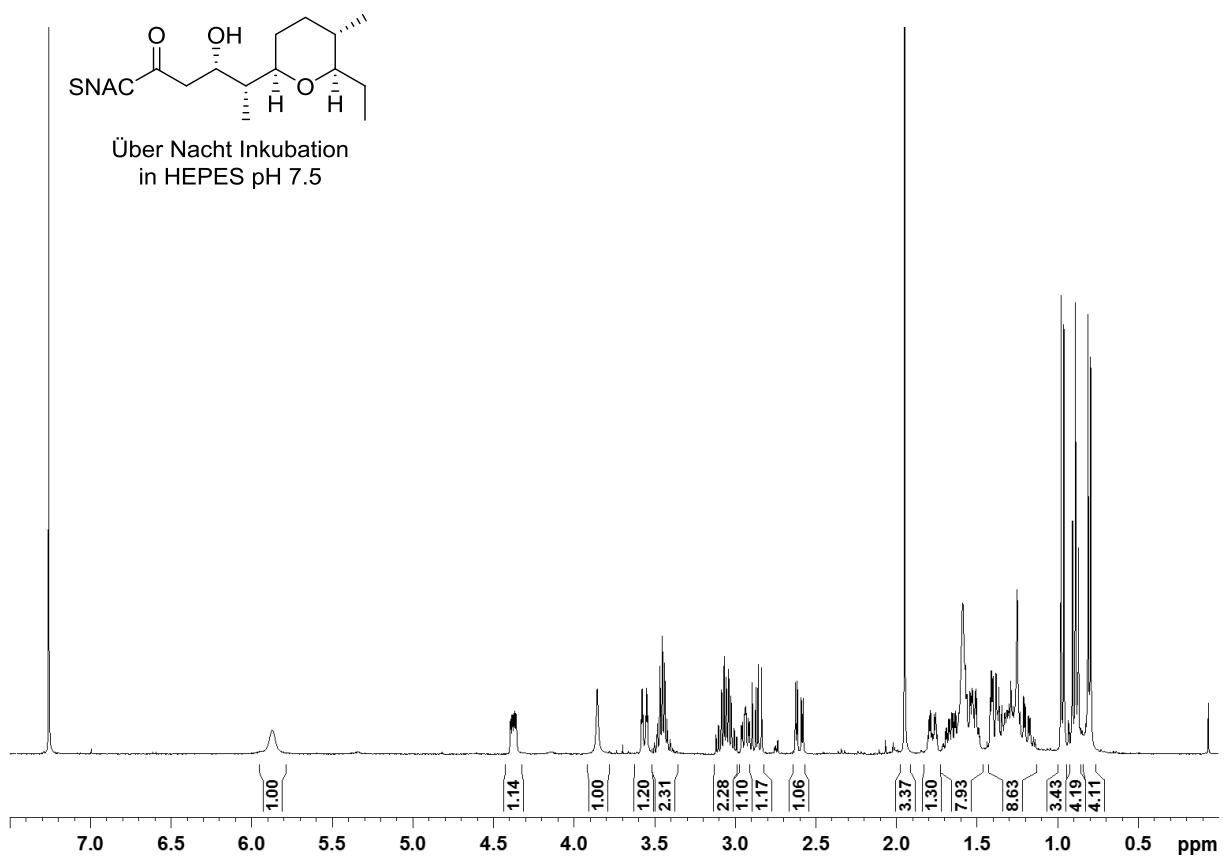
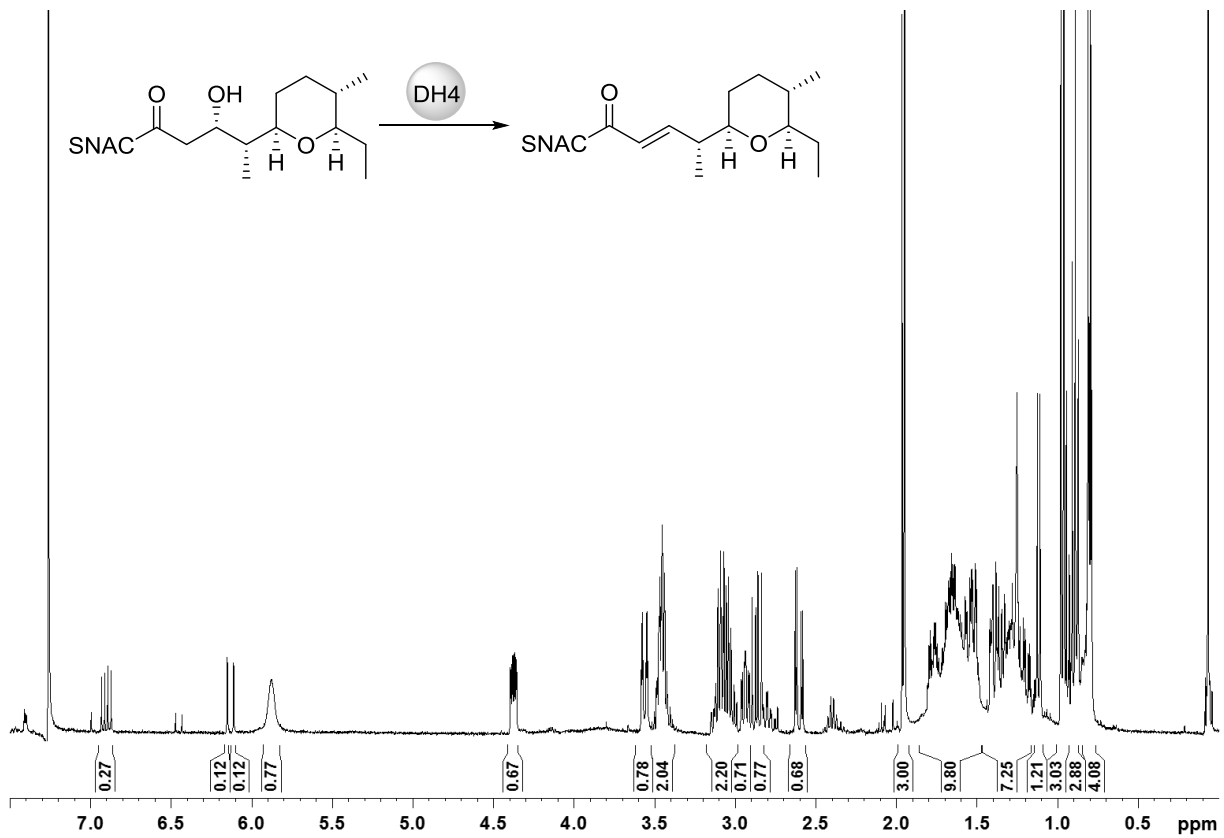
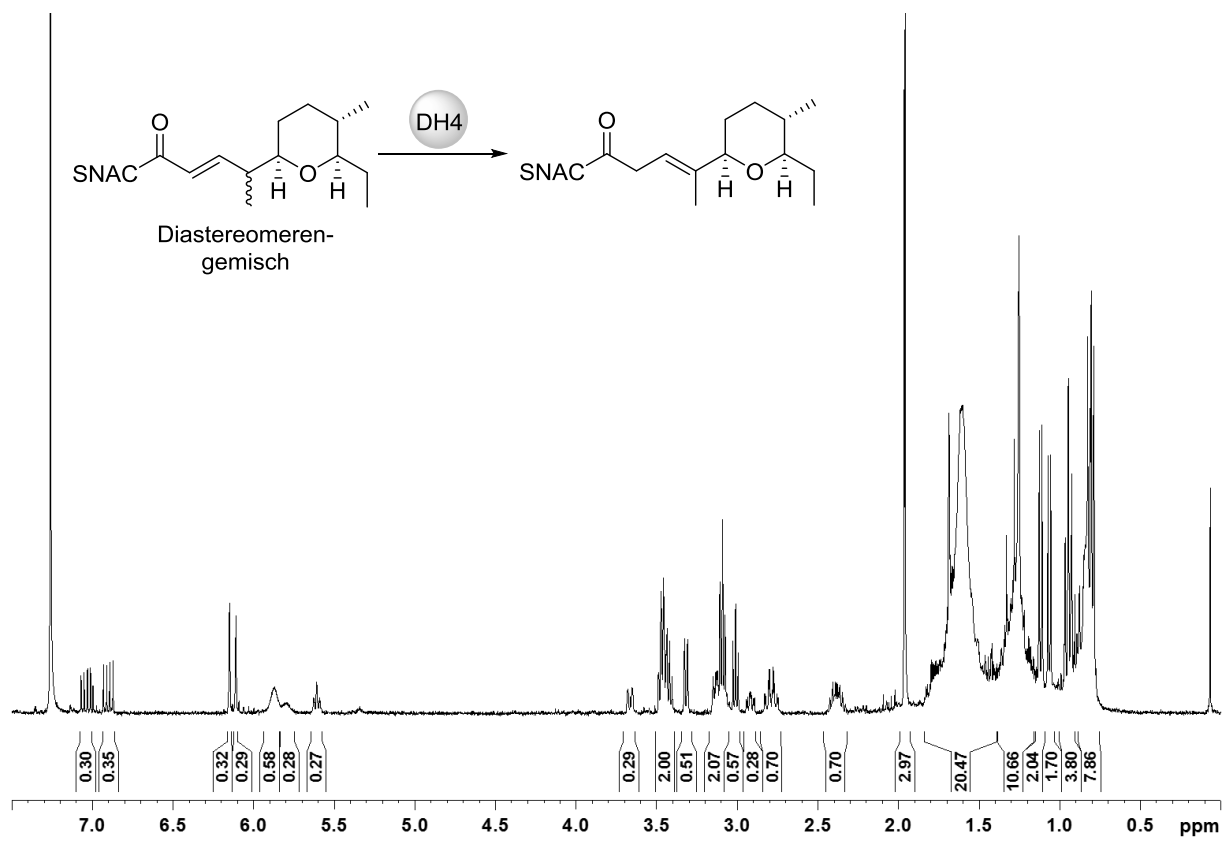


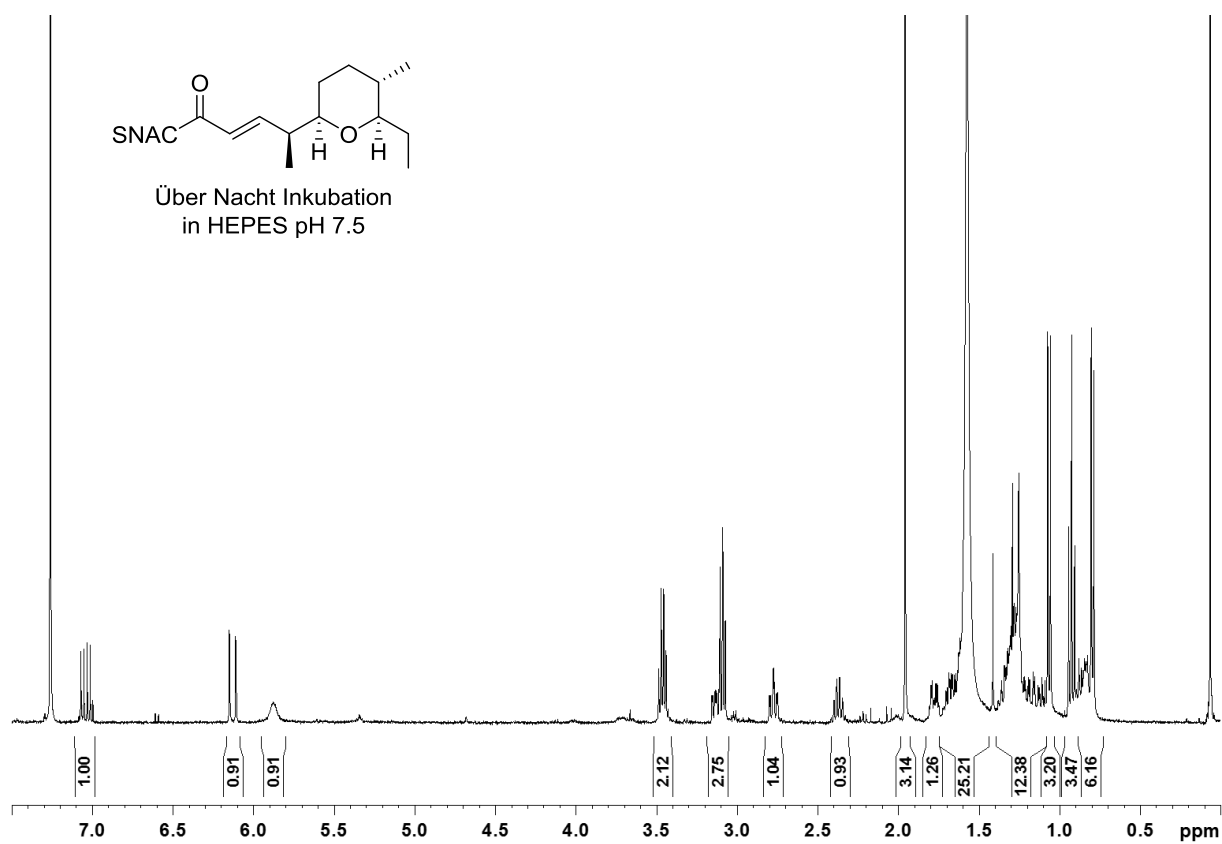
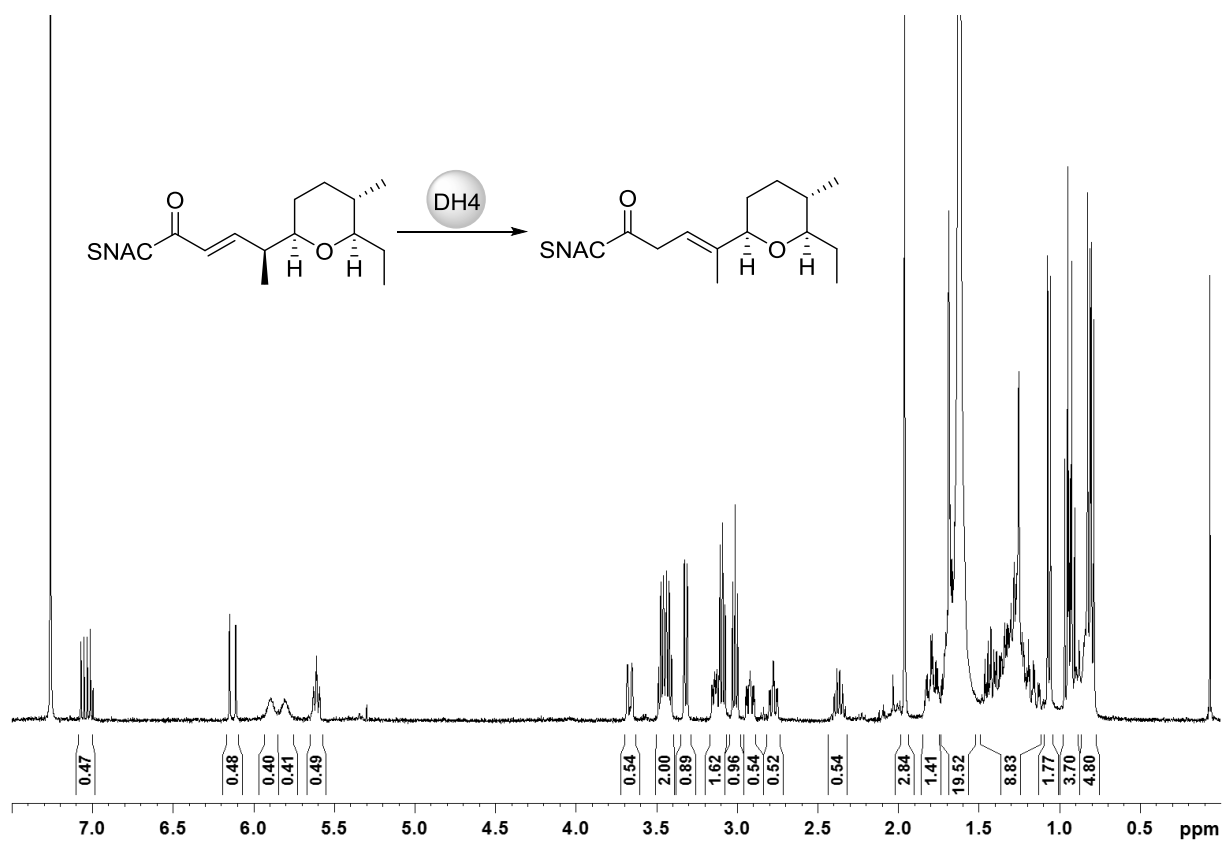
Abbildung A12: HPLC-MS Analyse der Enzymaktivitätstests mit **105** und **101**. a) Über Nacht Inkubation von **105** mit His₆-AmbDH3_V173Y, Massenspur für M = 603; b) Über Nacht Inkubation von **105** mit His₆-AmbDH3_V173Y, Massenspur für M = 342; c) Über Nacht Inkubation von **101** mit His₆-AmbDH3_V173Y, Massenspur für M = 603; d) Über Nacht Inkubation von **101** mit His₆-AmbDH3_V173Y, Massenspur für M = 342; [M+Na]⁺ (**105**) = 342, [2M+H]⁺ (**99** oder **101**) = 603; x-Achse: Retentionszeit, y-Achse: relative Intensität.

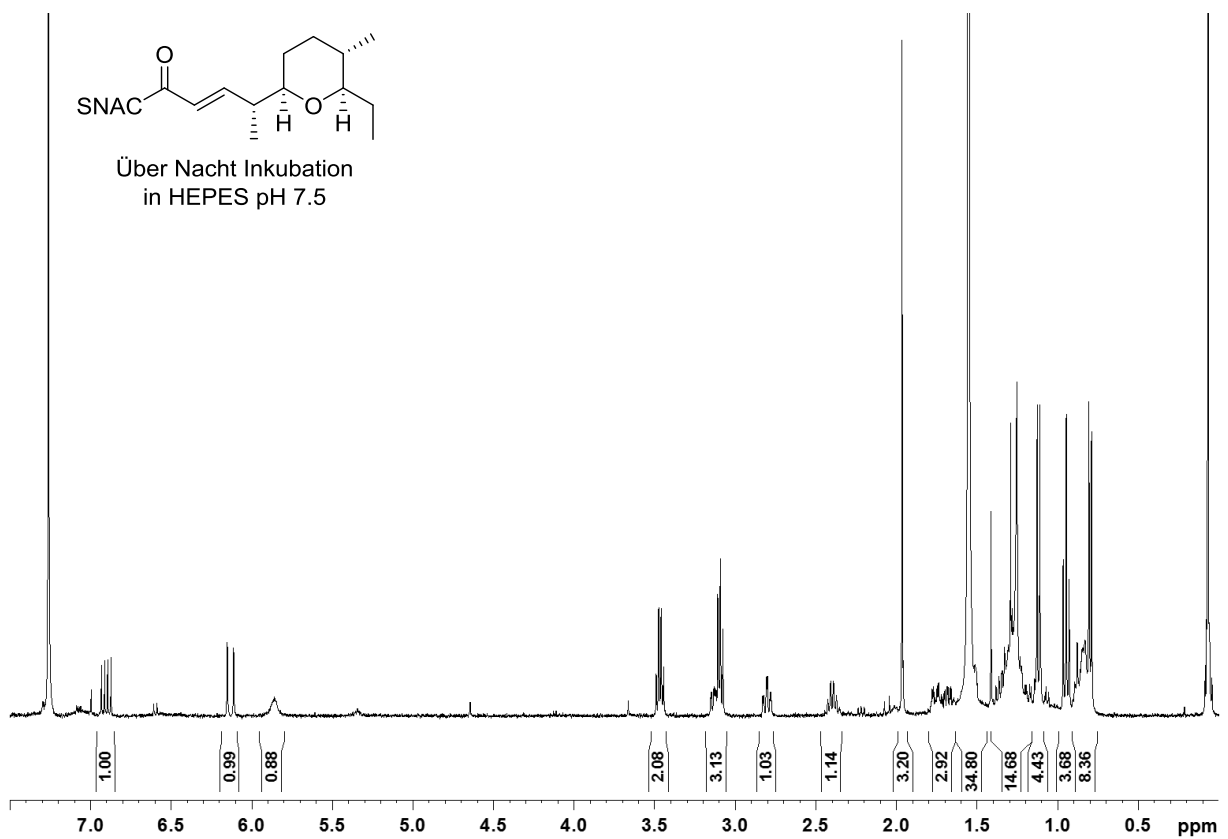
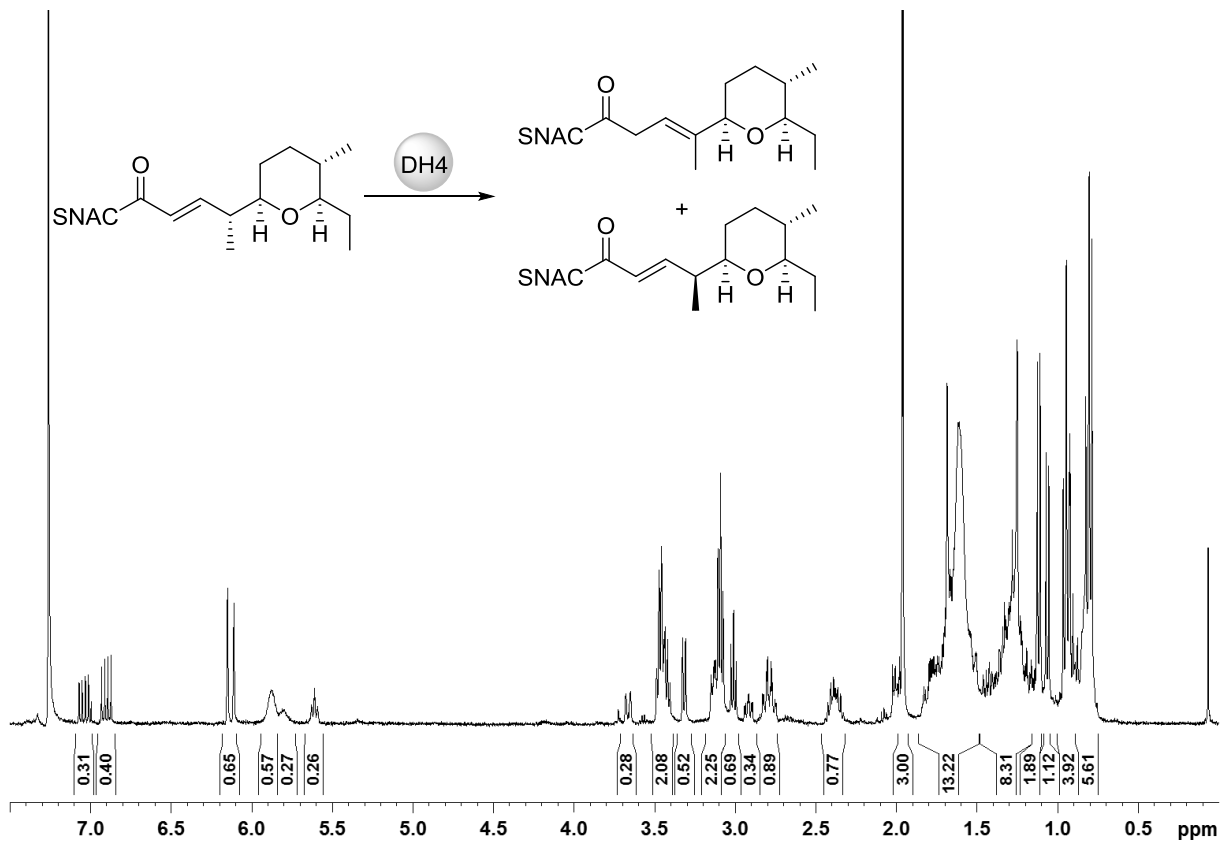
7.3 Studien zur biosynthetischen Rolle der multifunktionalen Dehydratase-Domäne AmbDH4 und der C-Methyltransferase AmbM

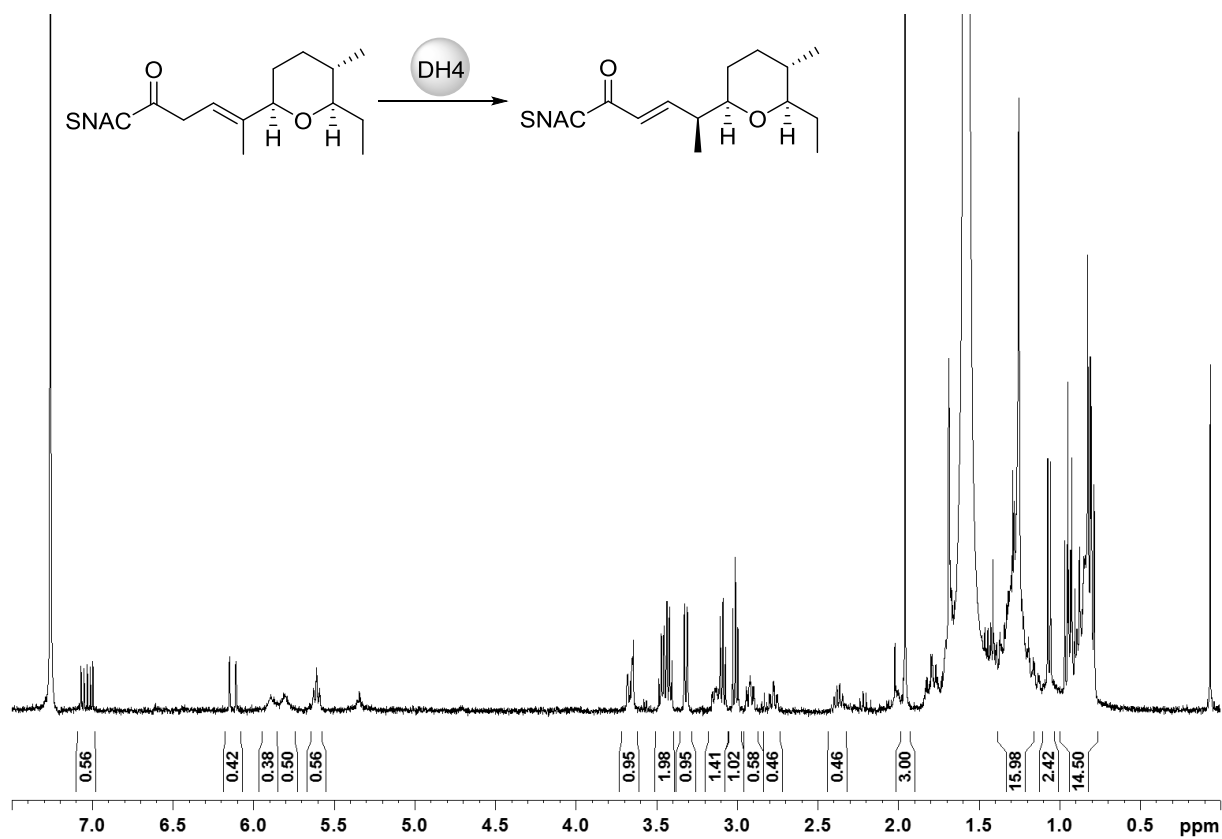
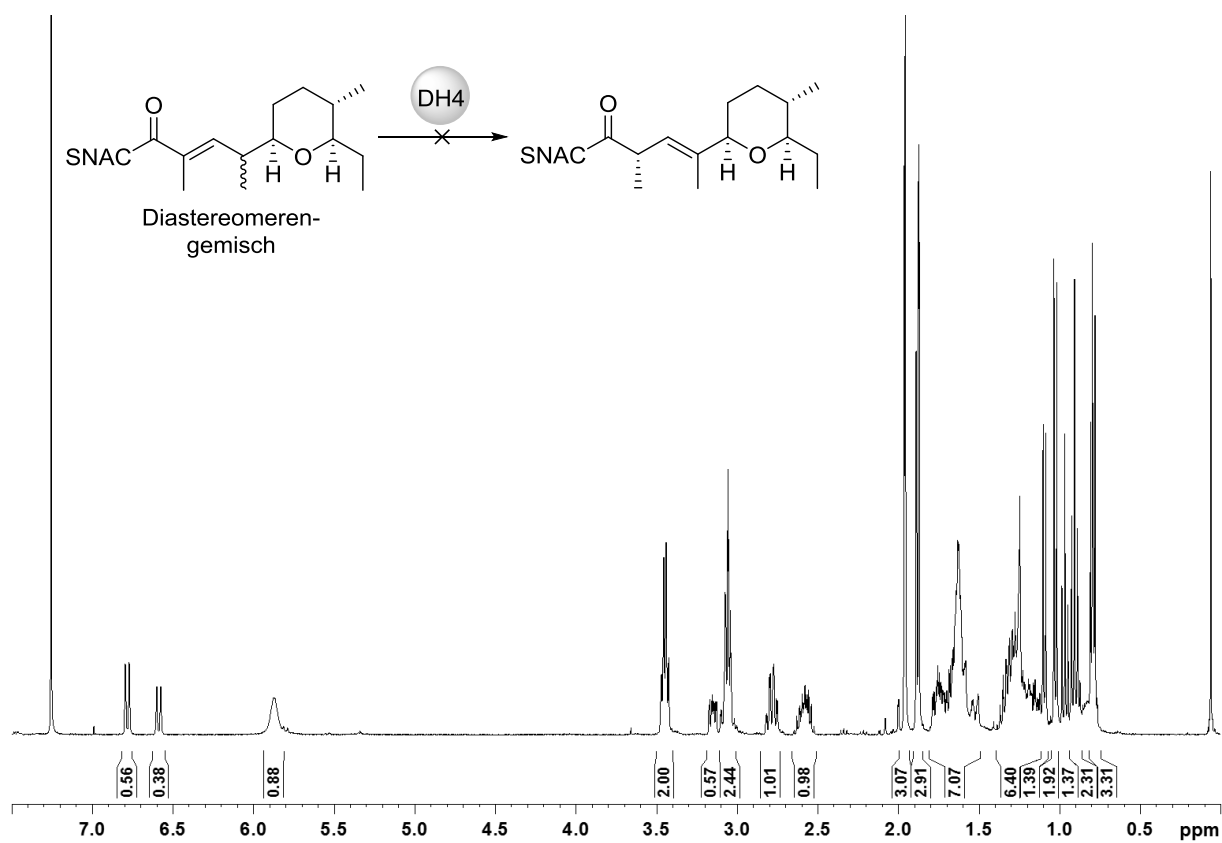












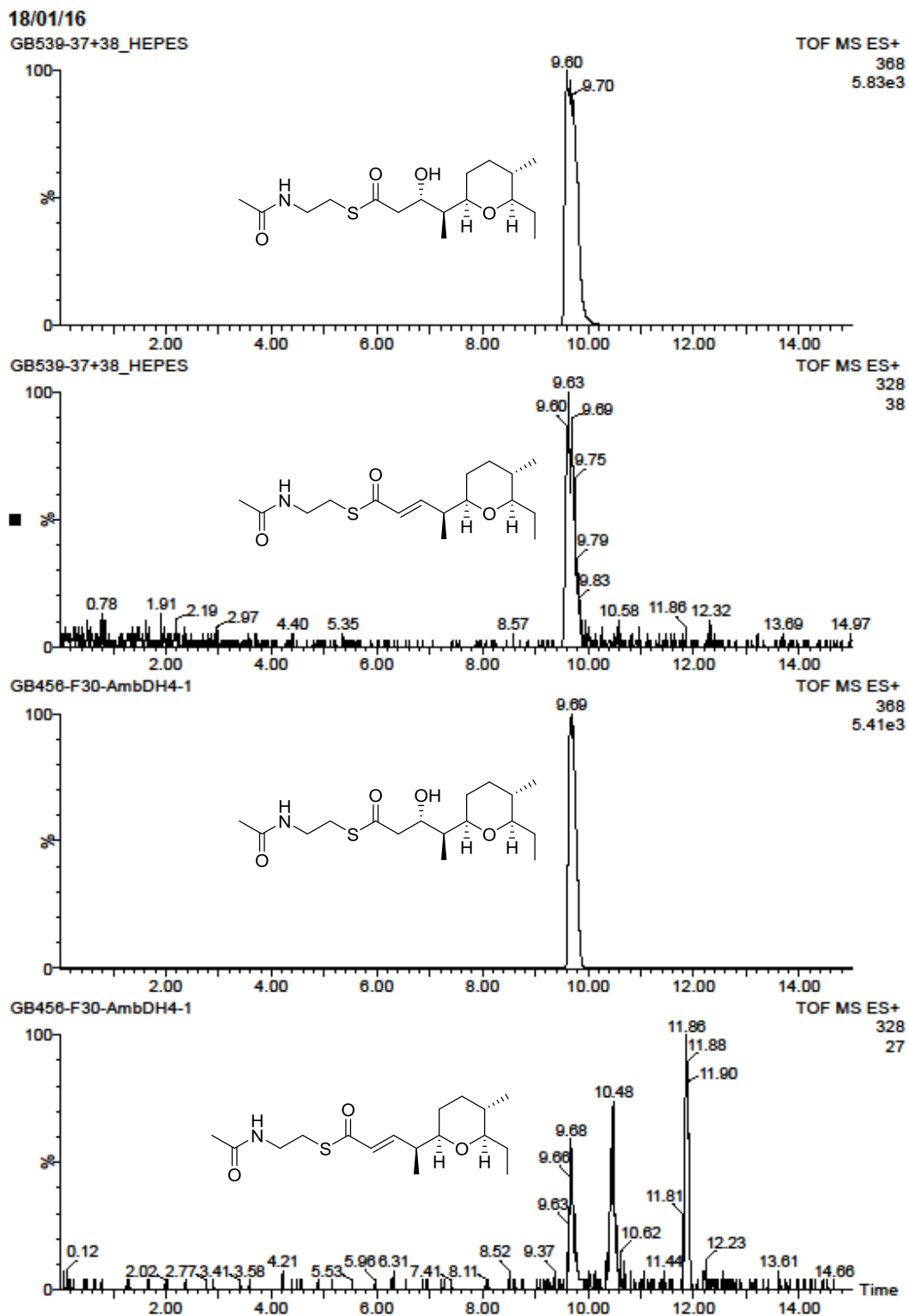


Abbildung A13: HPLC-MS Analyse der Enzymaktivitätstests mit **134a**. a) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **134a**, Massenspur für $M = 368$; b) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **134a**, Massenspur für $M = 328$; c) Über Nacht Inkubation von **134a** mit His₆-AmbDH4, Massenspur für $M = 368$; d) Über Nacht Inkubation von **134a** mit His₆-AmbDH4, Massenspur für $M = 328$; $[M+Na]^+$ (**134a**) = 368, $[M+H]^+$ (**135a**) = 328; x-Achse: Retentionszeit, y-Achse: relative Intensität.

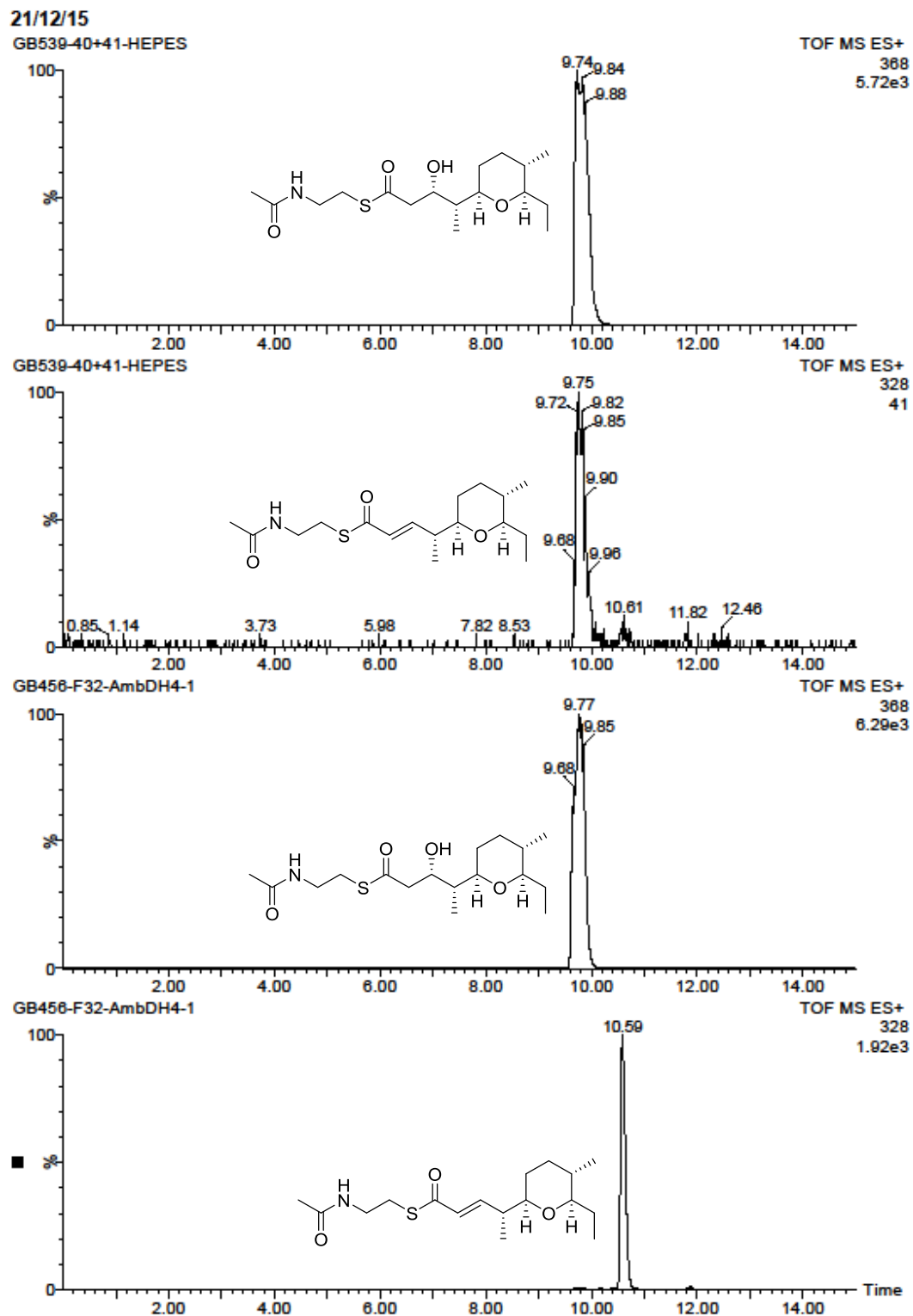


Abbildung A14: HPLC-MS Analyse der Enzymaktivitätstests mit **134b**. a) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **134b**, Massenspur für $M = 368$; b) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **134b**, Massenspur für $M = 328$; c) Über Nacht Inkubation von **134b** mit His₆-AmbDH4, Massenspur für $M = 368$; d) Über Nacht Inkubation von **134b** mit His₆-AmbDH4, Massenspur für $M = 328$; $[M+Na]^+$ (**134b**) = 368, $[M+H]^+$ (**135b**) = 328; x-Achse: Retentionszeit, y-Achse: relative Intensität.

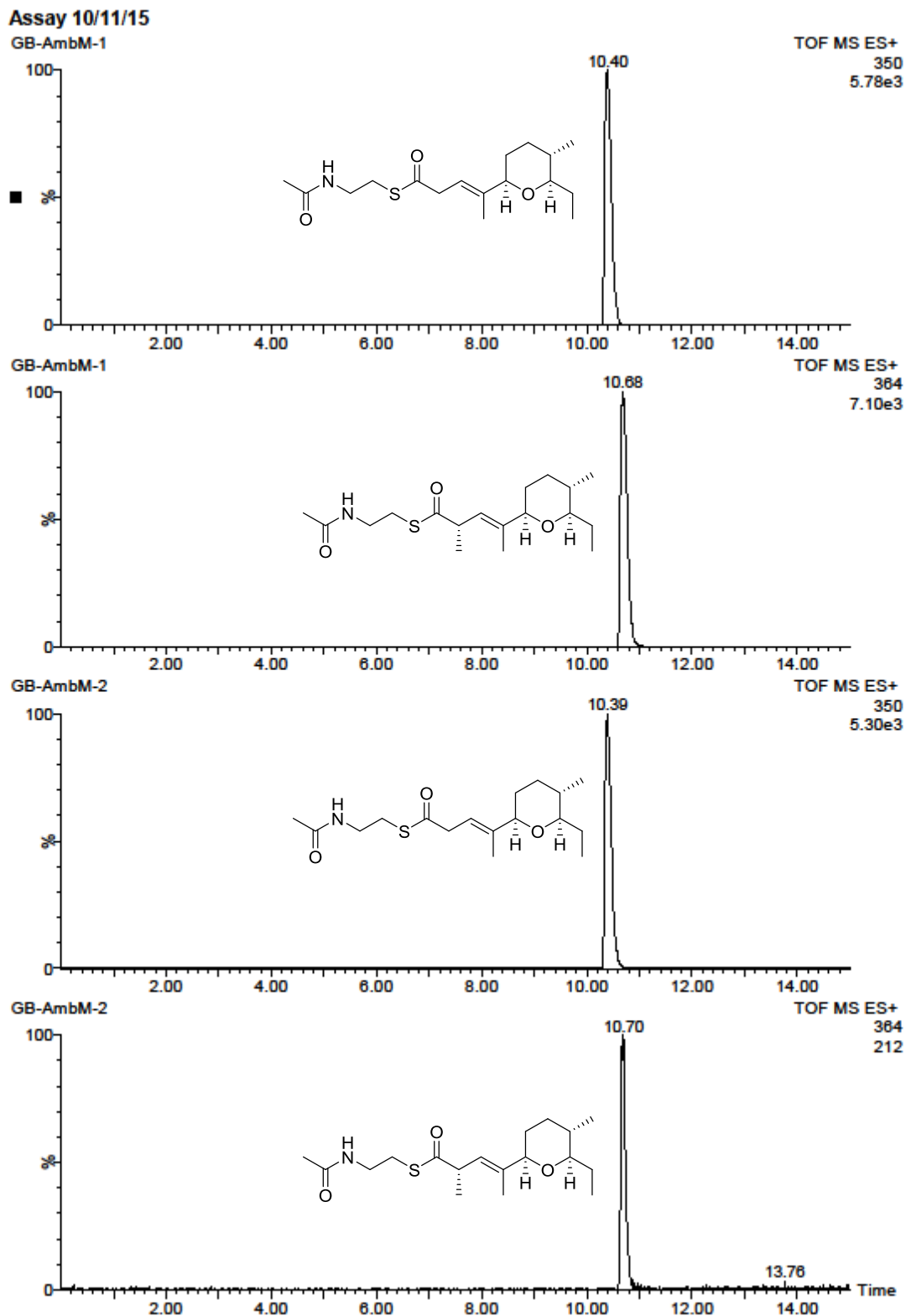


Abbildung A15: HPLC-MS Analyse der Enzymaktivitätstests mit **149**. a) Über Nacht Inkubation von **149** mit His₆-AmbM und SAM, Massenspur für M = 350; b) Über Nacht Inkubation von **149** mit His₆-AmbM und SAM, Massenspur für M = 364; c) Über Nacht Inkubation von **149** mit His₆-AmbM ohne SAM, Massenspur für M = 350; d) Über Nacht Inkubation von **149** mit His₆-AmbM ohne SAM, Massenspur für M = 364; [M+Na]⁺ (**149**) = 350, [M+H]⁺ (**150**) = 364; x-Achse: Retentionszeit, y-Achse: relative Intensität.

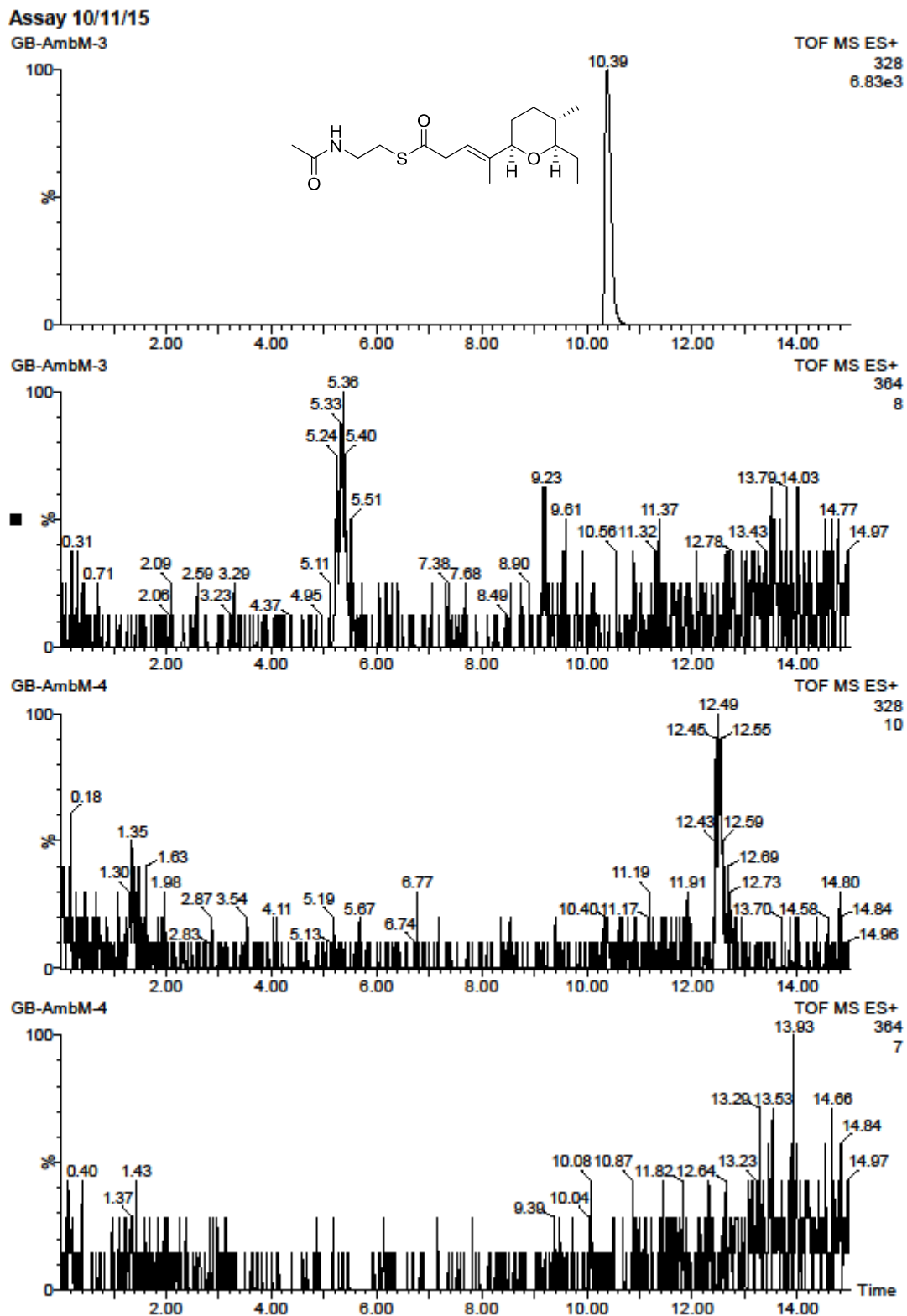


Abbildung A16: HPLC-MS Analyse der Enzymaktivitätstests mit **149**. a) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **149** mit SAM, Massenspur für M = 328; b) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **149** mit SAM, Massenspur für M = 364; c) Über Nacht Inkubation von reinem His₆-AmbM, Massenspur für M = 328; d) Über Nacht Inkubation von reinem His₆-AmbM, Massenspur für M = 364; [M+H]⁺ (**149**) = 328, [M+H]⁺ (**150**) = 364; x-Achse: Retentionszeit, y-Achse: relative Intensität.

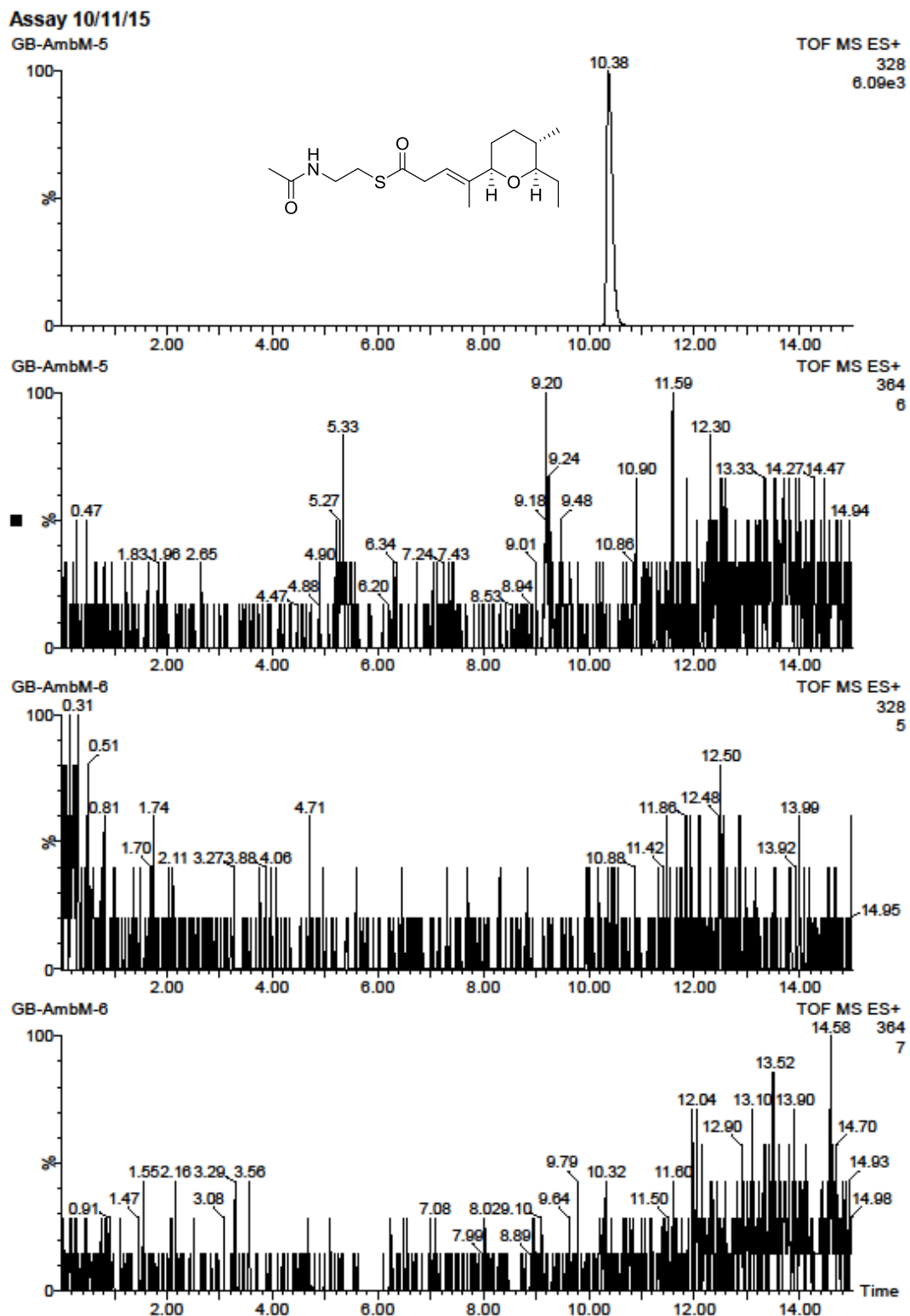
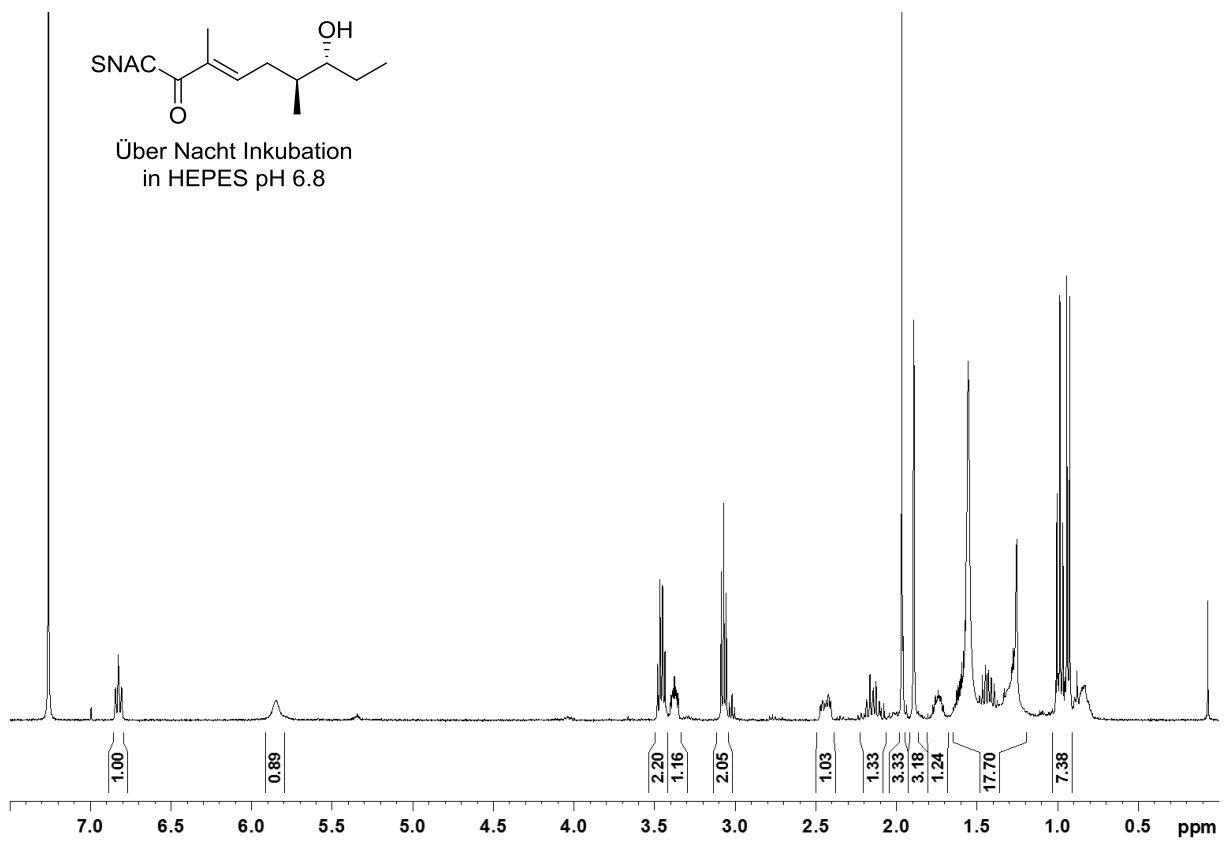
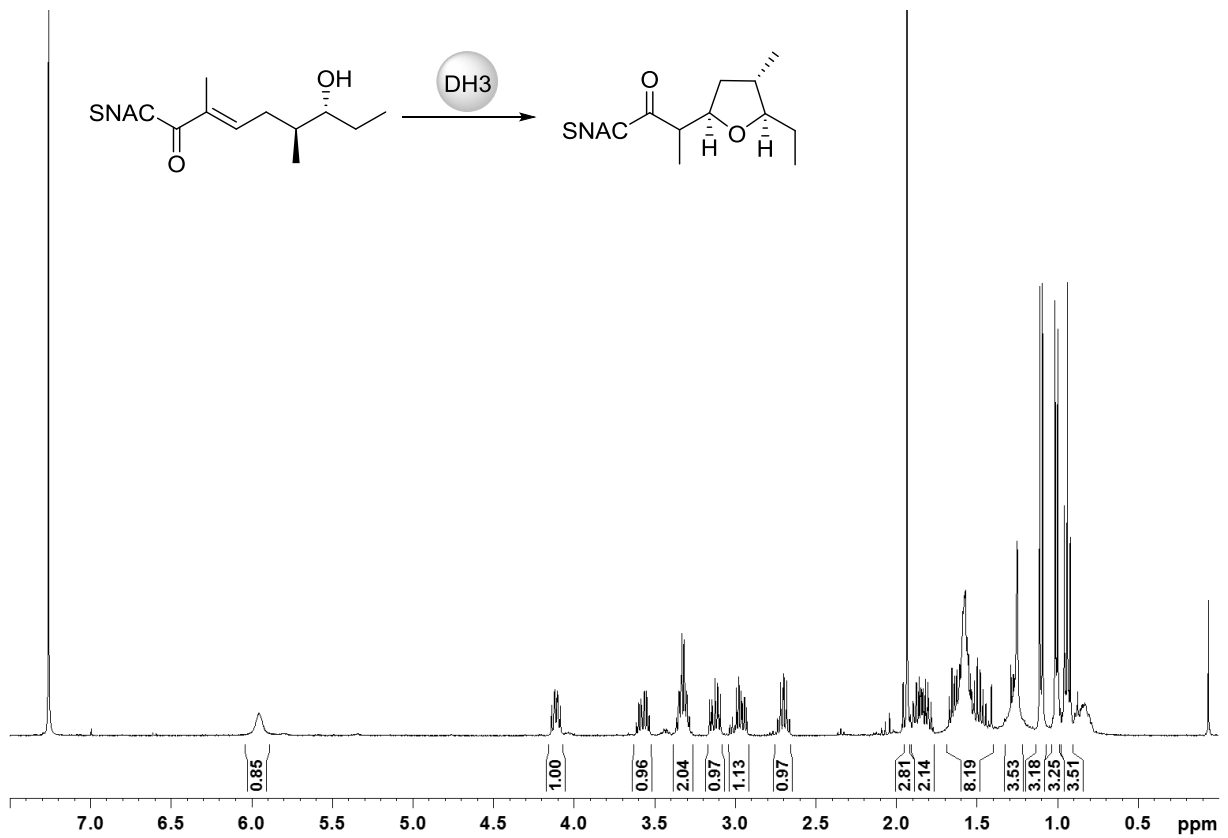
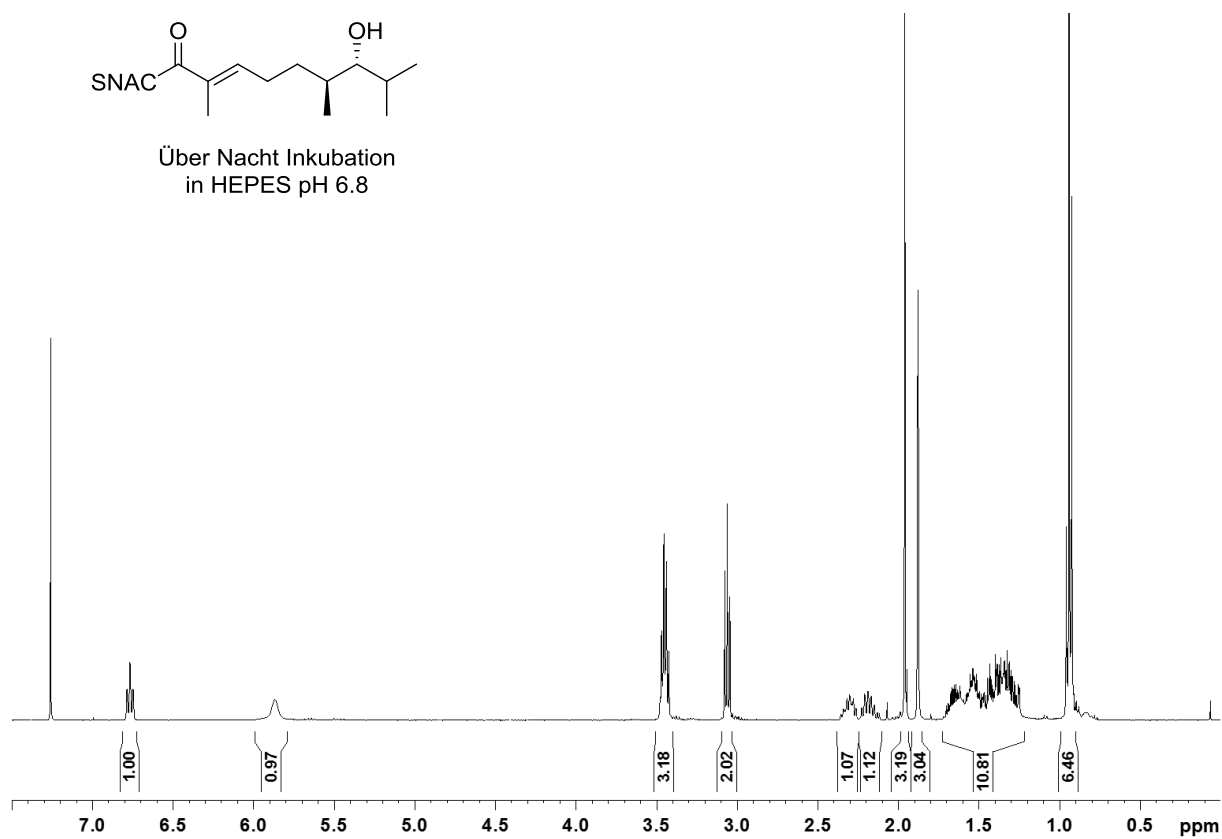
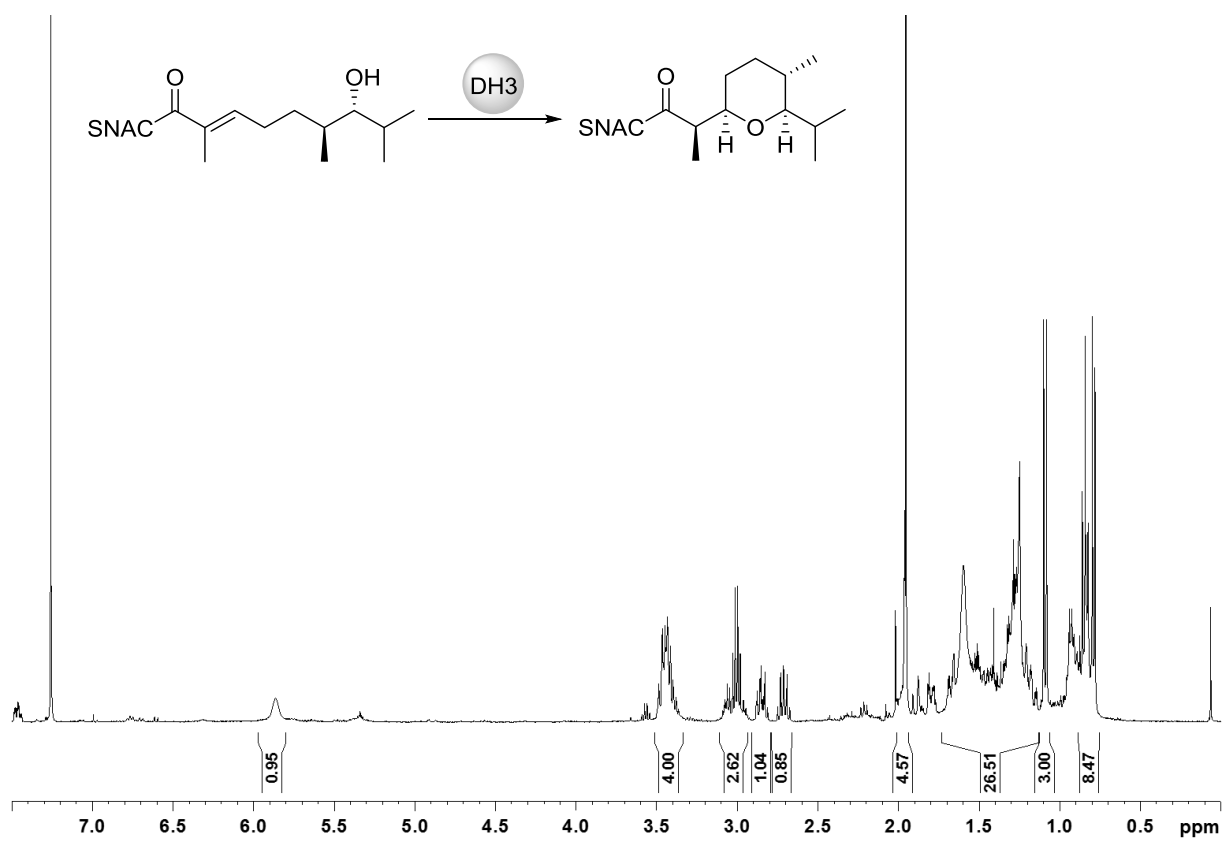
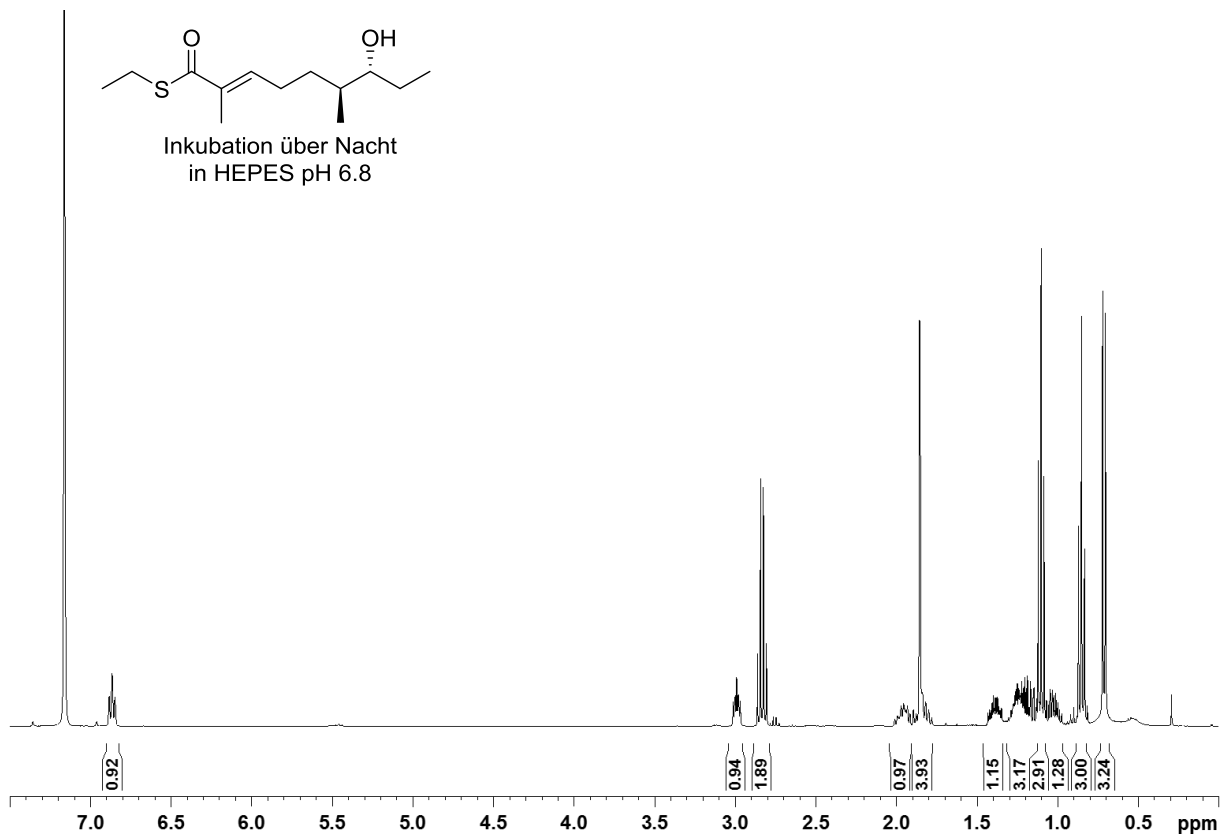
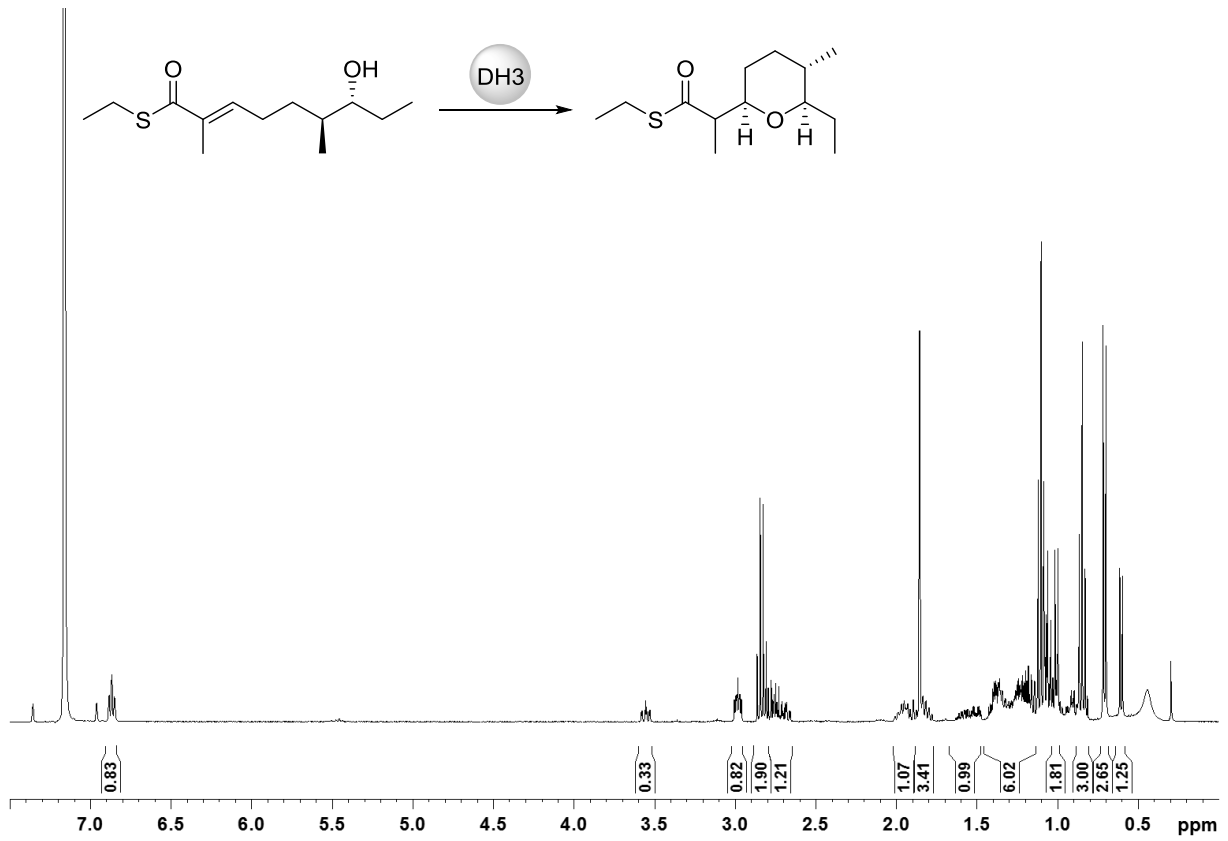


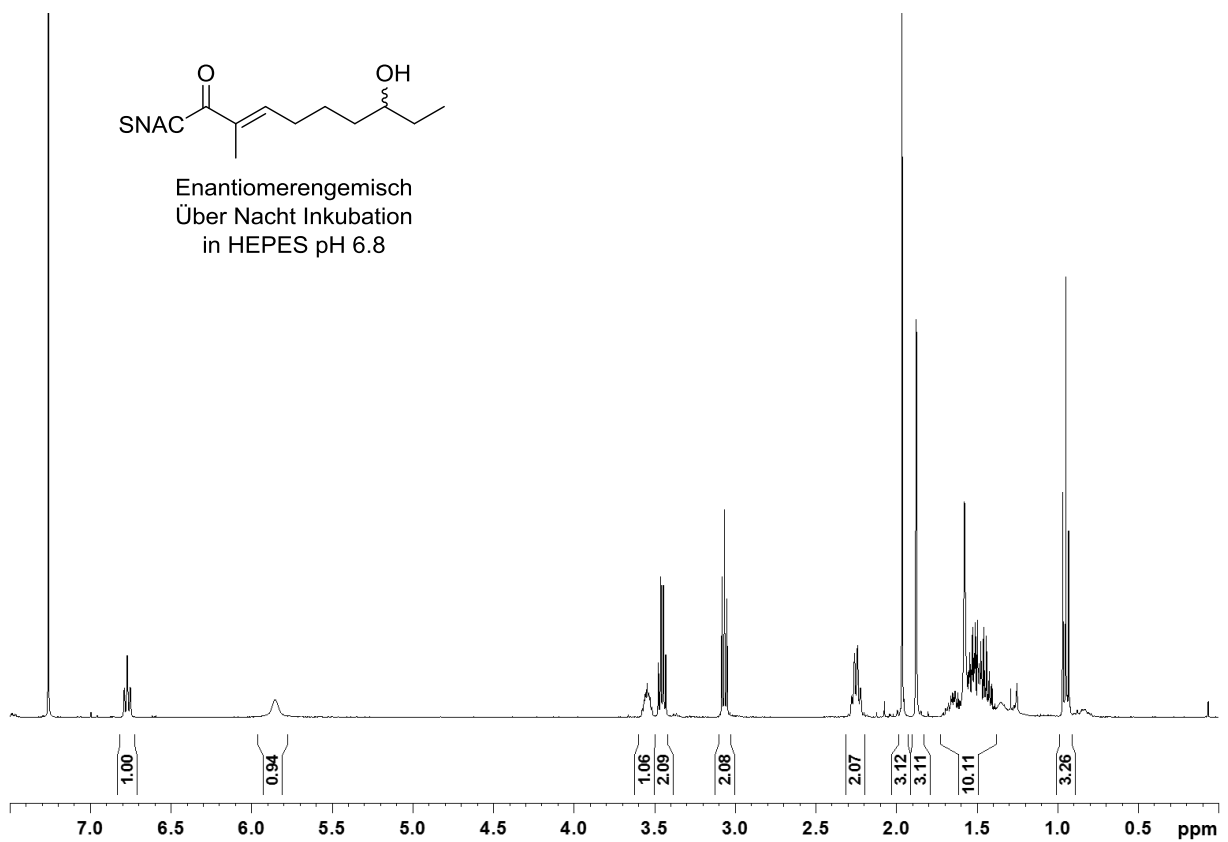
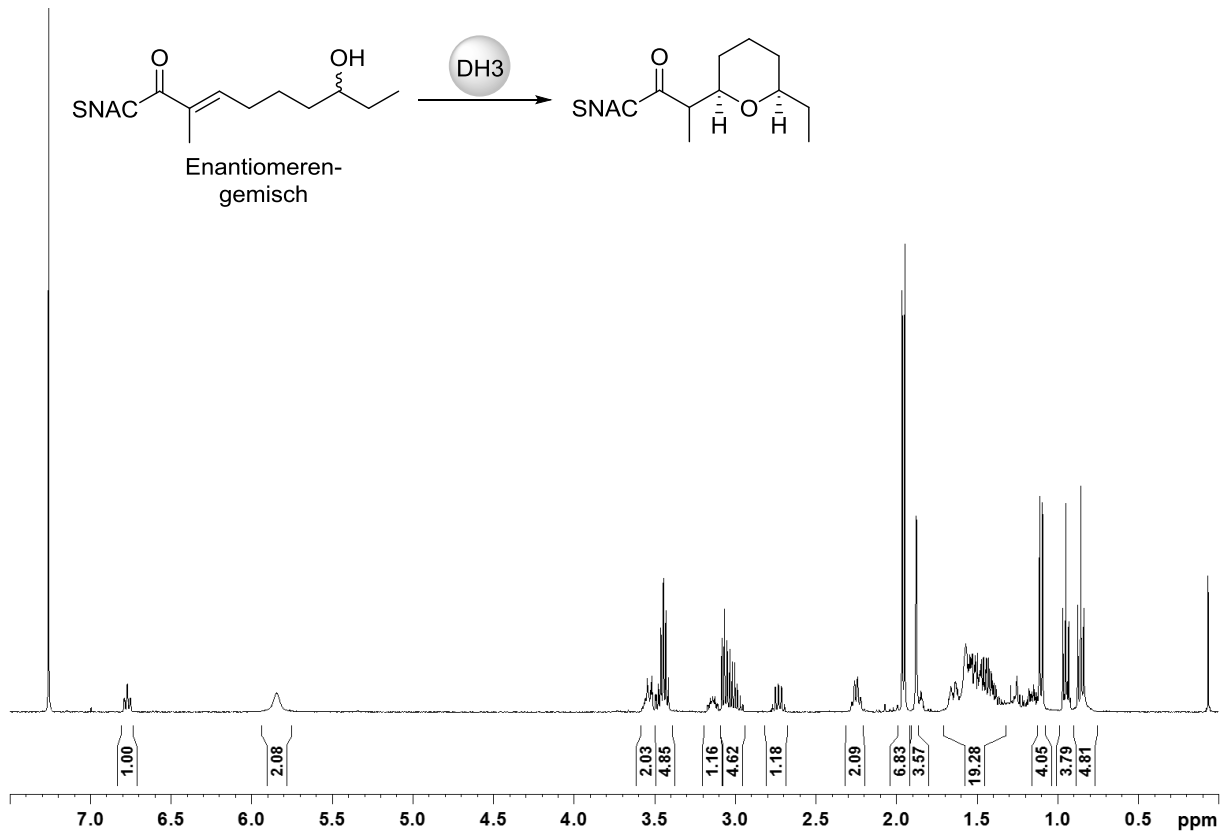
Abbildung A17: HPLC-MS Analyse der Enzymaktivitätstests mit **149**. a) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **149**, Massenspur für $M = 328$; b) Enzym-freie über Nacht Inkubation von **149**, Massenspur für $M = 364$; c) Über Nacht Inkubation von SAM, Massenspur für $M = 328$; d) Über Nacht Inkubation von SAM, Massenspur für $M = 364$; $[M+H]^+$ (**149**) = 328, $[M+H]^+$ (**150**) = 364; x-Achse: Retentionszeit, y-Achse: relative Intensität.

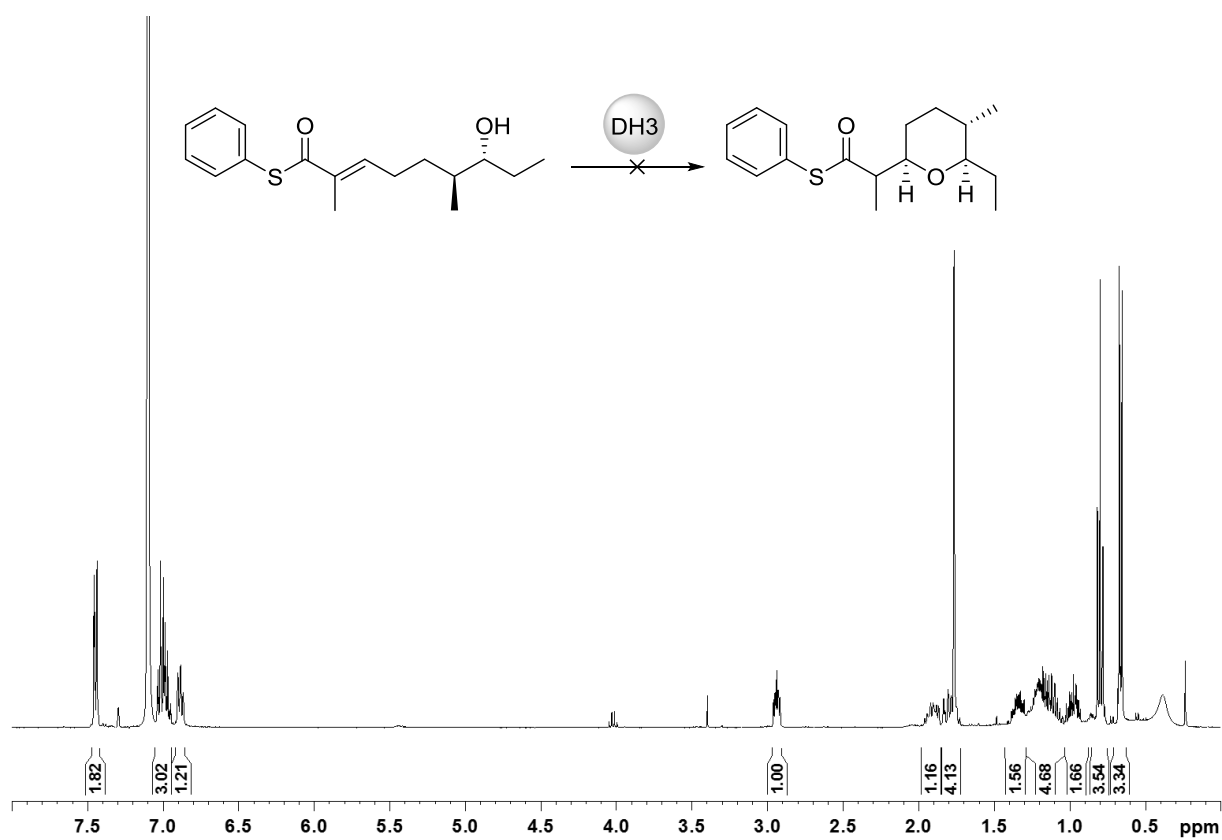
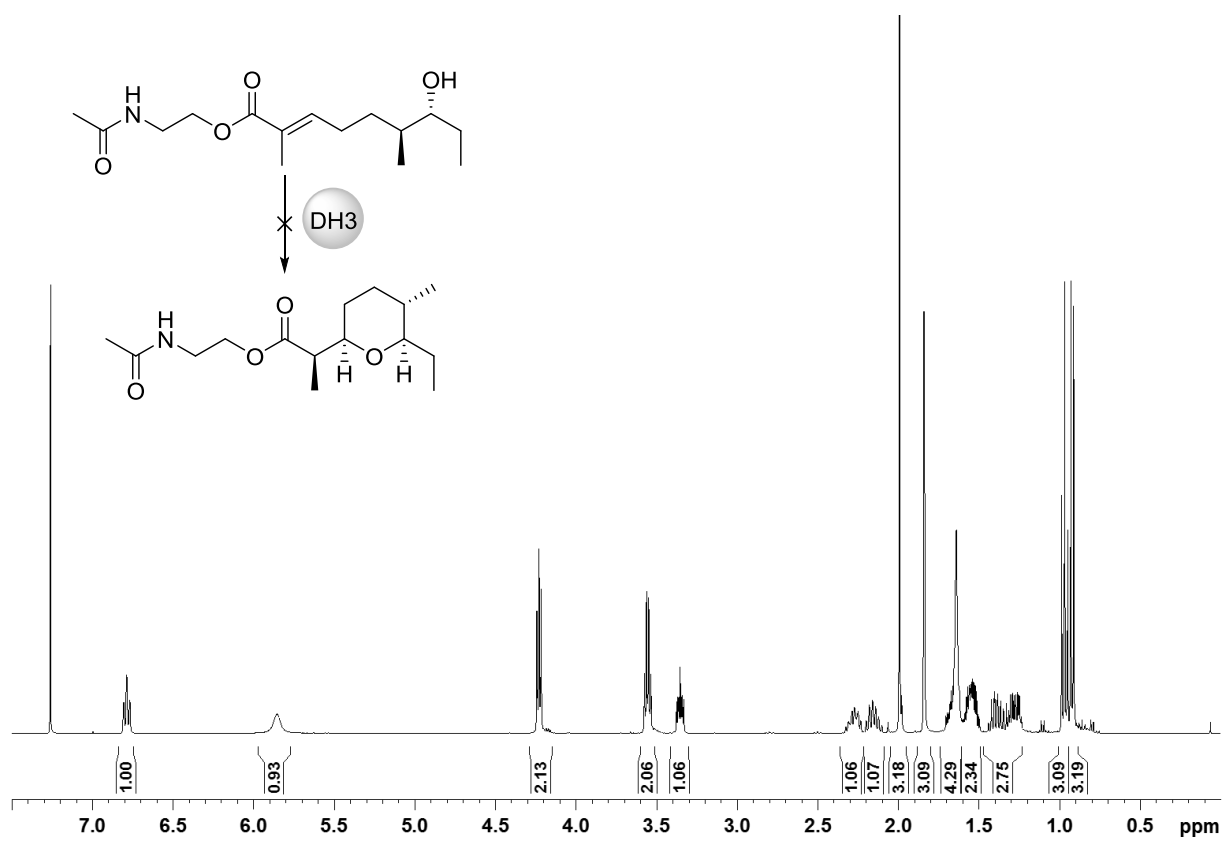
7.4 Etablierung der Dehydratase-Domäne AmbDH3 als chemoenzymatisches Werkzeug

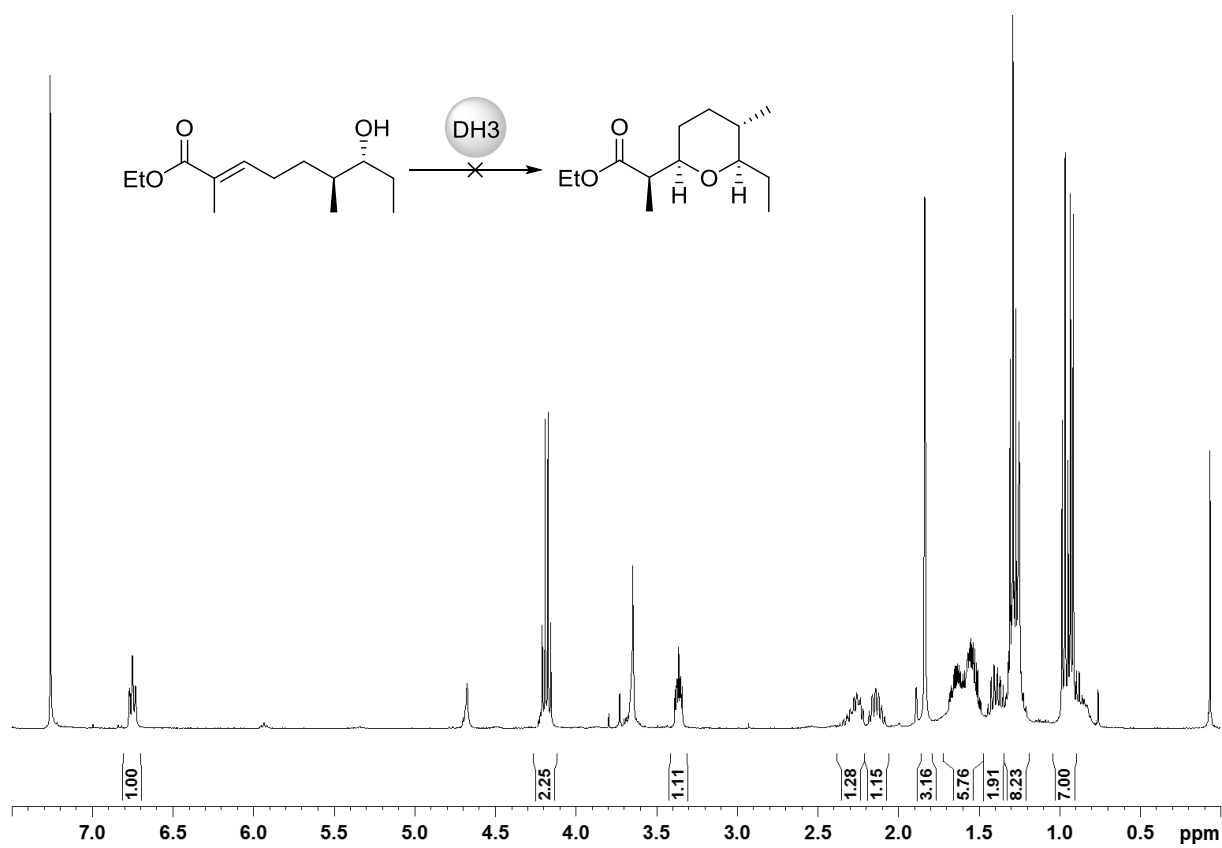
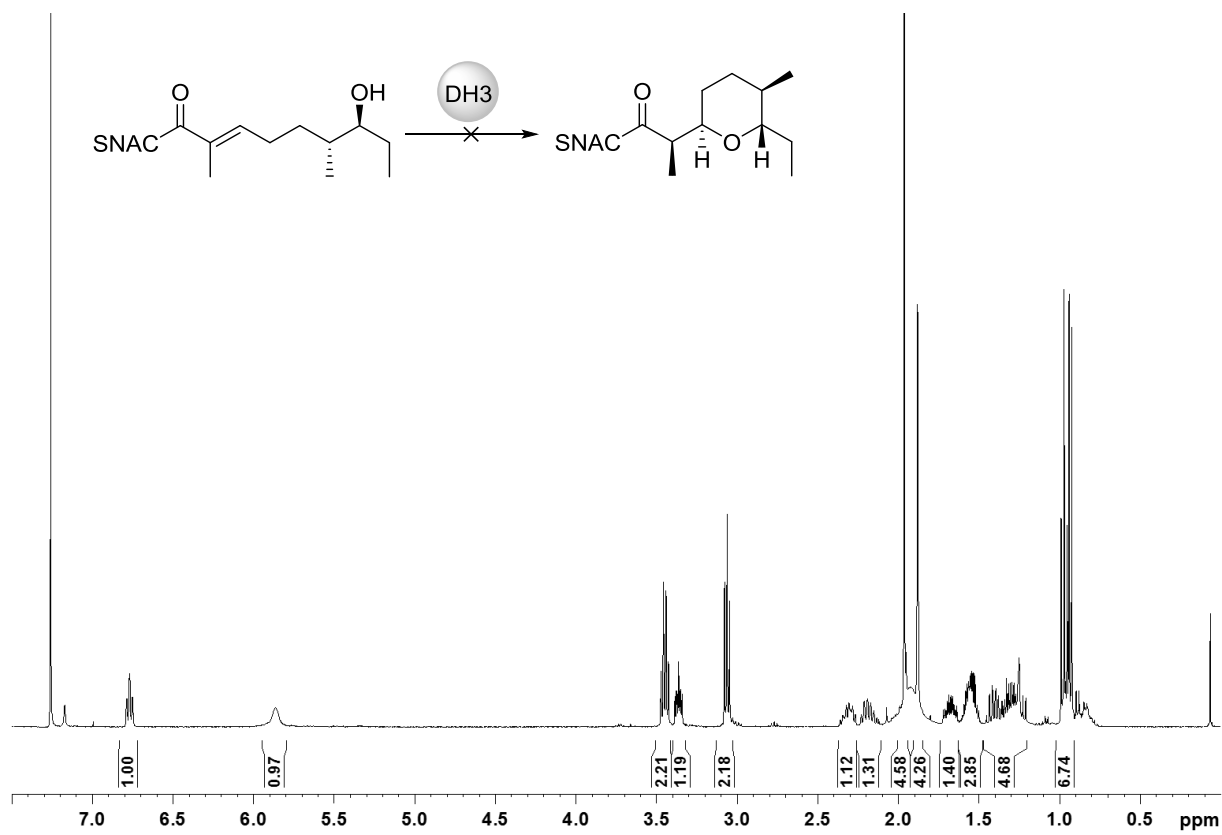


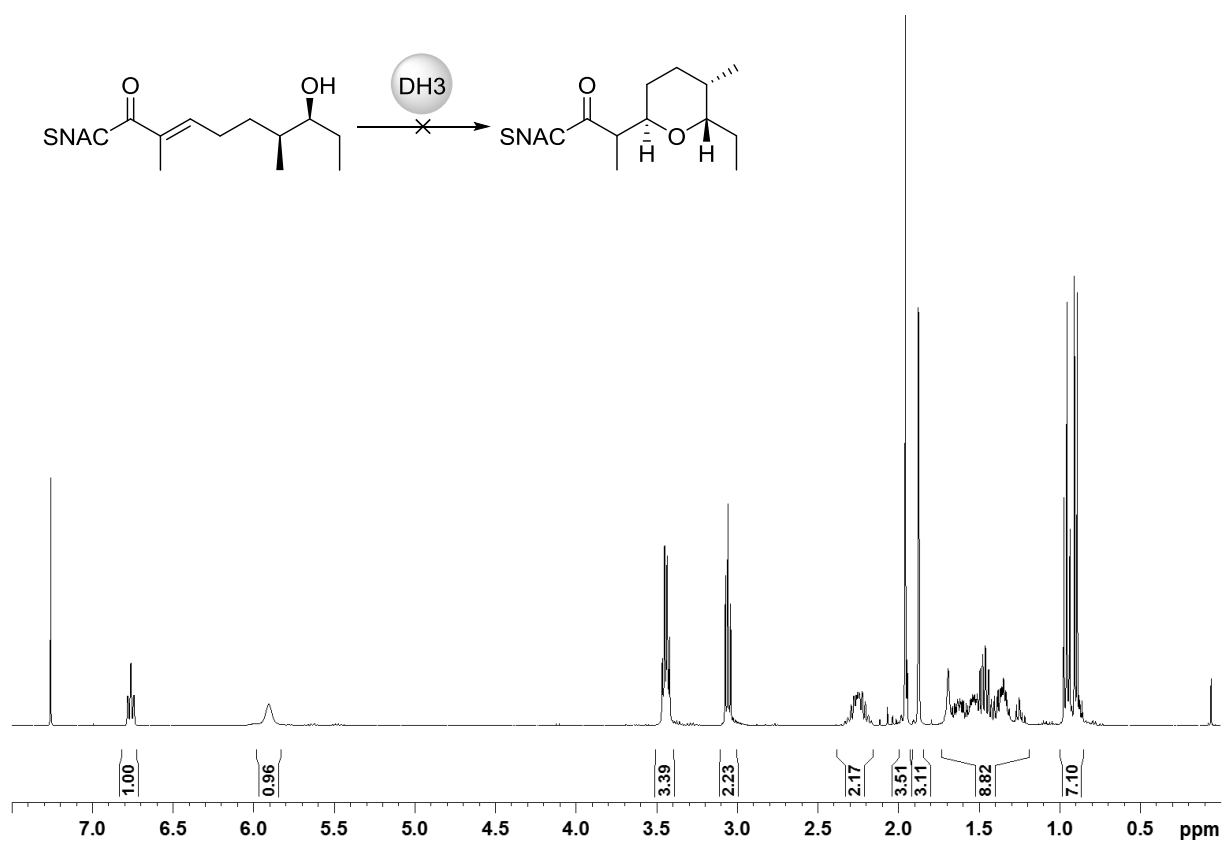












7.5 Synthetische Gene

>AmbDH3

```
GAAGCACCGCGTGGTTCGTGCAGGTCTGAAAGCGGTGGTCTGCTGGCAGTTAAACATCCGTG
GCTGAGCGCAGCAGTTTCGTCTGGCAGATCGTGATGGTTATGTTCTGAGCGGTTCGTCTGAGCA
CCGTTGAACATGCATGGGTTCTGGATCATGTTGTTCTGGGCACCGTTATTCTGCCTGGCACC
GCATTTGTTGAACTGGCACTGGCAGCAGCAGATGCAGTTGGTCTGCCGAGCGTTAGCGAACT
GACCATTGAAGCTCCGCTGGCACTGCCTGCACGTGGTGCAGTTACCCTGCAGGTTACCGTTG
AAGCACTGGATGCAACCGGTTCGTTCGTGGTTTTGCAGTTCATAGCCGTCCGGATGGTGCCCAT
GATGCACCGTGGACCGCACATGCCCGTGGTGTCTGGGTGCAGCACCGGCAGCTGCAACCAC
CGCATGGGCAGCTGGTGCATGGCCTCCGGCTGGTGCAGAACCGGTTGATGTTACCGGTTGGG
TGGAAGCCCTGGACGCATGGGTTGGTCCGGCATTTCGTGGTGTACC CGCAGCATGGCGTGTT
GGTCGTAGCATTTATGCAGATCTGGCCCTGCCGGAAGGTGTGAGCGAACGTGCACAGGATTT
TGGTCTGCATCCGGCACTGCTGGATGCCGCACTGCAGGCCCTGCTGCGTGCCGAACTGGGTG
CCGGTAGCAGTCCGCGTGAAGGTATTCCGATGCCGTTTGCATGGTCAGATGTTGCACTGGAA
GCGCGTGGTGCCGCAGCACTGCGTGCCCGTGTGAAGTTGAAGATGCAAGTGATGGTGATCA
GCTGGCAGCAAGCATCGAACTGGCAGATGCACAGGGTCAGCCGGTTGCACGTGCCGGTACAT
TTCGTGCACGTTGGGCAACCGCAGAACATGTGCGTAAAGCAGCAGCGGGTGCAAGTGAACGT
GATTAA
```

>AmbDH4

```
CAGGCACCGCGTCCGCGTCCGTCCTGGAAGGTGTTGGCCTGACAGCAGCAAATCATCCTTG
GCTGGGTGCAGCCGTTTCGTCTGGCGGATCGTGACGGTTATGTTCTGAGCGGTTCGCTGAGTA
CCCTGGATCATCCGTGGGTACTGGATCATGTTGTTGCCGGTACAGTTATTCTGCCAGGTACA
GCATTTGTTGATCTGGCGTGGGCTGCTGCGGAAGTTGTTGGTGCGGCAGCGGTTAGCGAAGT
TACCTTTACCACCCCTCTGGTTCTGCCCTCCGCGTAGCGTTGTGGAAGTGCAGGTTTCGTATTG
GTGAACCGGATGCGAGCGGTTCGTTCGTACCTTTGCAGCATATAGCCGTCCGGATGCGGCAAGC
GAAGCCGAATGGACCCAGCATGCCACCGGTGTGCTGAGCGCACAAGCTGCCGCAGGGGCAGA
TGTGCGGATCTGAGCGTTTGGCCTCCTCCGGGTGCCGAAGTGGTTGCGCTGGATGGTGGTT
ATGCGTGGCTGGCAGCACAGGGTTATGGTTATGGTCTGCGTTTTAGGCGCTGCGTGAAGTT
TGGCGTGCAGGTACAACGCTGTATGCGCGTGTGCCCCTGCCCTGATGCCGTTGCAGATACCGC
ACAGTCATTTGGTATTCATCCTGCCCTGCTGGACGCCGTGCTGCATAGTCTGCTGGCACGTT
CACCGCAAGAAGAAGCCAGCGACGACGATAAAGTTCTGCTGGCCTTTGCATTTAGTGATGTT
GTTATTGAAGCGCGTGGTGCAGCGGAAGTTTCGTGTTTCGTCTGAATAAACAAGCCGGTGATGA
TGGTGAAGGCCTGACCGCAAGCATTTCATCTGGCCGATGCACAGGGTCGTCCGGTTGCCCGTG
TTGGTGCATTCAGGCACGTGCAACCACCACCGAACGTTTCGTGCTCTGGCTGGTGCCAGC
GAACGTGAT
```

>AmbM

```
ATCTGCTTTGTTCCGGCACTGCGTTCGTATGGGTGCAACACCGGCACGTATTTGTATGCGTCA
GCGTCTGGATGTTACCGATCTGTATAATGATGCATATACCGCCTATATTGAAGCCTTTTCGTG
GTCAGACCGAACTGGTTGCAAGCGAAATTCGTGGAACATCTGGTTGATCAGAGCGGTGCA
GTTTCAGGTTCTGGATGATCGTCCGGAAAGCGCACCGAGCGTTACCGCATATCAGTTTTCGTG
TAAACTGCTGGATTATTTTCAGCGATAAAGGTGATCTGATTCAGGATCCGAGCGGTCTGCTGG
TTCCGAGCGAAGCAGTTTCGTAAACGTGTTGCAGAACGTTGAAGCAATGGAAGTGGCAGATCGT
```

GCAATTCTGGGTGAAATGGTTGAATTTCTGCAGCGTTATCGTGGTCTGGCAGGTCCGGTGCT
GGCAGGTAAAGATGCACTGGCAACCATGGATCTGCAGTATGGTATGCAGGCAAGCCTGAAAT
TTTGGGAATATAGCATGATTAGCCTGCCTGCAAAAAACCGTGTAATGTTATGCTGGCACGT
GCACTGATGGCAAAACTGGCCGAAGGTCCGGGTATTAGCGTTTTTTGAAGGTGGTGCAGGTCT
GGGTGTTGTTCTGCGTCAGGCACTGAGCGATCCGCGTTTTCTGCCGCTGAGCCGTAATCTGG
TTCGTTATGATTATAACCGATATTAGCGCACTGCTGATGGAAACCGGTAAACAGTGGCTGCGT
ACCCATGCACCGGCAGACCTGTTTCAGCGTATTCATTTTCAGCGCCTGGATCTGGATGCACT
GCCGAGCGCAGGTAATACCTTTGCCCGTGCAGCAAGCGTGGATCTGATTGTTCTGGAACATG
TGCTGTATGATGTTTCGTGATCTGCATGCAACCCTGCAGGCATTTTCATACCATGCTGAAACCG
GGTGGTCAGCTGGCATTACCATGAGCTTTCGTGATCGTCCTGGTCTGTTTTTTCCGAACGA
ATTTTTTCAGAGTATGCTGCACACCTACAGCAAAGCCAAACTGGATCCTCCGCGTCGTCAGC
ATGTTGGTTATCTGACCCTGCAAGAATGGGAACTGAGCCTGCGTGCAGCAGTTTTAGCGAA
TGGGAAGTTTATCCGGCACCGGAAGATCATGAAAATGGCCGTTTGGTGGTATTGTTGCATA
TCGTTA

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Frank Hahn für die gute Betreuung und die sehr interessante Aufgabenstellung bedanken. Herrn Prof. Dr. Andreas Kirschning danke ich für die Übernahme des Korreferats und für die Eingliederung in seinen Arbeitskreis und die damit verbundene Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Dr. Gerald Dräger danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und Geduld bei analytischen Problemen.

Bei den Mitarbeitern der Analytik-Abteilung Dr. Jörg Fohrer, Monika Rettstadt, Dagmar Körtje, Roswitha Reichel und Anne Schulz bedanke ich mich für das stetige Engagement. Ebenfalls möchte ich mich bei den technischen Mitarbeitern des BMWZ und OCI bedanken. Ein besonderer Dank gilt Katja Körner für die Ermöglichung von reibungslosen Arbeitsabläufen im BMWZ. Dem Sekretariat, im besonderen Frau Monika Griese, Frau Kristina Struckmeier und Frau Ines Rohloff, danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft bei sämtlichen organisatorischen Dingen.

Dr. Christian Merten danke ich für die Messungen der VCD-Spektren.

Für die Korrektur dieser Arbeit danke ich Dr. Sascha Ceylan, Dr. Steffen Friedrich, Raissa Schor, Karen Lebe, Hendrik Geise und Janna Ehlert.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen aktuellen und ehemaligen Laborkollegen Dr. Nadine Kandziora, Dr. Steffen Friedrich, Dr. Jekaterina Hermene, Anja Heutling, Hendrik Geise, Franziska Hemmerling und Frederick Lindner. Bei den anderen Hähnchen sei es als Kollegen oder Masterstudenten Marius Schröder, Karen Lebe, Timm Ensfelder und Anna-Louisa Warnke möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Dem gesamten AK Kirschning danke ich für die herzliche Aufnahme und die Integration bei allen sozialen Events. Im Einzelnen möchte ich mich besonders bei Dr. Gerrit Jürjens, Egor Geist und Jonas Ammermann bedanken.

Im speziellen Danke ich Steffen für die vielen gemeinsamen, sehr unterhaltsamen Jahre im Labor und die vielen fachbezogenen und fachfremden Diskussionen. Nadine danke ich für das ständige „auf dem Laufenden“ halten. Anja möchte ich für die zahlreichen unterhaltsamen Wein-lastigen Grey's Anatomy Abende danken. Für die angenehmen und unterhaltsamen Kaffeepausen möchte ich Raissa und Karen danken. Bei Karen möchte ich mich ebenfalls für den Ansporn und das gemeinsame Training für den Halbmarathon bedanken - nächstes Jahr wieder. Franziska danke ich für den großen Zusammenhalt besonders als „Überbleibsel“ am Ende der AK Hahn Zeit in Hannover.

Meinen Eltern und meinen Geschwistern danke ich von Herzen für die jahrelange Unterstützung während meines gesamten Studiums. Ein ganz spezieller Dank gilt Sascha nicht nur für die zahlreichen fachlichen Diskussionen, sondern im Besonderen für den stetigen Rückhalt, das Pläne schmieden und die bedingungslose Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum und-ort	30.12.1988 in Neustadt a. Rbge, Deutschland
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Akademischer Werdegang

05/2013 – 10/2016	Promotionsstudentin an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Institut für Organische Chemie, Hannover, Forschungsgruppe: Prof. Dr. F. Hahn, Untersuchung von Schlüsselenzymen aus der Ambruticin-Biosynthese und deren Nutzbarkeit für die chemoenzymatische Synthese, Gesamtprädikat: Auszeichnung
10/2010 – 04/2013	Masterstudiengang: Naturstoff- und Wirkstoffchemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover, Note: 1.5 Masterarbeit: <i>In vitro</i> Studien zur Biosynthetischen Bildung des Ambruticin Ostfragments (Forschungsgruppe: Prof. Dr. F. Hahn, Note: 1.0, Institut für Organische Chemie)
10/2011 – 06/2012	Forschungspraktikum (DAAD Stipendium) an der Stanford Universität (CA, US), Forschungsgruppe: Prof. Dr. E. Kool, <i>Synthesis of Size Expanded xDNA Bases and Synthesis of New Quencher for Application in Click Chemistry</i>
10/2007 – 10/2010	Bachelorstudiengang: Chemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover, Note: 2.2 Bachelorarbeit: Nanoporöse Filme für das kontrollierte Drug Delivery von Antibiotika (Forschungsgruppe: Prof. Dr. P. Behrens, Institut für Anorganische Chemie, Note: 1.3)
1998 – 2007	Abitur , Kooperative Gesamtschule Neustadt am Rübenberge, Note: 2.0

Stipendien und zusätzliche Qualifikationen

08/2015	129 th BASF International Summer Course
10/2014 – 06/2015	<i>Promotion plus+ qualifiziert</i> , Graduierten Akademie Hannover (Projektmanagement, Personalmanagement, Teamführung, unternehmerisches Handeln und strategisches Denken)
05/2013 – 05/2016	Promotionsstipendium , Graduiertenkolleg Mikrobielle Naturstoffe
10/2011 – 06/2012	DAAD Stipendium für einen Forschungsaufenthalt an der Stanford Universität (US)

Lehrveranstaltungen

05/2013 – 02/2016	Betreuung von Bachelorarbeiten, Fortgeschrittenen- und Forschungspraktika
-------------------	---

07/2011	Betreuung des allgemeinen Chemiepraktikums für Pflanzenbiotechnologie- und Gartenbaustudenten
09/2010 – 09/2011	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Anorganische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität
04/2010 – 05/2010	Betreuung des fortgeschrittenen Praktikums in Organischer Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität

Veröffentlichungen

G. Berkhan, C. Merten, C. Holec, F. Hahn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13589-13592; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 13787-13790.

G. Berkhan, F. Hahn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14240-14244; *Angew. Chem.* **2014**, *53*, 13947-13963.

G. Berkhan, Best Masters – Biosynthetische Bildung des Ambruticin Ostfragments, Springer Spektrum, **2015**.

Ausgewählte Posterpräsentationen

“*In vitro Studies on the Biosynthesis of the Eastern Fragment of Ambruticin*“, 1st European Conference on Natural Products, Frankfurt, Deutschland, **2013**.

“*In vitro Investigation of Pyran Formation in Ambruticin Biosynthesis*“, 26. Irseer Naturstofftage, Irsee, Deutschland, **2014**.

“*In vitro Investigations on the Pyran Formation in the Ambruticin Biosynthesis*“, ORCHEM, Weimar, Deutschland, **2014**.