

Untersuchungen zur Biosynthese von Polyketiden

-

Studien zur *in-vitro*-Aktivität der *Tailoring*-Enzyme aus der Jerangolid-Biosynthese

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation
von
M. Sc. Steffen Christoph Friedrich

geboren am 08.05.1986 in Cottbus

2016

Referent: Prof. Dr. Frank Hahn

Koreferent: Prof. Dr. Andreas Kirschning

Tag der Promotion: 11.03.2016

Gewidmet meinem Vater
Christoph Friedrich
(1941-2010)

Untersuchungen zur Biosynthese von Polyketiden

-

Studien zur *in-vitro*-Aktivität der *Tailoring*-Enzyme aus der Jerangolid-Biosynthese

Schlagworte: Jerangolide, Polyketid-Biosynthese, Biokatalyse

Jerangolide sind polyketide Naturstoffe, die von Myxobakterien *Sorangium cellulosum* So ce 307 gebildet werden. Zusammen mit den strukturell verwandten Ambruticinen stellen sie potentielle Leitstrukturen für antifungale Wirkstoffe dar. Charakteristische Struktur motive der Jerangolide werden am Ende der Biosynthese durch eine Thioesterasedomäne und vier *Tailoring*-Enzyme eingeführt.

Die vorliegende Arbeit zielt auf eine *in-vitro*-Rekonstitution dieser späten Schritte der Jerangolid-Biosynthese ab. Zu diesem Zweck wurde die Thioesterase-Di domäne JerE7(TE) und die SAM-abhängige *O*-Methyltransferase JerF in *E. coli* BL21(DE3) heterolog exprimiert und für Aktivitätstests mit geeigneten Substraten verwendet.

Für die Untersuchung von JerE7(TE) wurden offenkettige β -Ketothioester **78**, **84** und **88** durch verschiedene Synthesewege dargestellt. Die *in-vitro*-Aktivitätstests mit JerE7(TE) und **78**, **84** und **88** führten unter den getesteten Reaktionsbedingungen zu einer spontanen Zyklisierung der Substrate, sodass eine eingehende Untersuchung der biokatalytischen Aktivität nicht erfolgen konnte.

Für die Untersuchung von JerF wurden verschiedene 3-Oxo- δ -Lactone **111**, **101a** und **101b** dargestellt. Die erfolgreichen *in-vitro*-Aktivitätstests mit **101a** und **101b** bestätigten die zuvor postulierte Funktion von JerF innerhalb der Jerangolid-Biosynthese. Aufgrund der dadurch gewonnenen Ergebnisse lassen sich erste Aussagen über die Substrattoleranz von JerF treffen. Dies ist die bisher erste Charakterisierung einer SAM-abhängigen *O*-Methyltransferase, welche regioselektiv zyklische Ketone in nicht-aromatische Methyl-Enolether umsetzt.

Abstract

Investigations on polyketide biosynthesis

-

Studies on the *in vitro* activity of the tailoring enzymes from the jerangolid biosynthesis

Key words: jerangolids, polyketide biosynthesis, biocatalysis

Jerangolids are polyketide natural products produced by myxobacteria *Sorangium cellulosum* So ce 307. The jerangolids and the structural related ambruticins show antifungal activity and therefor represent potential lead structures. Characteristic molecular features of the jerangolids are generated at the very end of their biosyntheses by the thioesterase domain and a total of four tailoring enzymes.

This work aims at the chemoenzymatic reconstitution of the late stages of the jerangolid biosynthesis *in vitro*. For this reason, both the thioesterase containing domain JerE7(TE) and the SAM-dependent *O*-methyltransferase JerF were heterologously expressed in *E. coli* BL21(DE3) and processed for further assaying with suitable substrates.

For the investigation of JerE7(TE), different open-chain β -keto thioesters **78**, **84** and **88** were synthesized by different routes. The *in vitro* assays with JerE7(TE) and **78**, **84** and **88** lead to a spontaneous cyclization of the substrates under the applied reaction conditions, preventing further biocatalytic investigations.

For the investigation of JerF, different 3-oxo- δ -lactones **111**, **101a** and **101b** were synthesized. The successful assays with JerF and **101a** und **101b** experimentally support the previously postulated role of JerF within the jerangolid biosynthesis. JerF could be identified as a substrate-tolerant enzyme with unprecedented *in vitro* activity, capable to regioselectively methylate cyclic ketones to yield non-aromatic methyl enol ethers.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Naturstoffchemie – Motivation und Herausforderungen	1
1.2	Ansätze zur Gewinnung neuartiger Naturstoffe	4
1.3	Jerangolide	21
2	Zielsetzung	24
3	Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse	26
3.1	Molekularbiologische und enzymologische Arbeiten	26
3.2	Synthetische Arbeiten.....	44
3.3	Enzymaktivitätstests	61
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	70
4.1	Molekularbiologische Arbeiten	70
4.2	Synthetische Arbeiten.....	71
4.3	Enzymologische Arbeiten.....	73
5	Experimenteller Teil	75
5.1	Methoden.....	75
5.2	Material.....	89
5.3	Synthesevorschriften	102
6	Literaturverzeichnis.....	141
7.	Anhang.....	151
7.1	Spektrenanhang.....	151
7.2	Synthetische Gene	191
	Lebenslauf	195
	Danksagung	197

Abkürzungsverzeichnis

(S)-Tol-BINAP	(S)-(-)-2,2'- <i>para</i> -tolyl-phosphino)-1,1'-binaphthyl
18-Krone-6	1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecan
6-APA	6-Aminopenicillansäure
A	<i>Absorbance</i> (Extinktion)
ACP	<i>Acyl carrier protein</i>
ADMET	<i>Adsorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AHBA	<i>Aminohydroxybenzoic acid</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Äq.	Äquivalent
AS	Aminosäure
AT	Acyltransferase
ATP	Adenosinriphosphat
Au	<i>Arbitrary unit</i> (willkürliche Maßeinheit)
AVES	Avermectin-Synthase
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
BINOL	1,1'-Bi-2-naphthol
BSA	Bovines Serumalbumin
Bu	Butyl
CAPS	<i>N</i> -Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
Csp	<i>Cold shock protein</i>
Cy	Cyclohexyl
Da/kDa	Dalton/Kilodalton
DEBS	6-Desoxyerythronolid-B-Synthase
DH	Dehydratase
DIBAL-H	Di- <i>isobutyl</i> aluminiumhydrid
DIPEA	Di- <i>isopropyl</i> ethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMP	DESS-MARTIN-Periodinan
DMPU	1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1 <i>H</i>)-pyrimidinon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dr	<i>Diastereomeric ratio</i>
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ee	<i>Enantiomeric excess</i>
ER	Enoylreduktase
ESI	<i>Electrospray Ionisation</i>
Et	Ethyl
EtOAc	Essigsäureethylester

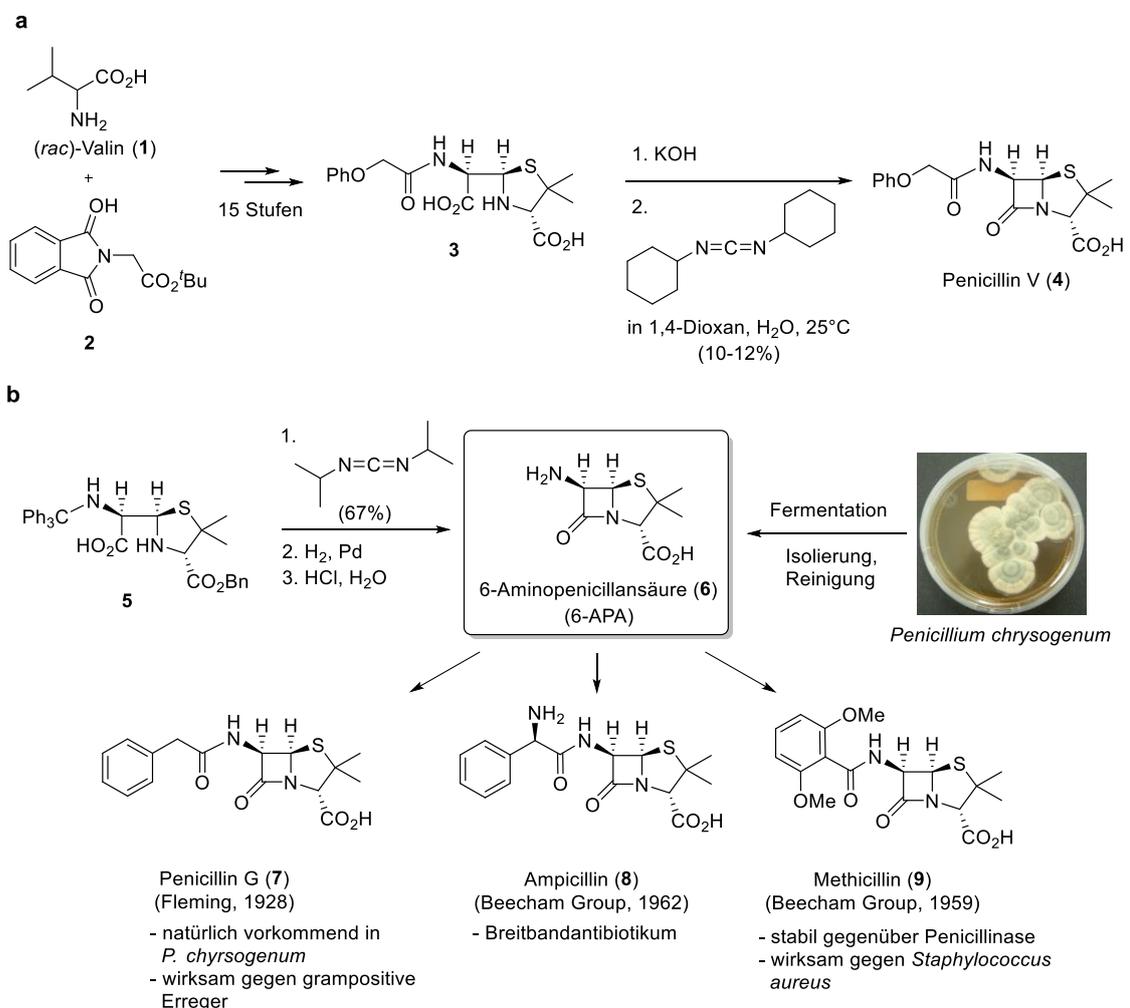
FA	<i>Formic acid</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Erdbeschleunigung
G6P	Glucose-6-Phosphat
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GST	Glutathion-S-Transferase
H ₂ O _{dd}	zweifach destilliertes Wasser
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
HSCoA	Coenzym A
HSNAC	<i>N-Acetylcysteamin</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence/Correlation</i>
ImH	Imidazol
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
J	Spin-Spin-Kopplungskonstante
K	Gleichgewichtskonstante
Kan	Kanamycin A
Kb	Kilobasenpaare
KHMDS	Kaliumhexamethyldisilazid
KR	Ketoreduktase
KS	Ketosynthase
LB	<i>Lysogeny broth/Luria broth</i>
LDA	Lithiumdi-isopropylamid
Lsg.	Lösung
m	Masse
M	Molar ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); Markerbande
MAT	Methionin-Adenosyl-Transferase
<i>mCPBA</i>	<i>meta-chloroperbenzoic acid</i>
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
Me	Methyl
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MS	Massenspektrometrie
MT	Methyltransferase
MTR	L-Methionin-Synthase
MW	<i>Molecular weight</i>
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NRP	Nicht-ribosomales Peptid
NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>
Nu	Nucleophil
OD ₆₀₀	Optische Dichte ($\lambda = 600 \text{ nm}$)
ORF	<i>Open reading frame</i> (offener Leserahmen)
Ori	<i>Origin of replication</i> (Replikationsursprung)

p	<i>para</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Precursor-directed biosynthesis</i>
PE	Petrolether
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	$-\log_{10}a(\text{H}^+)$
Ph	Phenyl
PK	Polyketid
PKS	Polyketidsynthase
ppm	<i>Parts per million</i>
PPTS	Pyridinium- <i>para</i> -toluolsulfonat
Pr	Propyl
PT	5-Phenyltetrazoyl
rac	racemisch
RBS	Ribosomale Bindestelle
reisol.	reisoliert
R _f	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
S _N 2	Nucleophile Substitution 2. Ordnung
sp.	<i>Species</i>
spp.	<i>Species pluralis</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBAT	Tetrabutylammoniumdifluortriphenylsilicat
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl; TRIS- <i>buffered saline</i> (Puffer)
TE	Thioesterasedomäne
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TES	Triethylsilyl
Tf	Trifluormethansulfonat
TFA	<i>Trifluoro acetic acid</i>
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran
TMS	Trimethylsilyl
TOF	<i>Time Of Flight</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	Enzymeinheit
u. A.	unter Anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV-VIS	ultravioletter und sichtbarer Frequenzbereich elektromagnetischer Strahlung
VMAR	vinyloge MUKAIYAMA-Aldolreaktion
WW	Wechselwirkung(en)
z	Ladungszahl
Δ	Wärmeenergie
α	Drehwert
δ	Chemische Verschiebung

1. Einleitung

1.1 Die Naturstoffchemie – Motivation und Herausforderungen

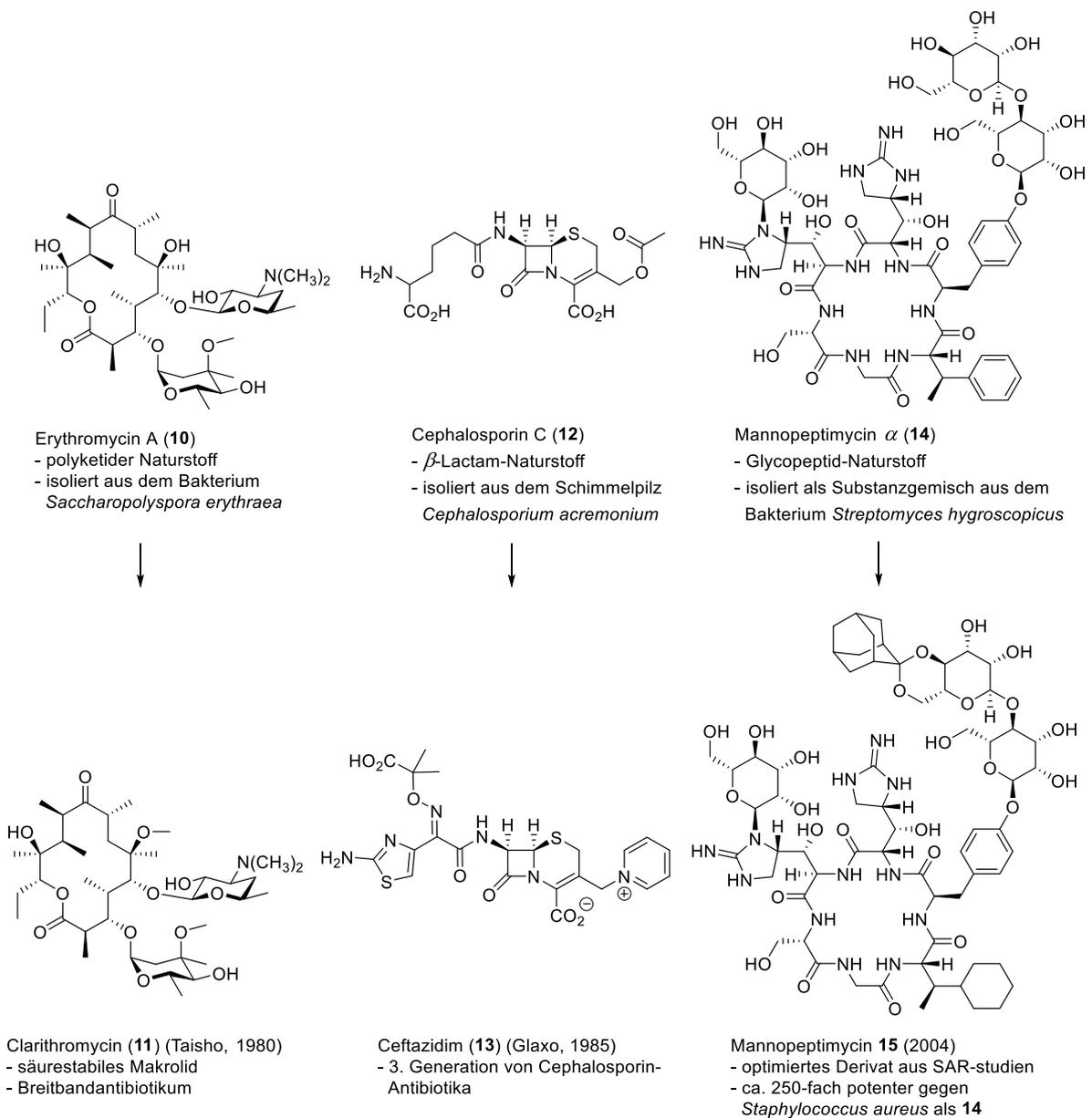
Historisch betrachtet revolutionierte die Entdeckung der Penicillinantibiotika, beginnend mit den bahnbrechenden Arbeiten von FLEMING mit Pilzen der Gattung *Penicillium chrysogenum* im Jahr 1928, die Medizin und läutete den Siegeszug mikrobieller Naturstoffe zur Behandlung von Infektionskrankheiten ein.^[1] Während des Zweiten Weltkrieges führte der erhöhte Bedarf nach effektiven Therapieformen zur Behandlung von Wundinfektionen auf alliierter Seite zu enormen wissenschaftlichen Innovationen für die Bereitstellung sehr großer Mengen an Penicillin.



Schema 1: a: Totalsynthetischer Zugang zu Penicillin V (4) nach SHEEHAN (1957)^[2]. b: Total- und semisynthetischer Zugang zu Penicillinderivaten über den gemeinsamen Vorläufer 6-APA (6). Die Abbildung *P. chrysogenum* wurde entnommen aus: <https://de.wikipedia.org/wiki/Penicilline> (aufgerufen am 20.09.2015).

Alle Bemühungen zur vollsynthetischen Darstellung dieser sehr reaktiven Naturstoffklasse scheiterten zunächst aufgrund mangelnder Fertigkeiten im Bereich der Strukturaufklärung und Synthese organischer Moleküle.

Gleichzeitig wurden jedoch grundlegende Fortschritte im Bereich der Fermentationstechnik^[3] und mikrobiellen Stammhaltung^[4] erzielt, welche die Produktionskapazitäten des lebensrettenden Wirkstoffs während des Krieges drastisch erhöhten. Nach dem Zweiten Weltkrieg beflügelten die Erkenntnisse aus dem anglo-amerikanischen Penicillinsynthese-Projekt neue Entwicklungen in der Naturstoffchemie.



Schema 2: Ausgewählte Beispiele für die semisynthetische Modifizierung von Naturstoffen mit pharmakologisch relevanten Eigenschaften. Die Makrolide **10** und **11** wirken als Translokase-Hemmer und inhibieren somit die bakterielle Proteinbiosynthese.^[5] Die Cephalosporine **12** und **13** wirken als Transpeptidase-Hemmer und inhibieren somit die bakterielle Peptidoglycansynthese.^[6] Das Mannoheptimycin **15** wirkt als Transglycosylase-Hemmer und inhibiert somit

ebenfalls die bakterielle Peptidoglycansynthese, allerdings zu einem früheren Zeitpunkt in der Biosynthese als das β -Lactam **13**.^[7,8] Die korrekte absolute Stereochemie von **14** wurde erst 2014 durch Totalsynthese aufgeklärt.^[9]

Zunächst gelang es CROWFOOT im Jahr 1945, die exakte Struktur von Penicillin G (**7**) durch Röntgenkristallstruktur-Untersuchungen aufzuklären.^[10] Im gleichen Jahr erhielten FLEMING, FLOREY und CHAIN den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Bald darauf entwickelte SHEEHAN die Carbodiimid-vermittelte Amidsynthese unter milden Reaktionsbedingungen, was die erste Totalsynthese von Penicillin V (**4**) ermöglichte.^[11] 1959 wurde die Isolierung von 6-Aminopenicillansäure (6-APA, **6**), einem komplexen Biosynthesevorläufer aller Penicilline, aus Fermentationsbrühen von *Penicillium chrysogenum* beschrieben.^[12]

Das daraus entstandene Wechselspiel aus Naturstoffisolierung, Mikrobiologie, Strukturanalytik und moderner, organischer Synthesechemie ermöglichte das damals neuartige Konzept der Semisynthese, welches sich als sehr fruchtbar für die Entdeckung neuer Wirkstoffe erwies. Die Semisynthese stellt dabei eine chemische Modifikation von Wirkstoffen ausgehend von Naturstoffen oder Naturstoffvorläufern aus biologischen Quellen dar. In Abgrenzung dazu geht die chemische Totalsynthese von beliebigen, meist leicht zugänglichen Stoffen aus, um ein ähnliches Ziel zu erreichen.

In den vergangenen 30 Jahren wurde der Großteil der klinisch zugelassenen Wirkstoffe durch Semi- und Totalsynthese bereitgestellt.^[13,14] Der Anteil an Naturstoff-abgeleiteten Medikamenten für die Infektions- und Krebstherapie ist außergewöhnlich hoch.^[13]

Die Totalsynthese hat auch heutzutage ihre Bedeutung für die Naturstoffchemie beibehalten, wie das Beispiel der Mannopectimycine zeigt (siehe Schema 2). Die Wirkstoffklasse wurde zuerst in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts entdeckt und hinsichtlich ihrer Wirkung gegen grampositive Bakterien beschrieben.^[15] Die hohe strukturelle und stereochemische Komplexität und das Fehlen einer Breitbandwirkung führten zunächst zur Einstellung weiterführender Entwicklungsstudien für diese Verbindungen. Seit den 80er Jahren führten jedoch tiefgreifende wissenschaftliche und ökonomische Entwicklungen zu einer Wiederentdeckung von bekannten Naturstoffen mit neuartigen Wirkmechanismen, wie Mannopectimycin **14**^[9] (gegen vancomycinresistente Enterococci) oder Chlorotonil A^[16] (gegen *Plasmodium falciparum*).

Diese Entwicklungen beinhalten u. A. das vermehrte Auftreten von Resistenzen^[17] und neuen Resistenzmechanismen^[18] gegen bestehende Antibiotika mit dem daraus

folgenden Bedarf an neuartigen Wirkstoffklassen. Zudem hinterließ der ökonomisch-motivierte Rückzug der pharmazeutischen Industrie aus der Naturstoffforschung eine „Innovationslücke“ im Bereich der Antiinfektiva, die voraussichtlich nicht durch kombinatorische Chemie mit vollsynthetischen Substanzbibliotheken zu schließen ist.^[19,20,21]

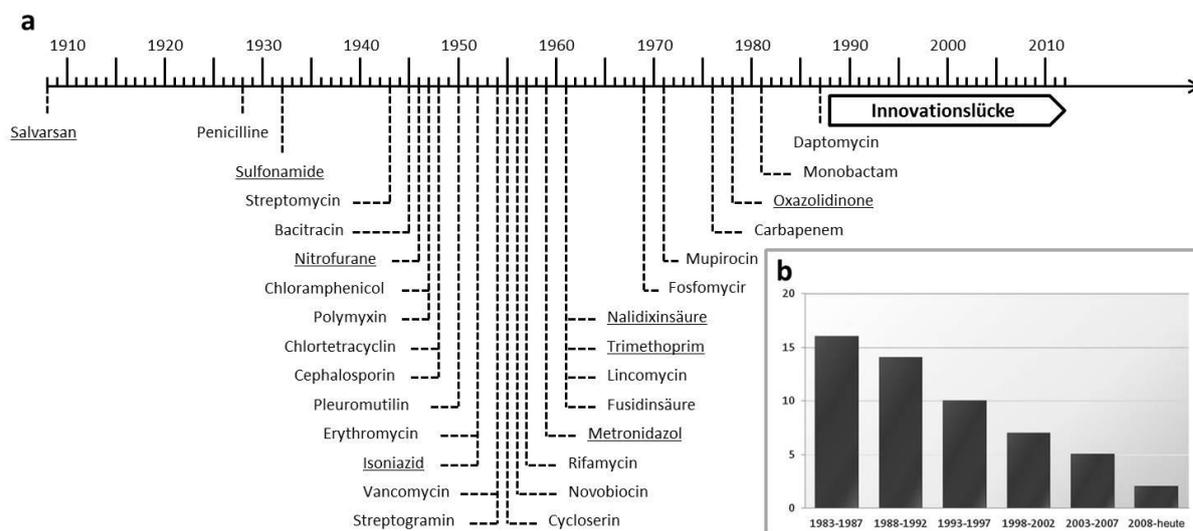


Abbildung 1: a: Zeitliches Auftreten neuer antibiotischer Wirkstoffe und Wirkstoffklassen von 1908-2012. Vollsynthetische Antibiotika sind unterstrichen. Auffällig ist die Häufigkeit an Entdeckungen zwischen 1945-1961 („goldenes Zeitalter der Antibiotikaforschung“) und das Ausbleiben neuer Wirkstoffkandidaten zwischen 1988-2012.^[17,22] b: Anzahl der von 1983 bis 2012 von der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) neu zugelassenen Antibiotika.^[23] Abbildung b wurde entnommen aus: Myers *et al.*, *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 8984-9014.^[20]

Die Erschließung neuer Quellen für innovative, pharmakologisch interessante Wirkstoffe, in Verbindung mit der Identifizierung neuer Wirkmechanismen und molekularer Wirkorte (engl. *Molecular targets*), ist heutzutage von fundamentaler Bedeutung in der Infektions- und Krebsforschung.^[24,25] Naturstoffe stehen dabei aufgrund ihrer hohen, evolutionär bedingten Spezifität und Wirksamkeit wieder zunehmend im Fokus.

1.2 Ansätze zur Gewinnung neuartiger Naturstoffe

Ein strenges pharmakologisches Anforderungsprofil bezüglich Absorption, Verteilung, Metabolisierung, Exkretion und Toxizität (engl. *ADMET*) an potentielle Wirkstoffkandidaten und eine hohe Auszehrungsrate in den klinischen Phasen sind die größten wissenschaftlichen Hürden bei der Medikamentenentwicklung. Ein naheliegender Lösungsansatz ist daher die Bereitstellung möglichst vieler chemischer Verbindungen mit möglichst hoher struktureller Diversität zu Beginn des

pharmazeutischen Entwicklungsprozesses. Somit stellt sich die Frage, woher diese neuen Strukturen gewonnen werden können.

1.2.1 Die Nutzung der Biodiversität von Mikroorganismen

Das in Abbildung 1 dargestellte „Goldene Zeitalter der Antibiotikaforschung“ war ein direktes Resultat von systematischen Untersuchungen (engl. *Screenings*) an kultivierbaren Actinobakterien, welche überwiegend in Böden anzutreffen sind. Heute geht man davon aus, dass dieser Anteil nur circa 1% aller natürlich vorkommenden Bakterien ausmacht.^[26] Der mit Abstand größte Teil lässt sich nicht unter Laborbedingungen kultivieren.

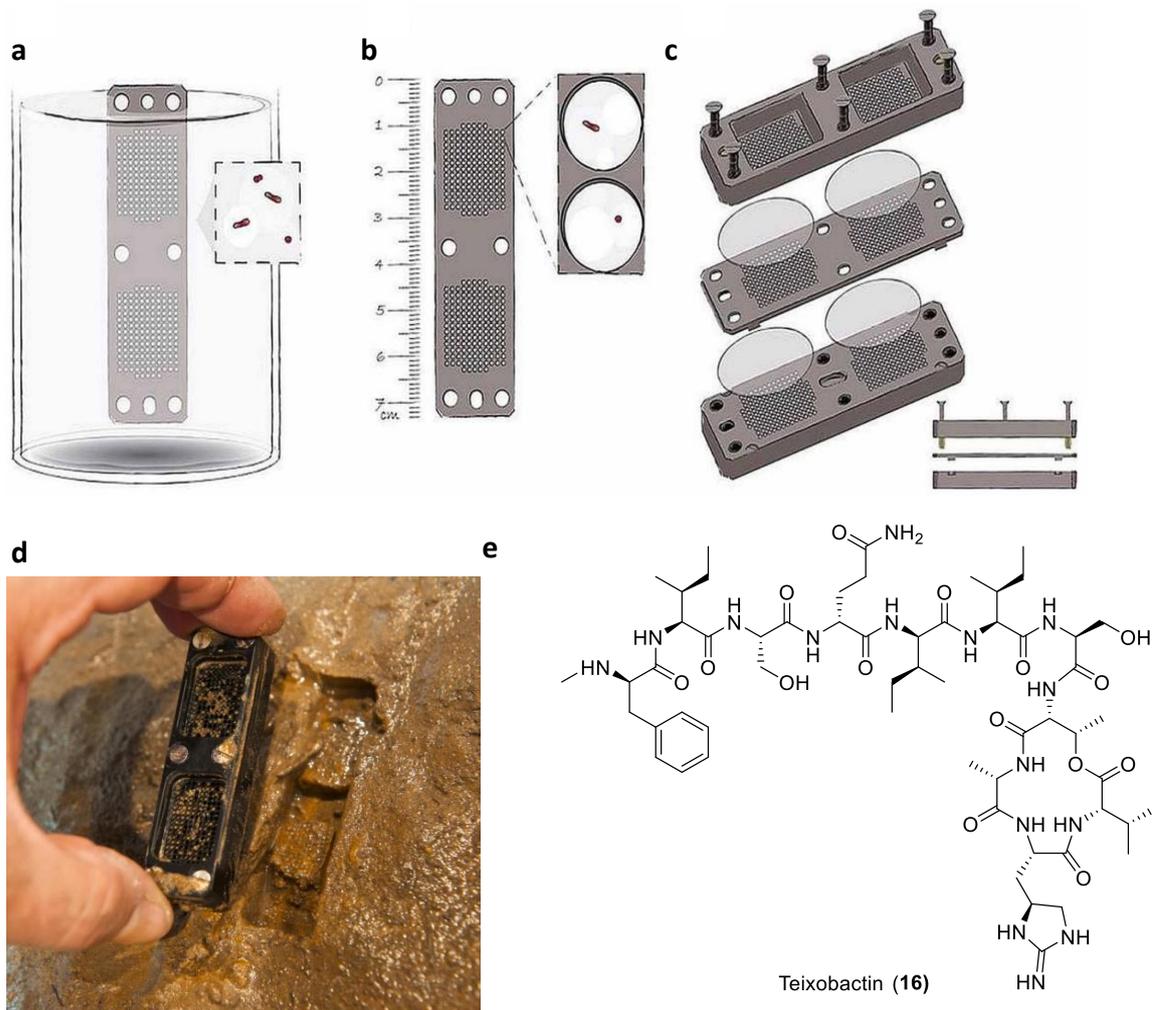


Abbildung 2: a-c: Ein Isolations-Chip kann für die simultane Kultivierung von bis zu 384 Proben verwendet werden (a). Im Idealfall befindet sich nach der Probenentnahme in jeder einzelnen Kammer eine einzige Bakterienzelle in ihrer natürlichen Nährstoffumgebung (b). Diese Zellen werden durch Agar immobilisiert (c). d: Entnahme einer Bodenprobe mit einem Ichip. e: Teixobactin (16) ist ein strukturell ungewöhnliches Depsipeptid, welches von Aquabakterien *Eleftheria terrae* gebildet wird. Es hemmt die Zellwandbiosynthese grampositiver Bakterien durch selektive Bindung an Peptidoglycanvorläufer Lipid II und III.^[27] Die Abbildungen a-c wurden entnommen aus: Ling *et al.*, *Nature* **2015**, 517, 455-459.^[27] Abbildung d wurde entnommen aus <http://www.forbes.com/sites/judystone/2015/01/08/teixobactin-and-ichip-promise-hope-against-antibiotic-resistance> (aufgerufen am 20.09.2015).

Eine rückblickende Bewertung der bisherigen Naturstoffisolierungen aus *Actinomyces* spp. kommt zu dem Ergebnis, dass für die Entdeckung einer neuen Strukturklasse aus dieser Bakteriengattung über 10^8 - 10^9 verschiedene Isolate untersucht werden müssten.^[28] Für die Entdeckung von Actinomycin, Streptomycin und Tetracyclin war ein *Screening* von nur 10-1000 verschiedener Isolate aus *Actinomyces* ausreichend. Mitverantwortlich für diesen Trend ist die hohe Wiederentdeckungsrate bereits bekannter Verbindungen.^[29]

Neue Kultivierungstechniken mit hohem Durchsatz haben großes Potential für die Gewinnung neuer Naturstoffproduzenten. Im Jahr 2010 entwickelte EPSTEIN und LEWIS ein einfaches Hochdurchsatzverfahren für eine *in-situ*-Kultivierung von Mikroorganismen aus Gewässer- und Bodenproben.^[30] Für die Probenentnahme wird ein spezieller, perforierter Kunststoff-Chip (*Isolation chip* oder *Ichip*) mit der Probe in Kontakt gebracht. Die Hohlräume zwischen den Chip-Platten wirken dabei als Diffusionskammern, in die sich bei ausreichender Probenverdünnung im Durchschnitt eine einzige Zelle pro Hohlraum einnistet. Die Kultivierung erfolgt durch Inkubation des Chips bei einer bestimmten Temperatur, nachdem die Hohlräume durch LB-Agar versiegelt wurden. Dieses Verfahren besticht durch seine einfache Handhabung und der verbesserten Ausbeute an neu angewachsenen Zellen im Vergleich zur klassischen Kultivierung auf einer Agarplatte. Verantwortlich dafür ist die Tatsache, dass die immobilisierten Zellen in ihrer natürlichen Umgebung mit einem geeigneten Angebot an Wachstumsfaktoren und Nährstoffen wachsen. Diese Technologie wurde bereits erfolgreich für die Gewinnung von über 10,000 Bakterienisolaten angewendet und führte bald darauf zur Entdeckung des β -Proteobakteriums *Eleftheria terrae*. Weiterführende Studien identifizierten *E. terrae* als einen Produzenten des Depsipeptids Teixobactin (**16**), einem neuen Naturstoff mit hoher Aktivität gegen grampositive Bakterien und vielversprechendem pharmakologischen Profil.^[27] Bemerkenswerterweise führte die präklinische Anwendung der Verbindung **16** gegen *S. Aureus* bisher zu keiner beobachtbaren Resistenzbildung.^[27]

Die systematische Veränderung von *in-vitro*-Kultivierungsbedingungen, z.B. durch die Variation der Spurenelement- und Nährstoffzusammensetzung und dem Einsatz von hydrophoben Adsorberharzen (Amberlite® XAD®), führte in jüngster Vergangenheit zur Entdeckung neuer Naturstoffe in bereits bekannten Organismen.^[31] Allgemein wurde

diese Entwicklung begünstigt durch den routinemäßigen Einsatz von hochauflösenden HPLC-MS-Untersuchungen bioaktivitätsgeleiteter *Screening*-Ansätze.

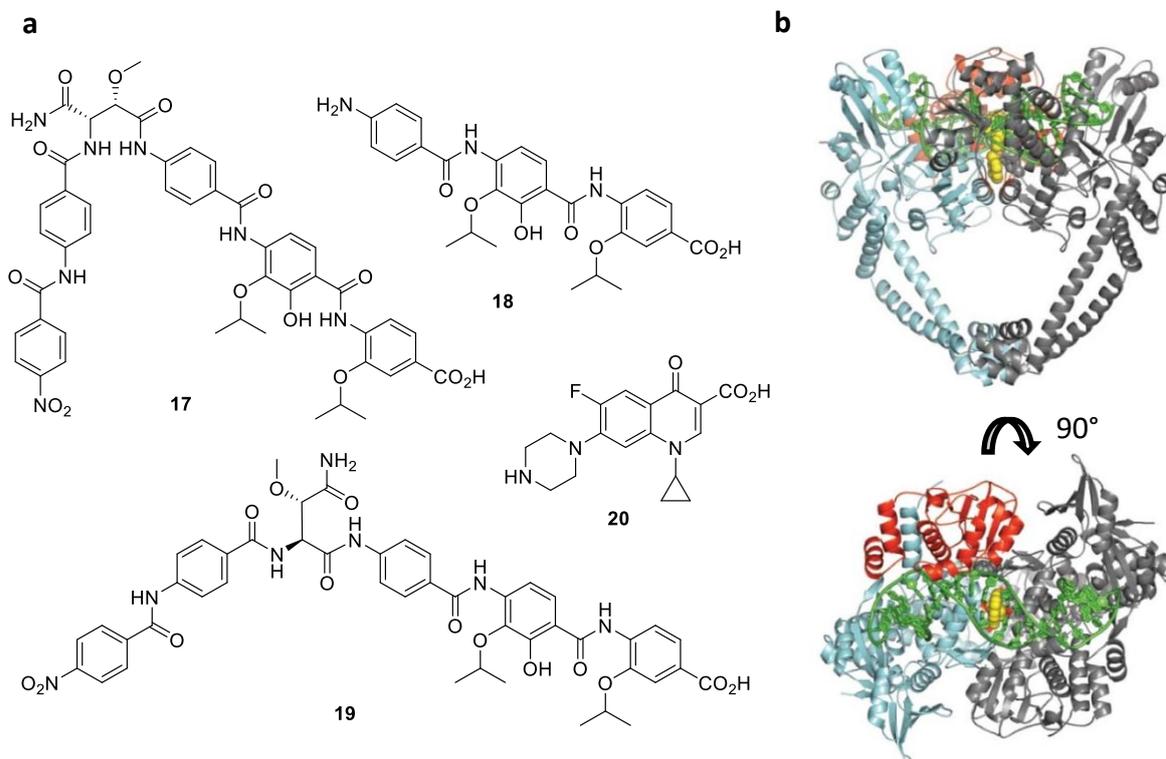


Abbildung 3: a: Strukturen der Cystobactamide 919-1 (**17**), 507 (**18**), 919-2 (**19**) und Ciprofloxacin **20**, einem Fluorchinolon der zweiten Generation mit Breitbandwirkung gegen gramnegative Keime wie die nosokomialen Erreger *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa*.^[32] b: Orthogonale Ansichten der Kristallstruktur eines Gyrase-DNA-Wirkstoff-Komplexes aus *S. aureus*. Der Wirkstoff ist in gelb dargestellt; das DNA-Molekül in grün. Ein Heterodimer GyrA-GyrB ist in grau dargestellt, das Andere in blau (GyrA) und rot (GyrB).^[33] GyrA ist das molekulare *Target* von **17**, **18**, **19** und **20**. Gemäß einer mutagenetischen Analyse von Kreuzresistenzen wirken die Cystobactamide im Vergleich zu Ciprofloxacin vermutlich an GyrA über eine überlappende aber nicht identische Bindestelle.^[34] Abbildung b wurde entnommen aus: Bax *et al.*, *Nature* **2010**, 466, 935-940 und nachträglich bearbeitet.

Auf diese Weise wurde bei der Untersuchung der biologischen Aktivität von Isolaten aus Myxobakterien gegen gramnegative Bakterien die Naturstoffklasse der Cystobactamide gefunden.^[34] Durch die Genomanalyse des Produzenten *Cystobacter* sp. Cbv34 konnte der Gencluster einer 52 kb großen nicht-ribosomalen Peptidsynthase (NRPS) identifiziert werden, der für die Biosynthese der Verbindungen **17-19** verantwortlich ist. Die Cystobactamide weisen eine ungewöhnliche Peptidstruktur, bestehend u. A. aus *para*-Aminobenzoesäuren, auf. Eine ähnliche Struktur und biologische Aktivität besitzen die Albicidine, welche erstmals aus dem Pathogen *Xanthomonas albilineans* isoliert wurden.^[35] Im Jahr 2015 wurden Cystobactamid 507 (**18**)^[36] und Albicidin^[37] erstmals totalsynthetisch dargestellt. *In-vitro*-Analysen mit DNA aus *E. coli* zeigten, dass **17**, **18** und **19** die Topoisomerasen vom Typ II (Gyrasen) inhibieren. Gyrasen (Gyr) katalysieren in Prokaryonten die negative Superspiralisierung von relaxierten DNA-Molekülen, was zu

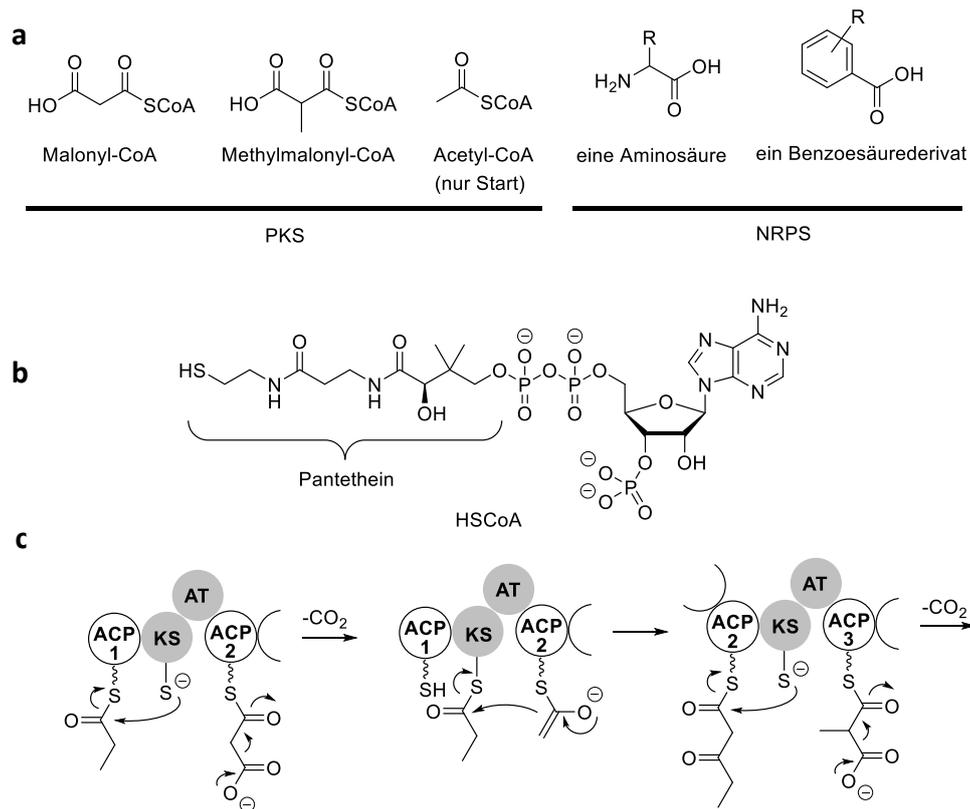
einer kompakteren Packung der DNA in der Zelle führt. Diese Reaktion verläuft unter ATP-Verbrauch, wobei das ATP an der GyrA-Untereinheit des Enzyms bindet. Insgesamt stellt die *holo*-Form von Gyr ein Heterotetramer aus jeweils zwei Untereinheiten GyrA und zwei Untereinheiten GyrB dar.^[33] GyrA ist das molekulare *Target* der Aminocoumarin-Antibiotika, wie z.B. Novobiocin, welche seit den 1960er Jahren im Einsatz sind.^[38]

1.2.2 Die Nutzung des biosynthetischen Potentials von Mikroorganismen

1.2.2.1 Kombinatorische Biosynthese

Die Aufklärung der Biosynthesewege von Sekundärmetaboliten wie 2-Hydroxy-6-methylbenzoesäure^[39] aus *Penicillium Griseofulvum* oder Actinorhodin^[40], einem Antibiotikum aus *Streptomyces coelicolor*, fußte bis zum Ende der 1980er Jahre hauptsächlich auf mikrobiologischen Methoden und *in-vivo*-Verfütterungsexperimente mit isopenmarkierten Substraten. Komplementär dazu leitete ab 1995 die Entwicklung immer schnellerer und präziserer Verfahren zur Bestimmung der Nukleobasenabfolge großer DNA-Moleküle (bis zu 10^6 bp) das Zeitalter der Genomik ein.^[41,42] Im Jahr 2001 wurde das Humangenomprojekt abgeschlossen^[43], was die Biowissenschaften, Anthropologie, Medizin und Forensik nachhaltig beeinflusste. Ein Meilenstein für die Naturstoffforschung war die Sequenzierung des Genoms von *Streptomyces coelicolor* A3(2), einem bereits sehr gut charakterisierten Vertreter der wirkstoffproduzierenden Actinomyceten.^[44]

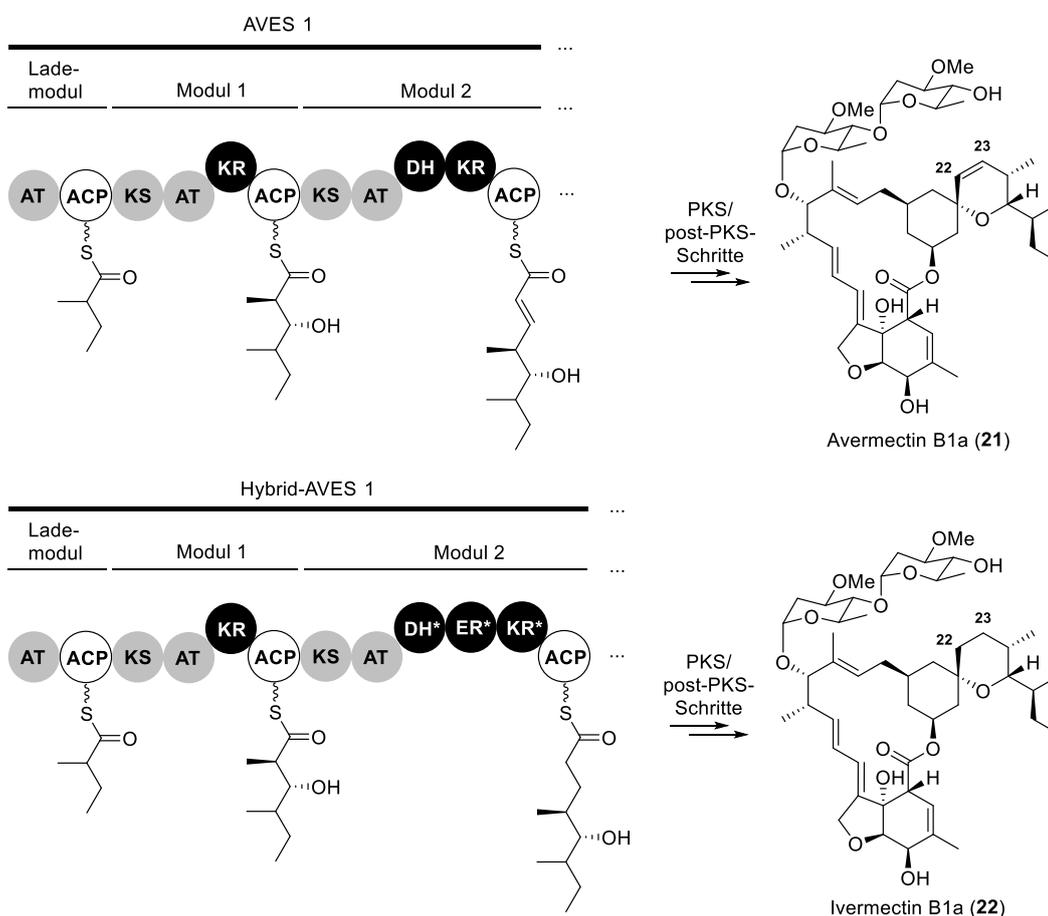
Bis 2015 wurden ca. 4200 prokaryotische Genome vollständig sequenziert.^[45] Die vergleichende Analyse der erhaltenen Fülle an Sequenzierdaten durch bioinformatische Algorithmen^[46] führte zu einem tieferen Verständnis über die genetischen Grundlagen der mikrobiellen Naturstoffbiogenese.^[47]



Schema 3: a: Typische Coenzym-A-Thioester und Carbonsäuren als Start- und Verlängerungseinheiten von Polyketidsynthasen (PKS) und nicht-ribosomalen Peptidsynthasen (NRPS). b: Struktur des Coenzym A (HSCoA), dem Phosphorsäureester aus 3'-phosphoryliertem Adenosindiphosphat (ADP) und Pantethein. c: Beispiel für den Mechanismus der Kettenverlängerung bei Typ-I-PKS: Eine Acyltransferdomäne (*cis*-AT) wählt einen Starterbaustein, hier Propionyl-S-CoA, aus und transferiert ihn auf das *Acyl Carrier Protein* (ACP₁). Die Ketosynthase (KS) katalysiert eine decarboxylative Claisenkondensation zwischen dem ACP₂-gebundenen Verlängerungsbaustein (hier Malonyl-S-CoA) und dem KS-gebundenen Starterbaustein. Nach diesem Schritt liegt der um eine Acetyleinheit verlängerte Starterbaustein ACP₂-gebunden vor und kann weiter prozessiert werden (hier angedeutet mit Methylmalonyl-S-CoA).^[47]

Viele bakterielle und fungale Polyketide und nicht-ribosomale Peptide werden von großen, multimodularen Enzymen aufgebaut (Typ-I-Polyketidsynthasen und nicht-ribosomale Peptidsynthasen, sowie Hybride aus beiden).^[47,48] Die Module besitzen ihrerseits untereinander kovalent verknüpfte, katalytisch aktive Domänen. Die Synthese verläuft generell ausgehend von einer Startereinheit, die über eine Thioesterbindung kovalent mit einzelnen Domänen verbunden sein kann (siehe Schema 3). Eine solche Startereinheit ist im Fall der Polyketide häufig ein Acetat oder Propionat, im Fall der nicht-ribosomalen Peptide eine Amino- oder Carbonsäure. Der Startbaustein wird in einer Serie von Katalyseschritten mit sog. Verlängerungseinheiten (Thioester von Coenzym A) umgesetzt. Dieser „Fließband“-Prozess findet in abgewandelter Form auch in der Fettsäurebiosynthese statt, führt aber im Fall der Typ-I-PKS und NRPS zu einer erheblich größeren strukturellen Variabilität der Endprodukte.

Insbesondere die frühen Arbeiten zur Organisation und Funktion der PKS von 6-Desoxyerythronolid B (DEBS), dem Aglycon von Erythromycin A (**10**), haben das gegenwärtige Verständnis über die Biosynthese von Polyketiden geprägt. Der naturgegebene Umstand, dass die Gene für Selbstresistenz, Regulation und für die Polyketidsynthese im Genom des Erythromycinproduzenten *S. erythraea* räumlich sehr nahe beieinander liegen (sog. Gencluster), erleichterte die erste Aufklärung eines Teils der DEBS-PKS durch LEADLAY im Jahr 1990.^[49] Die Gen-*Knockout*-Studien von KATZ belegten experimentell die Organisation der DEBS-PKS in Module und Domänen.^[50] Weiterführende Arbeiten, auch an anderen Naturstoffen wie Rifamycin^[51], führten zur Etablierung der Kolinearitätsregel für die Polyketid- und nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese.



Schema 4: Direkte Darstellung von Ivermectin **22** durch gezielte Reprogrammierung der Avermectin-PKS.^[52,53] Avermectine, darunter Verbindung **21**, werden natürlich durch eine Typ-I-PKS (AVES) in *Streptomyces avermitilis* gebildet. Durch molekularbiologische Methoden konnten die reduktiven Domänen aus dem Modul 2, eine Dehydratase (DH) und eine Ketoreduktase (KR), durch die reduktiven Domänen aus dem Modul 13 der Rapamycin-Biosynthese (DH*, ER*, KR*) ersetzt werden. Die so erhaltene Hybrid-PKS führte *in-vivo* zur Bildung eines Gemisches aus **21**, **22** und weiterer Makrolide. Ivermectin **22** ist ein Makrolid-Therapeutikum gegen Infektionskrankheiten, die durch Ektoparasiten oder Fadenwürmer verursacht werden (z.B. Flussblindheit).

Diese Regel postuliert eine semantische Verknüpfung zwischen der Organisation der Biosynthesegene, der linearen Domänenarchitektur der PKS/NRPS und der chemischen Struktur (Konnektivität und Stereochemie) des gebildeten Naturstoffs. Sie führte zur Entwicklung von Strategien zur rationalen Reprogrammierung von Typ-I-PKS zur Erzeugung unnatürlicher Polyketid-Naturstoffe (sog. kombinatorischen Biosynthese).^[54,52]

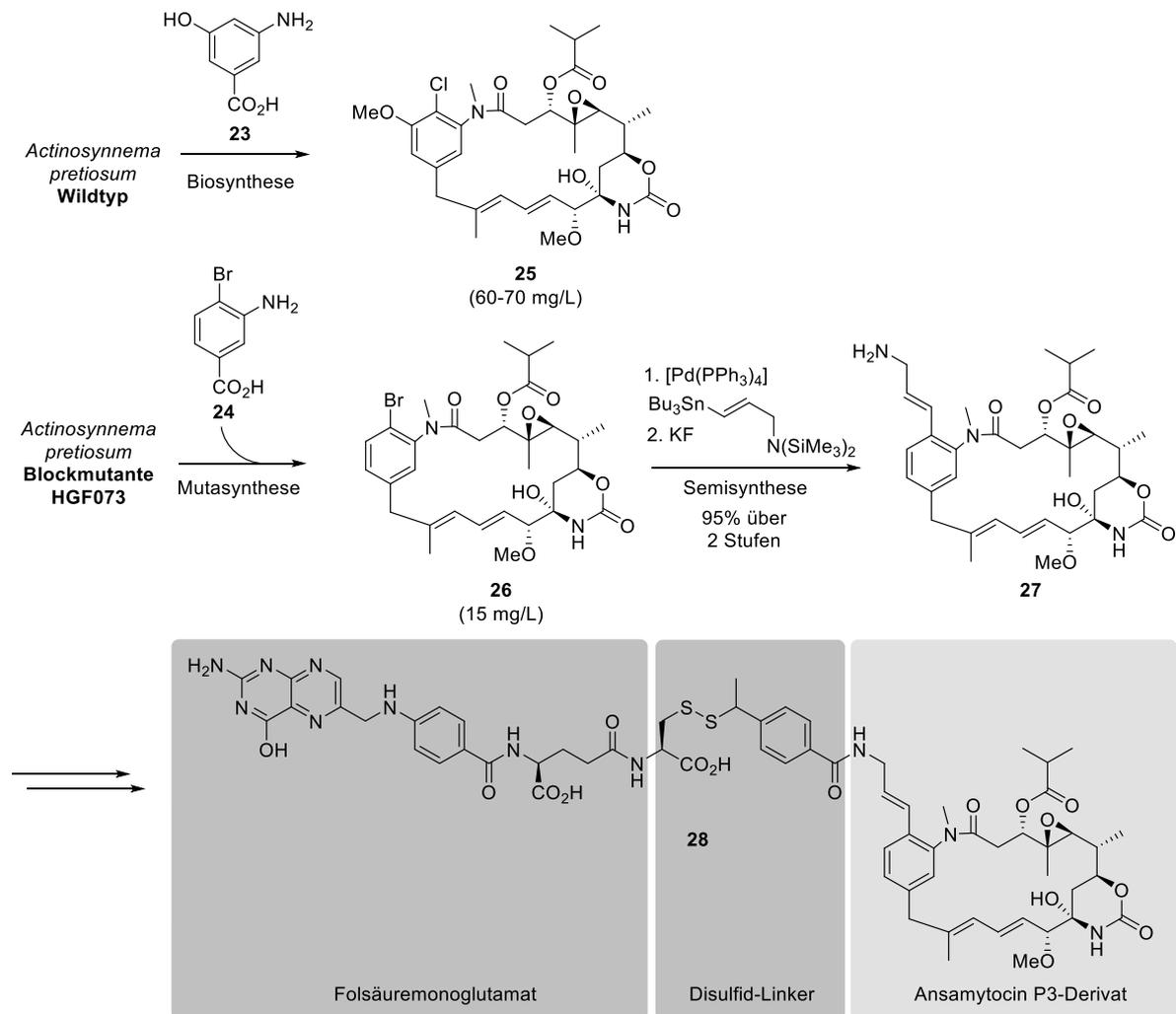
Solche Ansätze zur Manipulation der PKS-Architektur beinhalten z.B. die Verkürzung^[55] oder Verlängerung^[56] der Polyketidkette oder den Einbau verschiedener Starter^[57]- und Verlängerungsbausteine^[58]. Wie in Schema 4 gezeigt, kann auch der Grad der Reduktion bei der Kettenverlängerung gezielt variiert werden. In diesem Fall führte der Eingriff in die Reduktionskaskade im Modul 2 der Avermectin-PKS zur Bildung von 22,23-Dihydroavermectinen (Ivermectine).

Durch die kombinatorische Biosynthese mit Typ-I-PKS konnten bis zum Jahr 2001 über 200 neue Verbindungen mit zum Teil interessanten pharmakologischen Eigenschaften gewonnen werden.^[59] Allerdings führen viele dieser Manipulationen häufig zu einer Verringerung der katalytischen Aktivität der so erhaltenen, unnatürlichen Hybrid-PKS.^[60,61,62] Die Gründe hierfür sind schlechtere Genexpression und Faltung des Enzymkomplexes und nachteilige oder fehlende Interdomän-Wechselwirkungen. Im Fall der nicht-natürlichen Verlängerungsbausteine können gering ausgeprägte Substrattoleranzen einzelner Domänen zu einer Verlangsamung oder gar Verhinderung der Kettenverlängerung führen. In Folge dessen können meist nur geringe Mengen (<1 mg) an neuen Verbindungen isoliert werden, was nachträgliche Anwendungen deutlich limitiert.

Diese Einschränkungen können durch *in-vivo*-Methoden umgangen werden, welche nicht oder nur indirekt Einfluss auf die Polyketidbiosynthese nehmen. Wird beispielsweise ein Produzent eines polyketidischen Naturstoffs mit Derivaten des natürlich verwendeten Starterbausteins supplementiert, so lassen sich auch ohne gentechnische Veränderung der PKS-Struktur neue Naturstoffe darstellen. Der supplementierte Baustein wird dabei in die Zellen importiert und konkurriert mit dem natürlichen Substrat um die ACP-Bindestelle des Lademoduls. Dieses Verfahren wird allgemein als Vorstufen-dirigierte Biosynthese (engl. *Precursor-directed Biosynthesis, PDB*) bezeichnet und ist in ihrer

Anwendung nicht nur auf Polyketid-Naturstoffe beschränkt. Wird diese Supplementierung an einer Deletionsmutante des Produzenten durchgeführt, die ein bestimmtes Biosynthese-Intermediat nicht mehr prozessieren kann, so spricht man von *Mutational Biosynthesis* oder Mutasynthese.^[63,64] Ein extern zugegebenes Intermediat (oder der Starterbaustein) kann so unter Umständen durch die PKS prozessiert werden und gemäß seiner chemischen Struktur eine gezielte Derivatisierung des Endproduktes ermöglichen.

Die Mutasynthese erfordert detailliertes Wissen über die Biosynthese der Naturstoffe im Zielorganismus und wurde u. A. für die Rapamycine^[65] (aus *Streptomyces hygroscopicus*) und die Ansamytocine^[66,67] (aus *Actinosynnema pretiosum*) angewendet. Bei diesen Beispielen wurden durch Gendeletionen im Genom des Produzenten Teile des Shikimisäurewegs blockiert, die für die Bereitstellung der Starterbausteine (4*R*,5*R*)-4,5-Dihydroxycyclohex-1-encarbonsäure (Rapamycin) und Aminohydroxybenzoesäure (Ansamytocin) verantwortlich sind.



Schema 5: Der Wild-Typ von *Actinosynnema pretiosum* produziert das stark cytotoxische Ansamycin P3 (**25**) durch eine Typ-I-PKS unter Verwendung des Starterbausteins Aminohydroxybenzoesäure (AHBA, **23**), welcher über den Shikimatweg vom Organismus selbst bereitgestellt wird. Die Blockmutante HGF073 kann **23** nicht selbst herstellen, akzeptiert jedoch das unnatürliche AHBA-Analoga **24** für die Biosynthese des Bromids **26**. Eine Pd-katalysierte STILLE-Kupplung von **26** mit einem Vinylstannan und nachträgliche Entschwefelung lieferte das primäre Amin **27**, welches zu einem Folsäure-Ansamycin-Konjugat **28** umgesetzt wurde.^[68]

Die im letzteren Fall erstellte Blockmutante HGF073 von *A. pretiosum* akzeptierte und prozessierte eine Vielzahl aromatischer Vorläuferverbindungen. Auf diese Weise konnte das Bromderivat **26** von Ansamycin P3 (**25**) in isolierten Ausbeuten bis zu 15 mg/L nach Fermentation erhalten werden. Die hohe Ausbeute erlaubten vielfältige, semisynthetische Modifizierungen. So konnte in einem mehrstufigen Prozess gemäß Schema 5 aus **26** das Wirkstoff-Konjugat **28** dargestellt werden.^[69] Folsäure hat auch in konjugierter Form eine hohe Affinität zu Folsäurerezeptoren ($K = 10^{-10}$ M), welche in vielen Tumorgeweben überexprimiert werden.^[70] Im Rahmen einer chemotherapeutischen Anwendung wird das Konjugat **28** von dem Folsäureanteil zum Wirkort dirigiert. In Versuchen mit humanen Krebszelllinien wiesen derartige Konjugate

eine drastisch höhere (Faktor $>10^3$) antiproliferative Aktivität auf, wenn die Tumorzellen Folsäurerezeptoren exprimierten.

1.2.2.2 Metagenomische Ansätze

Ein anderes Konzept zur Erschließung neuer Polyketid- und nicht-ribosomalen Peptidnaturstoffe, welches direkt aus der Kolinearitätsregel folgt, ist unter dem englischen Begriff *Genome Mining* zusammengefasst. Ausgangspunkt ist die Tatsache, dass durch bisherige DNA-Sequenzierungen und Analysen mikrobieller Genome viele potentielle biosynthetische Gencluster identifiziert wurden, die bisher nicht mit bekannten Naturstoffen assoziiert werden konnten.^[71]

Diese sog. „kryptischen“ oder „stillen“ Gencluster liefern erste Anhaltspunkte für die Suche nach neuen Naturstoffen und ermöglichen, durch die ständige Verbesserung bioinformatischer Methoden^[72], eine erste Vorhersage über deren chemische Struktur.

Wie produktiv die Erforschung dieser Gencluster ist, zeigten die Arbeiten zu dem Myxobakterium *Myxococcus xanthus* DK1622. Nachdem im Jahr 2006 das Genom von *M. xanthus* DK1622 sequenziert wurde, konnten über 18 „kryptische“ PKS/NRPS-Gencluster annotiert werden.^[73] Bis zu diesem Zeitpunkt war lediglich bekannt, dass das Bakterium ein Produzent des antibiotisch wirkenden Myxovirescins **32** ist.^[21] Genclusteranalysen führten in Verbindung mit Gen-*Knockout*-Studien daraufhin zur Aufklärung der Myxochromide A^[74] aus *M. xanthus* DK1622 und der Myxochromide S1-S3^[75] (**29, 30, 31**) aus *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1.

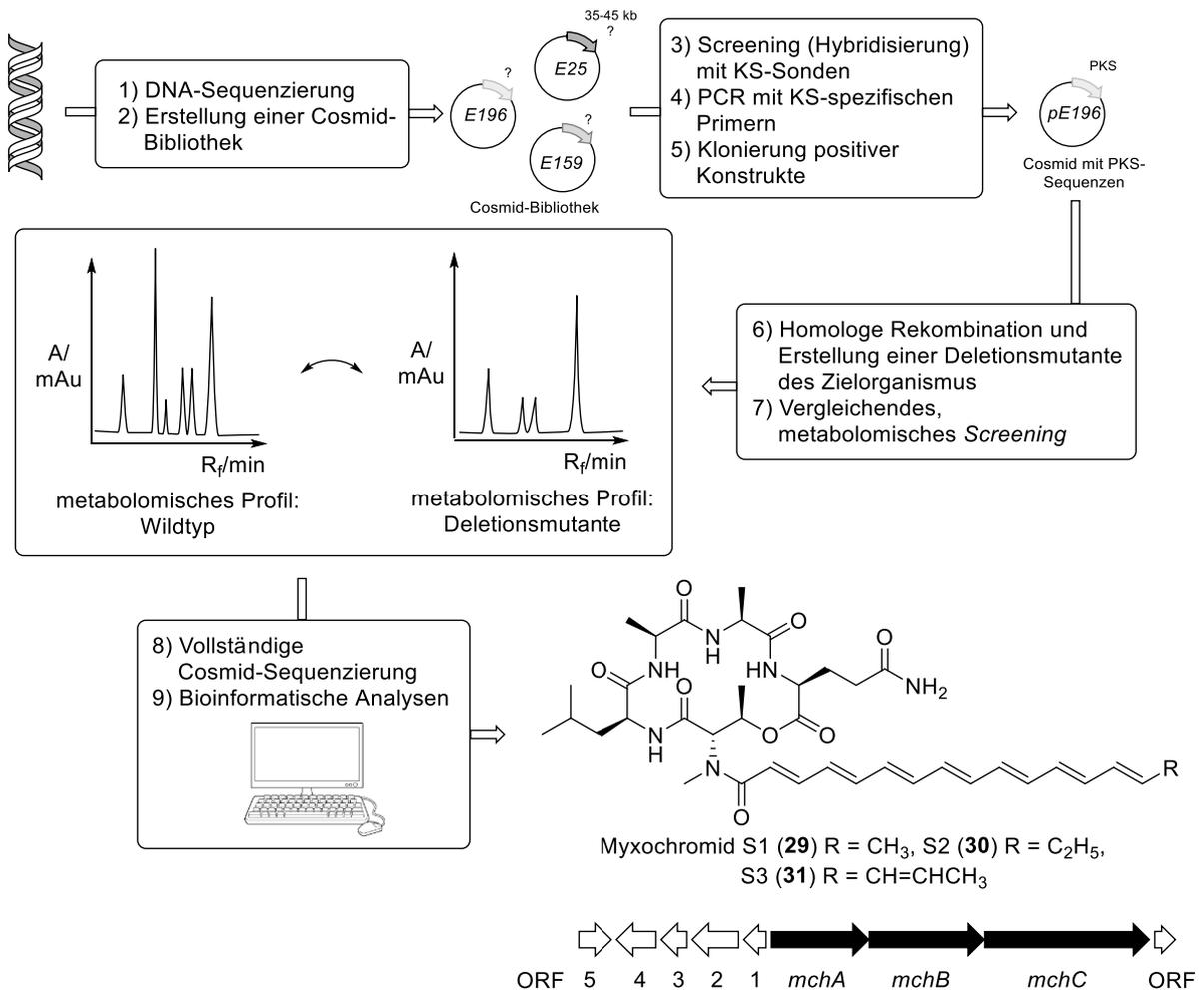


Abbildung 4: Fließdiagramm zur Identifikation neuer Naturstoffe durch Vergleiche im metabolischen Profil eines Naturstoffproduzenten nach *Gen-Knockout*. Diese Methode ist eine von vielen Ausprägungsformen des *Genome mining* und wurde z.B. erfolgreich an *S. aurantiaca* angewendet.^[76,75] Weitere Ansätze umfassen u. A. die heterologe Genexpressionen vollständiger Polyketidsynthesen oder die *in-vitro*-Rekonstitution von Biosynthesewegen.^[77] Die Genomsequenzierung erfasst das komplette (hypothetische) Biosynthesepotential des Organismus und ermöglicht somit das *Genome Mining*.

In Abbildung 4 ist das allgemeine Vorgehen, das in leicht modifizierter Form zur Aufklärung der Myxochromide **29**, **30**, **31** und dem dazugehörigen PKS/NRPS-Hybrid führte, dargestellt: Aus der isolierten, genomischen DNA des Produzenten (1) wird eine Cosmid-Bibliothek (Plasmide mit je ca. 35-45 kb großen Fragmenten genomischer DNA) generiert (2). Die Untersuchung der Cosmide in einem Wirtsorganismus (z.B. *E. coli*) erfolgt im Anschluss durch Hybridisierung mit markierten Ketosynthase-Genabschnitten (z.B. Kolonie-Blot-Hybridisierung, 3). Für diese Hybridisierungsexperimente eignen sich Sonden aus Ketosynthasegenen besonders, da diese in ihrer DNA-Sequenz stark konserviert und damit universell sind. Ein Cosmid, das KS-Sequenzen enthält, kann nach erfolgreicher Hybridisierung colourimetrisch detektiert und mittels PCR amplifiziert

werden (4). Das so erhaltene Amplifikat stellt einen (randomisierten) Ausschnitt aus einer PKS dar und wird nach weiteren Klonierungsschritten (5) in das Genom des Zielorganismus integriert (6). Die Integration führt zur Ausbildung einer Deletionsmutante, bei der die entsprechende PKS inaktiviert ist (homologe Rekombination). Für die Deletionsmutante und den Wildtyp-Produzenten wird jeweils die Gesamtheit der gebildeten Metabolite durch hochauflösende HPLC-MS und UV-VIS-Spektroskopie bestimmt und das Ergebnis im Anschluss verglichen (7). Die Unterschiede in den metabolomischen Profilen geben Auskunft über die Produkte, die durch die inaktivierte PKS gebildet werden. Eine vollständige DNA-Sequenzierung und Analyse des Cosmids ergibt die Struktur des dazugehörigen Genclusters (8, 9).

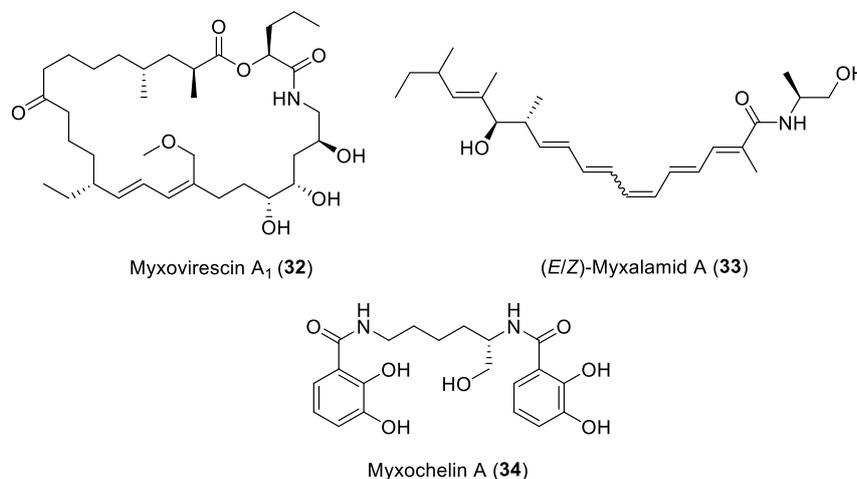


Abbildung 5: Ausgewählte Beispiele für PK/NRP-Hybride und NRP-Naturstoffe aus *M. xanthus* DK1622, die durch *Genome-Mining*-Ansätze identifiziert wurden. Myxovirescin A₁ (32) ist ein Peptidase-Hemmer mit antibiotischer Breitbandwirkung.^[78,79] (E/Z)-Myxalamid A (33) ist ein potenter Inhibitor der Elektronentransportkette in Eukaryonten.^[80] Myxochelin A (34) ist ein Siderophor mit cytotoxischer Aktivität gegen Darmkrebszellen.^[81,82]

Auf diese Weise konnten neue Wirkstoffklassen (siehe Abbildung 5) aufgeklärt und das Wissen über PKS- und NRPS-Enzymologie erweitert werden.

1.2.3 Biokatalyse

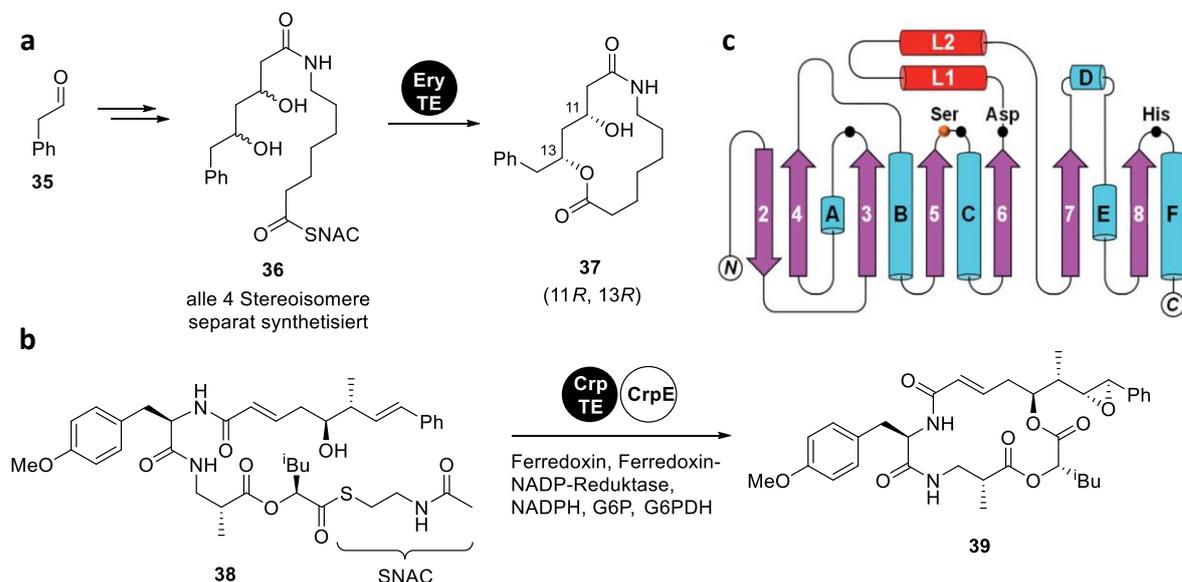
Aufgrund ihres katalytischen Potentials geraten die an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten beteiligten Enzyme zunehmend in das Interesse der Naturstoffchemie.^[83,84] Die Anwendungsbereiche sind dabei vielfältig (*in-vitro* und *in-vivo*) und umfassen dabei die Stoffklassen der Polyketide, der ribosomalen und nicht-ribosomalen Peptide, der Alkaloide, Terpenoide und der Kohlenhydrate.

Für den sinnvollen Einsatz von Enzymen aus dem Sekundärmetabolismus in der Organischen Synthese gelten die gleichen Kriterien wie für die bereits fest etablierten Enzymklassen.^[85] Zu den letzteren gehören Vertreter der Hydrolasen (Lipasen, Esterasen), Oxidoreduktasen (Alkoholdehydrogenasen, Baeyer-Villiger-Monooxygenasen) und einige C-C-bindungsknüpfende Enzyme (Aldolasen, Hydroxynitril-Lyasen). Die Darstellung und Anwendung von Enzymen für biokatalytische Zwecke ist auch heutzutage nicht trivial und meist mit viel Optimierungsarbeit verbunden. Der Einsatz von Biokatalysatoren ist daher vor allem dann angebracht, wenn die damit erreichte Transformation mit höherer Selektivität (Stereo-, Chemo- und Regioselektivität) und Ausbeute einhergeht als ein chemisches Pendant. Dieser Aufwand ist auf jeden Fall gerechtfertigt für ausgewählte biokatalytische Reaktionen, für die kein synthetisches Äquivalent existiert (z.B. direkte C-H-Bindungsaktivierung^[86]). Enzyme und enzymatische Domänen reagieren meist unter sehr milden und recht ähnlichen Reaktionsbedingungen, was das Zusammenfügen mehrerer Prozesse zu einer Reaktionskaskade erlaubt. Die *in-vitro*-Rekonstitution der Enterocin-Biosynthese ist hierfür ein eindrucksvoller Beleg.^[87,88]

1.2.3.1 Thioesterasedomänen

Aus den intensiven Studien an PKS und NRPS haben sich Thioesterasedomänen als potentielle Kandidaten für die Biokatalyse herausgestellt. Sie wirken in ihrer nativen Rolle am Ende einer PKS oder NRPS durch die Spaltung der Thioesterbindung zwischen Substrat und *ACP* bzw. *PCP* (siehe Schema 3c). Die Spaltung kann dabei in Form einer Hydrolyse oder Aminolyse zu offenkettigen oder cyclischen Produkten führen.^[89] Hervorzuheben ist hierbei die Tatsache, dass Thioesterasedomänen für ihre Aktivität keine Cofaktoren benötigen. TE-Domänen aus modularen Systemen (Typ-I-PKS, NRPS) besitzen oft eine

beachtliche Substrattoleranz, während ihre Pendants aus iterativen Prozessen (z.B. Typ-III-PKS) deutlich substratspezifischer sind.^[90]



Schema 6: a: Stereospezifische und regioselektive, chemoenzymatische Synthese des Makrolactons **37** unter Verwendung der Thioesterase (TE) aus der 6-Desoxyerythronolid-B-Synthase ausgehend vom Aldehyd **35**.^[91] b: Chemoenzymatische Ein-Topf-Synthese von Cryptophycin 2 (**39**) aus dem *Seco*-Vorläufer **38**, katalysiert durch die heterolog exprimierte Thioesterase CrpTE und die Cytochrom-P450-abhängige Epoxidase CrpE. Die *in-vitro*-Aktivität der Epoxidase wird durch ein komplexes Cofaktor-Regenerierungssystem aufrechterhalten. G6P: Glucose-6-Phosphat. G6PDH: Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. HSNAC: *N*-Acetylcysteamin. c: Proteinstrukturmodell der Thioesterase (TE) aus der Aflatoxin-Biosynthese basierend auf Kristallstrukturdaten. TE aus Typ-I-PKS besitzen eine charakteristische Domänenanordnung bestehend aus alternierenden β , α , β -Strukturen.^[90,92] Die hervorgehobenen Aminosäuren Ser, Asp und His bilden eine katalytische Triade. Die rot dargestellten Domänen L1 und L2 regulieren den Einlass des Substrates in die aktive Enzymtasche (sog. „Deckel“). Abbildung c wurde entnommen aus Boddy *et al. Nat. Prod. Rep.* **2015**.

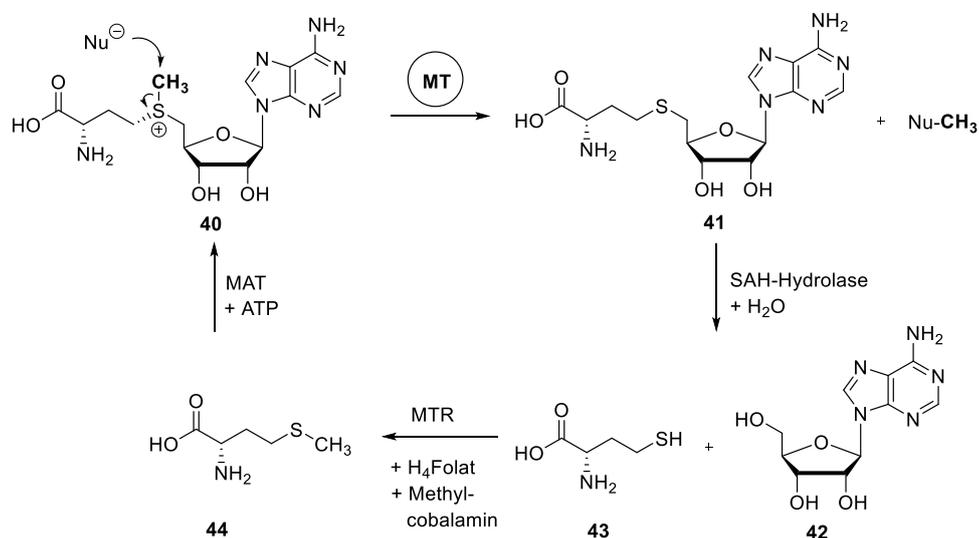
In Schema 6a ist die Anwendung einer Thioesterasedomäne als Biokatalysator gezeigt. Ausgehend von Aldehyd **35** wurden in einer enantio- und diastereoselektiven Synthese alle vier Stereoisomere des SNAC-Thioesters **36** dargestellt. *In-vitro*-Experimente mit heterolog exprimierter Thioesterase aus der 6-Desoxyerythronolid-B-Synthase (EryTE) zeigten, dass von diesen Stereoisomeren nur das Substrat mit (11*R*, 13*R*)-Konfiguration akzeptiert und dabei hoch regioselektiv zum 14-gliedrigen Lacton **37** umgesetzt wird. Von allen anderen Stereoisomeren der Verbindung **36** konnten unter identischen Reaktionsbedingungen nur offenkettige Hydrolyseprodukte erhalten werden. Diese Versuche verdeutlichen einerseits die hohe Selektivität der enzymatischen Umsetzung in Abwesenheit jeglicher Schutzgruppen und andererseits die beachtliche *in-vitro* Substrattoleranz von Thioesterasen aus Typ-I-PKS. Im Rahmen der teilweisen Rekonstitution der Cryptophycin-Biosynthese (Schema 6b) wurde der *seco*-Vorläufer **38** mit der nativen Thioesterase CrpTE in Gegenwart eines *Tailoring*-Enzyms (CrpE)

umgesetzt.^[93,94,95] Durch HPLC-MS-Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass CrpTE den SNAC-Thioester unter Ausbildung eines Lactons spaltet. Das gebildete Lacton wird im Anschluss *in situ* durch CrpE stereoselektiv epoxidiert. Beide Reaktionen finden in einem Puffersystem statt, wobei CrpE Teil eines optimierten 3-Komponenten-Redoxsystems ist.

Der biochemische Mechanismus der Beladung von Thioesterasen und der nachfolgenden Hydrolyse der Substrate ist nicht zuletzt durch Röntgenkristallstrukturdaten (siehe Schema 6c) gut untersucht.^[90,92] Aufgrund der großen strukturellen Diversität existieren bis heute allerdings keine zuverlässigen Modelle zur Vorhersage der Substrattoleranz oder der Art der Hydrolyseprodukte (offenkettig oder zyklisch).^[96]

1.2.3.2 SAM-abhängige Methyltransferasen

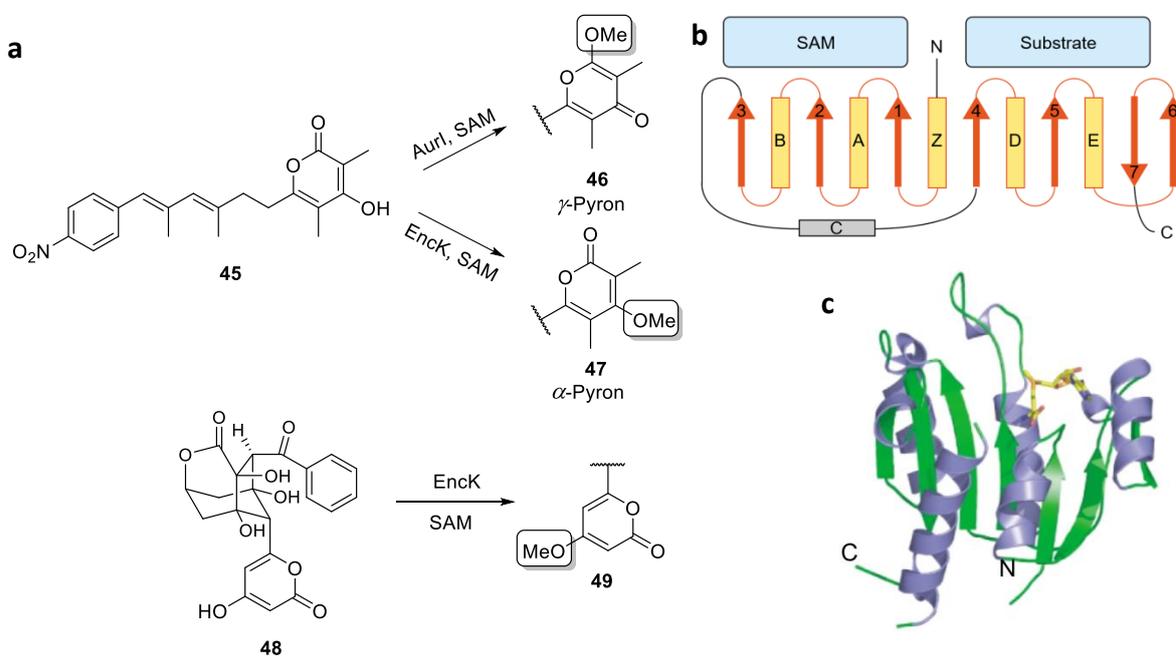
S-Adenosyl-L-methionin (SAM, **40**) ist ein universeller, biologischer Cofaktor, der von vier unterschiedlichen Enzymarten verwendet wird: SAM-abhängigen Methyltransferasen, Radikal-SAM-Enzymen, Spermidinsynthasen und *N*-Acyl-L-homoserinlacton-Synthasen.^[97]



Schema 7: Methyltransferasen (MT) der Klasse I katalysieren die Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosyl-L-methionin (SAM, **40**) auf ein Substrat durch nucleophile Substitution 2. Ordnung (S_N2). Die Bandbreite an Nucleophilen umfasst Halogenide- und Pseudohalogenide (Cl⁻, Br⁻, I⁻, NCS⁻)^[98] sowie O-, N-, C-, S-, Se- und As-Nucleophile aus dem Primär- und Sekundärmetabolismus aller Lebewesen.^[99] Die *in-vivo*-Regeneration von SAM (**40**) erfolgt über die Zwischenprodukte S-Adenosyl-L-homocystein (**41**), Homocystein (**43**) und Methionin (**44**).^[97] MTR: Methioninsynthase, MAT: Methionin-Adenosyl-Transferase.

Die Gruppe der SAM-abhängigen Methyltransferasen (siehe Schema 7) ist dabei die größte und zugleich vielfältigste. Insgesamt sind gemäß ihrer Tertiärstruktur fünf Klassen (I-V) von SAM-abhängigen Methyltransferasen beschrieben, wobei die mit Abstand

meisten Vertreter der Klasse I angehören.^[100] Die Klasse I weist eine charakteristische Domänenanordnung auf, die der NAD(P)-bindenden ROSSMANN-Faltung ähnelt. Die Homologie der Primärstrukturen innerhalb der Klasse ist sehr gering ausgeprägt (ca. 10%).^[99] Demgegenüber ist die räumliche Anordnung der Aminosäurereste sehr stark konserviert.^[100] Am C-Terminus des ersten β -Faltblatts befindet sich typischerweise ein GxGxG- oder GxG-Motiv, welches für die Nukleotidbindung (Adenin) verantwortlich ist. Ein weiteres, hochkonserviertes Motiv ist ein Säurerest am Ende des zweiten β -Faltblatts für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu beiden Hydroxylgruppen von Ribose. Dieser Klasse I gehören alle DNA-methylierenden Enzyme an, sowie die Mehrzahl der Protein- und Naturstoff-methylierenden Enzyme.

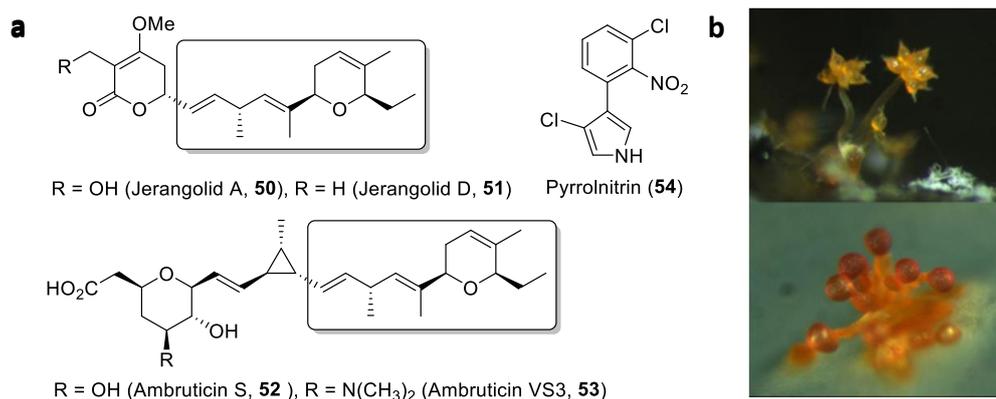


Schema 8: a: Beispiele für SAM-abhängige O-Methyltransferasen im Rahmen von Polyketidbiosynthesen. Verbindung **45** ist das Produkt einer iterativen Typ-I-PKS innerhalb der Aureothin-Biosynthese. Aurl methyliert nachfolgend **45** unter Ausbildung eines γ -Pyrone **46**.^[101] Die O-Methyltransferase EncK aus der Enterocin-Biosynthese setzt ein analoges Strukturelement aus dem Enterocinvorläufer **48** zu dem α -Pyrone **49** um.^[102] Diese Chemoselektivität wird auch beibehalten, wenn EncK *in vitro* mit dem nicht-nativen Substrat **45** zur Reaktion gebracht wird unter Bildung von **47**.^[103] b: Generisches Proteinstrukturmodell von SAM-abhängigen Methyltransferasen der Klasse I: konservierte SAM-Bindestellen befinden sich innerhalb der β -Faltblatt-Domänen 1 und 2 (rote Pfeile). Die in grau dargestellte α -Helix C ist nicht konserviert.^[104] Abbildung b wurde entnommen aus: Martin *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 783-793. c: Proteinstruktur des SAM-Methyltransferase-Komplexes der DNA-Methyltransferase HhaI aus *Haemophilus haemolyticus*.^[100] β -Faltblatt-Domänen sind in grün dargestellt, α -Helices in blau. Abbildung c wurde entnommen aus: Schubert *et al.*, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 329-335.

Während der Polyketid- und nicht-ribosomalen Peptid-Biosynthese finden vor allem O-, C- und N-Methylierungen durch SAM-abhängige Methyltransferasen der Klasse I statt. Dabei kann der Methyltransfer sowohl während der Substratprozessierung durch die PKS oder NRPS, als auch nachgeschaltet als *post*-PKS/NRPS-Prozess (*Tailoring*) stattfinden.

1.3 Jerangolide

Die Jerangolide sind eine Klasse von polyketiden Naturstoffen, die erstmals im Jahr 1996 beschrieben wurden.^[105] Ihre Isolierung erfolgte aus Kulturüberständen des myxobakteriellen Stammes *Sorangium cellulosum* So ce 307. Der prominenteste Vertreter, Jerangolid A, zeigt eine biologische Aktivität gegen Hefepilze wie *Hansenula anomala* oder *Trichosporon terrestre*. Eine ähnliche antifungale Wirkung haben auch Pyrrolnitrin (**54**) und die strukturell verwandten Ambruticine. Es wird angenommen, dass die Jerangolide ebenso wie die Ambruticine S (**52**) und VS3 (**53**) an die Histidinkinase Hik1 in filamentösen Pilzen binden. Diese Kinase steht am Beginn einer Signal-Transduktions-Kaskade, die bei osmotischem Stress der Zelle die Expression vieler Gene aktiviert und so zu einer angemessenen Zellantwort führt. Die Bindung von Ambruticin an Hik1 stört diesen Prozess und bewirkt letztendlich eine verstärkte Akkumulation von Glycerol und freien Fettsäuren, was zum Zelltod führt.^[106]



Schema 9: a: Strukturen repräsentativer Vertreter der Jerangolide (**50**, **51**) und Ambruticine (**52**, **53**) und von Pyrrolnitrin (**54**). Die beiden erstgenannten Stoffklassen besitzen zum Teil identische Strukturmerkmale wie einen trisubstituierten 3,4-Dihydro-2H-pyranring und ein Penta-1,4-dien-Motiv (hervorgehoben im Kasten). b: Fruchtkörper von Myxobakterien *Sorangium cellulosum*. Die Jerangolide wurden erstmals aus *S. cellulosum* So ce 307 isoliert. Pyrrolnitrin (**54**) wurde zuerst aus *Pseudomonas* isoliert^[107] und später u. A. in Kulturen von *S. cellulosum* So ce 405 wiederentdeckt.^[105] Die Ambruticine wurden aus *S. cellulosum* So ce 10 isoliert. Die Abbildung b wurde entnommen aus: <http://www.myxo.uni-saarland.de> (aufgerufen am 06.10.2015) und nachträglich bearbeitet.

Im Jahr 2006 wurden die Biosynthese-Gencluster der Ambruticine und Jerangolide durch die Untersuchungen von Cosmid-Bibliotheken (siehe auch Abbildung 4) identifiziert und annotiert.^[108] Die Genclusteranalyse konnte im Fall der Ambruticine durch Deletionsexperimente an sechs verschiedenen Genen und vorangegangene Biosynthesestudien mit ¹³C-Acetat-Einheiten^[109] experimentell unterstützt werden. Entsprechende Deletionsexperimente mit dem Jerangolid-Produzenten So ce 307 waren

nicht erfolgreich.^[108] Im Jahr 2014 wurde die Biosynthese der Dihydropyranringe in Ambruticinen durch *in-vitro*-Studien im Detail aufgeklärt.^[110]

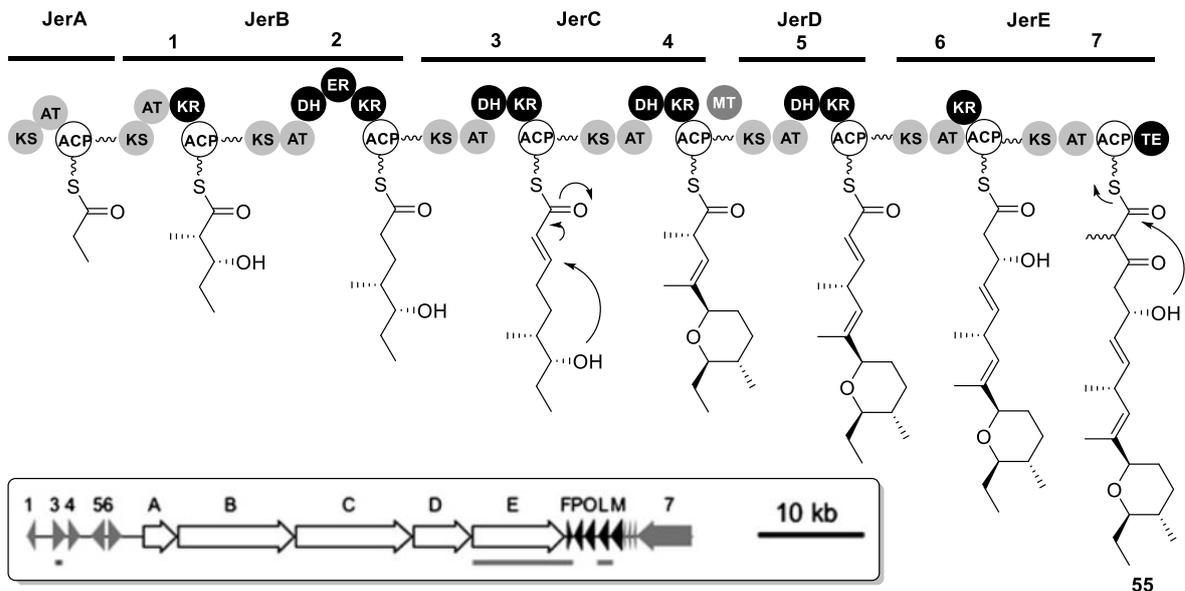
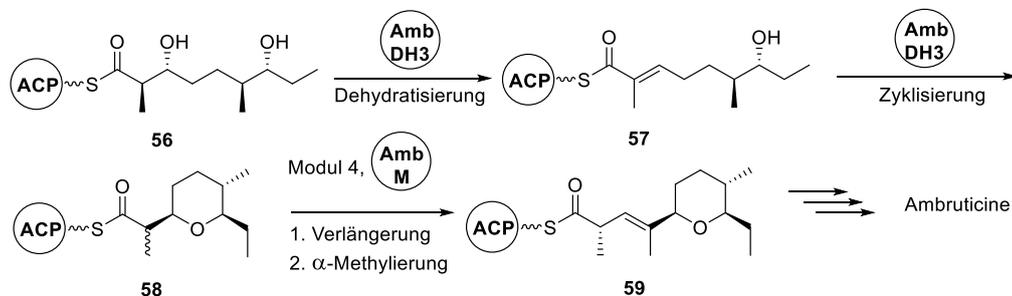


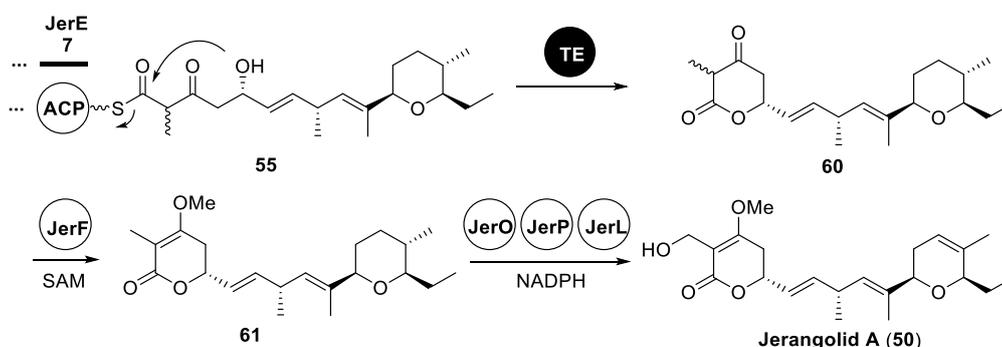
Abbildung 6: Ausschnitt aus der von JULIEN *et al.* postulierten und nach BERKHAN *et al.* modifizierten Biosynthese der Jerangolide.^[108,110] Der Gencluster für die Jerangolid-Biosynthese besteht aus 5 PKS-Genen (*jerA-jerE*), 7 Regulatorgenen (in grau dargestellt, 1-7) und 5 weiteren Biosynthesegenen (in schwarz dargestellt, *jerF, jerP, jerO, jerL, jerM*). Die grauen Linien unter den Pfeilen zeigen Sequenzunterschiede zum Ambruticin-Gencluster an. Die Bildung des ACP-gebundenen Jerangolidvorläufers **55** erfolgt ausgehend von Propionyl-SCoA durch sieben Elongationschritte. In Analogie zur Ambruticin-Biosynthese ist die Dehydratase (DH) aus Modul 3 für die Bildung des Tetrahydropyranringes (THP-Ring) verantwortlich. Die C-Methylierung durch JerM ist nicht an die Bildung des THP-Ringes gekoppelt und erfolgt am Ende von Modul 4. Die Thioesterase JerTE ist für die Bildung des δ -Lactons verantwortlich.

Der Vorläufer **55** wird ausgehend von Propionyl-SCoA durch eine Typ-I-PKS synthetisiert. Die Verlängerung der Kohlenstoffkette erfolgt durch den Einbau von zweimal Methylmalonyl (Modul 1 und 7), fünfmal Malonyl (Modul 2, 3, 4, 5 und 6), sowie einmal Methyl (Modul 4, C-Methyltransferase JerM).



Schema 10: Experimentell bestätigter Abschnitt (von **56** nach **58**) innerhalb der Ambruticin-Biosynthese. Für die *in-vitro*-Untersuchungen wurden die nativen, ACP-gebundenen Substrate durch SNAC-Thioester ersetzt.^[110] Die Ergebnisse lassen sich durch die sehr hohe Sequenzidentität der PKS-Gene auf die Jerangolid-Biosynthese übertragen.

In-vitro-Studien mit realistischen SNAC-Thioester-Surrogaten identifizierten AmbDH3 aus AmbC als Domäne mit dualer Funktion als Dehydratase und Pyran-bildender Zyklase (siehe Schema 10). Die sehr hohe Sequenzidentität zwischen *jerC* und *ambC* (95% Identität) suggeriert einen analogen Mechanismus in der Jerangolid-Biosynthese.

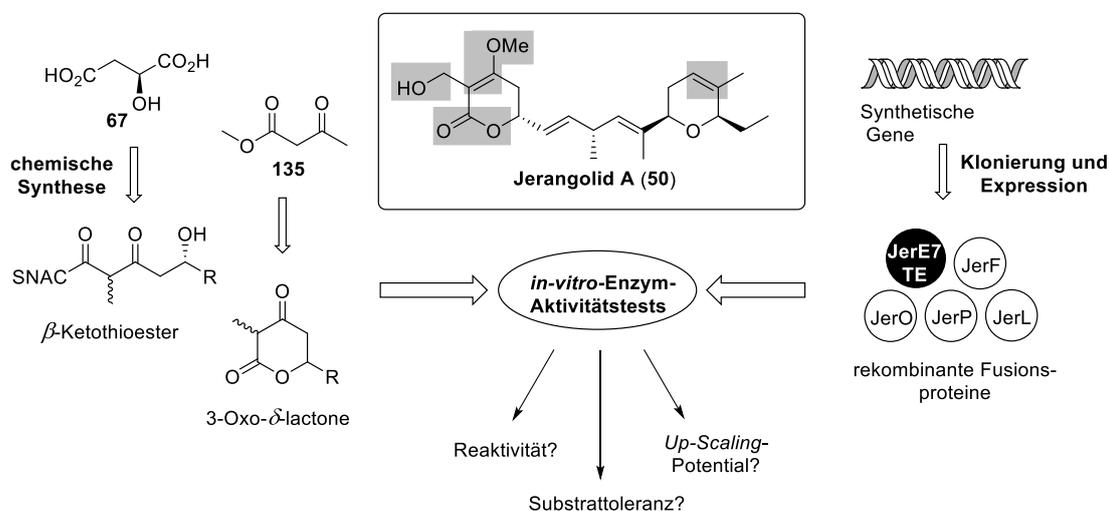


Schema 11: Die Thioesterase-vermittelte Lactonisierung führt zur Abspaltung des ACP-gebundenen Vorläufers **55** von der PKS. Verbindung **60** wird durch *post*-PKS-Modifikationen (*Tailoring*) zum Naturstoff Jerangolid A (**50**) prozessiert. Die Reihenfolge der enzymatischen Transformationen ist experimentell nicht bestätigt.^[108]

Nach der Abspaltung der Verbindung **55** erfolgen nachträgliche Modifizierungen durch die postulierten Enzyme JerF, JerO, JerP und JerL. JerF ist eine SAM-abhängige O-Methyltransferase und ein Homolog von Aurl (44% Identität) und EncK (40% Identität).^[108] JerP ist eine RIESKE-(2Fe-2S)-abhängige Oxidoreduktase, die in Verbindung mit der flavinabhängigen Monooxygenase JerO für die Desaturierung des THP-Ringes verantwortlich ist. JerL ist ebenfalls eine RIESKE-(2Fe-2S)-abhängige Oxidoreduktase, die für die Monohydroxylierung der α -Methylgruppe im δ -Lacton zuständig ist. Auch an dieser Reaktion soll JerO als Elektronendonator beteiligt sein.

2 Zielsetzung

In ihrem nativen Kontext prozessieren die *Tailoring*-Enzyme aus der Jerangolid-Biosynthese den komplexen polyketidischen Vorläufer **55** zu dem Naturstoff Jerangolid A (**50**). Derartige Enzyme, die zu einem späten Zeitpunkt in die Biosynthese komplexer, polyketidischer Naturstoffe eingreifen, besitzen oft interessante Eigenschaften, die sie für biokatalytische Anwendung prädestinieren. Dazu gehören eine hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität und ein breites Substratspektrum.



Schema 12: Die Thioesterasedomäne aus Modul 7 (JerE7(TE)) und vier *Tailoring*-Enzyme (JerF, JerO, JerP, JerL) sind in erheblichem Umfang für die chemisch-strukturellen Eigenschaften der Jerangolide verantwortlich (funktionelle Gruppen von Jerangolid A (**50**) hervorgehoben in grauen Kästen). Durch chemische Synthese hergestellte geeignete Substrate sollen mit entsprechenden rekombinanten Fusionsproteinen in Enzymaktivitätstest zur Reaktion gebracht werden.

In diesem Sinne war das übergeordnete Ziel der vorliegenden Arbeit die biochemische Charakterisierung der *Tailoring*-Enzyme JerF, JerO, JerP, JerL und der Thioesterasedomäne JerE7(TE) aus der Jerangolid-Biosynthese (siehe Schema 11 und Schema 12). Diese Charakterisierung sollte anhand von *in-vitro*-Aktivitätstests mit geeigneten chemischen Substraten und rekombinant hergestellten Proteinen erfolgen. Zum einen sollten die so gewonnenen Erkenntnisse über Reaktivität, Selektivität und Substrattoleranz der untersuchten Enzyme und Domänen zu einer experimentellen Bestätigung und Erweiterung der bereits von JULIEN *et al.* durchgeführten Genclusteranalyse beitragen. Zum anderen sollte somit eine Bewertung des biokatalytischen Potentials der untersuchten Enzyme und Enzymdomänen für den Einsatz in der Naturstoffsynthese erfolgen.

Für die Synthese geeigneter Substrate sollten möglichst kurze, flexible Syntheserouten erarbeitet werden (siehe linke Seite im Schema 12). Geplant waren die Darstellung von β -Keto- δ -Hydroxy-Thioestern zur *in-vitro*-Untersuchung von JerE7(TE) und die Darstellung von 3-Oxo- δ -Lactonen zur Untersuchung der *Tailoring*-Enzyme. Die Enzyme und Domänen sollten ausgehend von kommerziell erhältlichen synthetischen Genen in geeignete Expressionsvektoren kloniert werden und anschließend durch heterologe Genexpression in *E. coli* und Reinigung bereitgestellt werden.

3 Beschreibung und Diskussion der Ergebnisse

3.1 Molekularbiologische und enzymologische Arbeiten

Die molekularbiologischen Arbeiten zielten auf die heterologe Expression verschiedener Biosynthesegene aus *Sorangium cellulosum* So ce 307 in *Escherichia coli* (*E. coli*) ab.

Damit ein fremdes, nicht aus *E. coli* stammendes, Gen in *E. coli* überhaupt nennenswert exprimiert wird, müssen drei wichtige Bedingungen an den Transkriptions- und Translationsapparat der Zelle erfüllt sein. Erstens muss zu dem Gen ein Promotor, meist eine kurze DNA-Sequenz, vorhanden sein, um den Startpunkt der Transkription räumlich festzulegen. Bei *E. coli* wird ein Teil des Promotors von dem Sigma-Faktor der RNA-Polymerase erkannt.^[111] Zweitens muss ein Terminator einen DNA-Abschnitt festlegen, an dem die Transkription endet. Ein Terminator ist meist eine kurze DNA-Sequenz am 5'-Ende des Gens. Wird diese transkribiert, kann die resultierende mRNA Sekundärstrukturen in Form von Haarnadelstrukturen ausbilden, sodass die RNA-Polymerase von dem DNA-Strang gelöst wird. Drittens muss in der Nähe des Startcodons des Gens eine weitere kurze DNA-Sequenz vorhanden sein, die sog. Ribosomale Bindestelle (RBS). Diese Sequenz wird von den Ribosomen erkannt und markiert den Startpunkt der Translation. Um diese Mindestvoraussetzungen zu erfüllen, werden für die Expressionen Vektoren (Plasmide) eingesetzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektoren aus Tabelle 19 weisen darüber hinaus weitere Eigenschaften auf, die eine kontrollierte und effektive Genexpression, sowie eine Reinigung der Genprodukte ermöglichen. Dies soll exemplarisch am Beispiel des Vektors *pET28a(+)* erläutert werden.

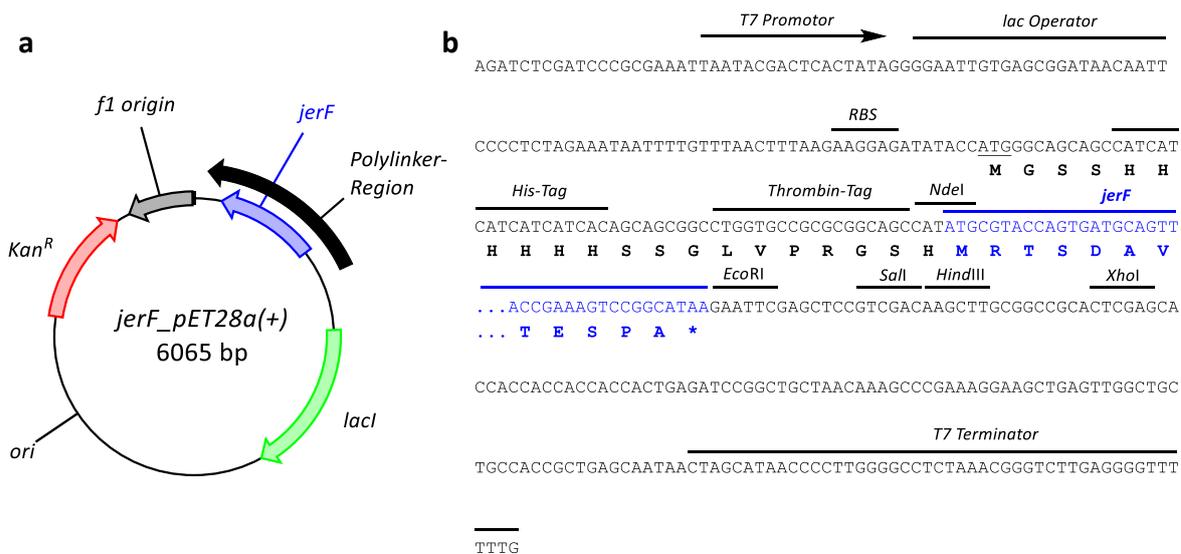


Abbildung 7: a: Schematische Darstellung des Vektors *jerF_pET28a(+)*. b: Sequenz-Ausschnitt aus der Polylinker-Region von *jerF_pET28a(+)*.

Der Vektor *pET28a(+)* (siehe Abbildung 7) besitzt in der Polylinker-Region einen T7-Promotor und einen T7-Terminator. Der T7-Promotor wird spezifisch von der RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 erkannt. Diese RNA-Polymerase ist wesentlich aktiver als das entsprechende Enzym aus *E. coli*, mit der Folge, dass die in 5'-Richtung vom T7-Promotor eingebauten Gene stark exprimiert werden.^[112] In der Polylinker-Region (engl. MCS) existieren folgerichtig viele Restriktionsschnittstellen, die für die Insertion des gewünschten Gens (z.B. *jerF* in Abbildung 7a) genutzt werden können. Da es im Genom von *E. coli* (Wild-Typ) kein Gen gibt, welches die T7-RNA-Polymerase codiert, benötigt man einen entsprechend gentechnisch veränderten Stamm von *E. coli*, der eine Kopie dieses Gens enthält.

Der häufig in dieser Arbeit verwendete Expressionsstamm *E. coli* BL21 (DE3) enthält den Bakteriophagen DE3 (λ -Phage mit der Immunitätsregion des Phagen 21) in lysogener Form und ist somit zur Herstellung von T7-RNA-Polymerase befähigt.^[113] Das Gen, welches die T7-RNA-Polymerase codiert, wird wiederum durch einen *lac*-Promotor reguliert. Bei Abwesenheit von Lactose bzw. Allolactose in der Bakterienzelle bindet das Repressorprotein LacI an den *lac*-Promotor und verhindert so eine Transkription des T7-Gens durch *E. coli*-eigene RNA-Polymerase.

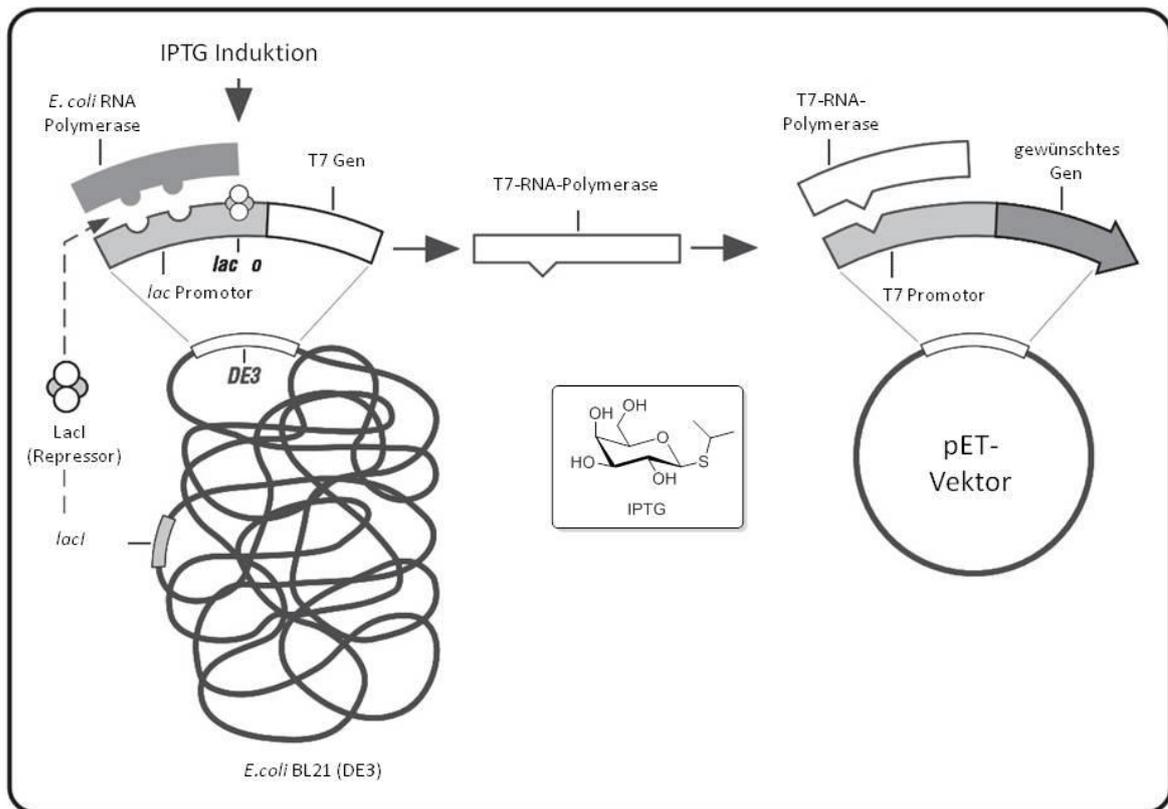


Abbildung 8: Prinzip der induktiven Genexpression durch IPTG in *E. coli* BL21 (DE3).

Das hat zur Folge, dass keine T7-RNA-Polymerase translatiert werden kann und das komplette Expressionssystem solange inaktiv bleibt, bis eine externe Stimulation (Induktion) erfolgt. Diese Induktion wird im Experiment durch die Zugabe des Lactosederivates Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) gesteuert.

IPTG kann im Gegensatz zu Lactose nicht durch *E. coli* metabolisiert werden und seine zelluläre Konzentration bleibt nach der Zugabe konstant. Als Aktivator bindet IPTG an den Repressor LacI und verursacht an diesem eine allosterische Konformationsänderung. Das hat zur Folge, dass die bindende Wechselwirkung zwischen dem Repressor und dem *lac*-Promotor aufgehoben wird und das Gen für die T7-RNA-Polymerase abgelesen werden kann.

Die daraufhin initiierte Transkription des gewünschten Gens verläuft danach so effektiv, dass das Zielprotein innerhalb weniger Stunden ca. 50% der Gesamtproteinmenge in der Zelle ausmacht. Die vollständige Kontrolle über den Zeitpunkt der Expression verhindert Plasmidinstabilitäten und ermöglicht auch die Expression von toxischen Genprodukten.

Wie in Abbildung 7b gezeigt, befindet sich zwischen der RBS und dem insertierten Gen *jerF* eine translatierte Region, die einen sog. His-Tag und einen Thrombin-Tag enthält. Die

entsprechende Aminosäuresequenz schließt sich *N*-terminal an JerF an und bildet mit diesem ein sog. Fusionsprotein. Der *His-Tag* ist eine zusammenhängende Aminosäuresequenz aus sechs Histidinen. Diese kann für eine Reinigung des Fusionsproteins durch Metallaffinitätschromatographie (siehe Seite 83) verwendet werden. Die Protease Thrombin erkennt die LVPRGS-Sequenz (codiert durch den *Thrombin-Tag*) und spaltet die Peptidbindung zwischen Arginin (R) und Glycin (G). Somit wird eine gezielte Abspaltung der Aminosäuresequenz vor dem *N*-Terminus von JerF ermöglicht, was sich positiv auf die korrekte *in-vivo*-Faltung des Proteins auswirken kann. Die Replikation des Plasmids in Bakterien, z.B. in *E. coli* One Shot® TOP10, wird durch den Replikationsursprung (*ori*) ermöglicht. Ebenso ist eine Vervielfältigung in mit f1-Phagen infizierten Bakterien durch die *f1-origin*-Sequenz möglich. Das *Kan^R*-Resistenzgen ist für die Selektion von transformierten Zellen in kanamycinhaltigen Medien essentiell.

In Tabelle 1 sind zusammenfassend die wesentlichen genetischen Eigenschaften der in der Arbeit verwendeten Expressionsvektoren aufgeführt, welche eine Expression rekombinanter Gene in *E. coli* beeinflussen.

Tabelle 1: Relevante Eigenschaften der Expressionsvektoren für die Genexpression.

Vektor	Promotor	Induktion	Merkmale der Fusionsproteine
<i>pET20b(+)</i>	T7	IPTG	<i>N</i> -terminal: <i>pelB</i> -Signalsequenz; <i>C</i> -terminal: <i>His-Tag</i>
<i>pET28a(+)</i>	T7	IPTG	<i>N</i> -term.: <i>His-Tag</i> , <i>Thrombin-Tag</i> , <i>T7-Tag*</i> ; <i>C</i> -term.: <i>His-Tag**</i>
<i>pET32a(+)</i>	T7	IPTG	<i>N</i> -term.: <i>Trx-Tag</i> , <i>His-Tag</i> , <i>Thrombin-Tag</i> , <i>S-Tag</i> ; <i>C</i> -term.: <i>His-Tag</i>
<i>pCOLDI</i>	<i>cspA</i>	15 °C, IPTG	<i>N</i> -term.: <i>TEE-Tag</i> , <i>His-Tag</i> , <i>Factor Xa-Tag</i>
<i>pGEX-4T-3</i>	<i>tac</i>	IPTG	<i>N</i> -term.: <i>GST-Tag</i> , <i>Thrombin-Tag</i>
<i>pGEX-6P-1</i>	<i>tac</i>	IPTG	<i>N</i> -term.: <i>GST-Tag</i> , <i>PreScission-Tag</i>

* Nicht vorhanden, wenn der Vektor mit *NdeI* behandelt wurde. ** Liegt nicht im verwendeten Leseraster.

In dem *pCOLDI*-Vektor wird der Promotor von *cspA* (*cold shock protein A*) verwendet.^[114,115] Wenn die Kultivierungstemperatur von *E. coli* genügend herabgesetzt wird (von 37 °C auf 15 °C), kommt die Zellteilung vorübergehend zum Stillstand und fast die gesamte Proteinbiosynthese wird eingestellt. Daraufhin erfolgt die verstärkte Bildung von sog. Kälteschockproteinen (*csp*) als Reaktion des Organismus auf die veränderten physiologischen Bedingungen. Die Ursachen dafür sind u. A. die Stringenz des *cspA*-Promotors bei 15 °C gegenüber anderen Promotorregionen in *E. coli* (z.B. *lpp*) und eine erhöhte Stabilität der *cspA*-mRNA bei niedrigen Temperaturen.^[114,115] Die Verwendung von *cspA* in *pCOLDI* führt daher zur verstärkten Bildung des gewünschten Proteins während der Kälteschockphase. Zusätzlich befindet sich in 5'-Richtung des *cspA* Promotors ein *lac*-Operator der, wie in Abbildung 8 gezeigt, eine zusätzliche Expressionskontrolle durch IPTG ermöglicht. *pGEX-4T-3* und *pGEX-6P-1* besitzen einen *tac*-Promotor, ein Hybrid aus dem *trp*- und dem *lac*-Promotor. Dieser Promotor ist stärker als die einzelnen Sequenzen und lässt sich ebenfalls durch IPTG induzieren. Des Weiteren ermöglichen beide Vektoren die Bildung von Fusionsproteinen mit *GST-Tag*. Dieser *Tag* codiert für die Glutathion-S-Transferase (GST), ein Schlüsselenzym für die Metabolisierung organismusfremder, organischer Verbindungen. Die hohe Bindungsaffinität von GST zu Glutathion kann für die Reinigung der GST-Fusionsproteine an einer glutathionhaltigen Matrix genutzt werden.

Die Genprodukte des *T7*- und *S-Tag* bilden Epitope für eine Immunodetektion. Der *Trx-Tag* codiert für die Oxidoreduktase Thioredoxin, welche einen positiven Einfluss auf die korrekte Faltung exprimierter Proteine ausüben kann.

Positiv auf die Genexpression in *E. coli* wirken sich die *pelB*-Signalsequenz und die *TEE-Tag*-Sequenz aus. *pelB*-markierte Proteine werden gezielt in das Periplasma der Zelle transportiert, was deren Stabilität verbessern kann. Der *TEE-Tag* erhöht die Translationsrate des markierten Gens in den Ribosomen.

3.1.1 Klonierung von synthetischen Genen in *pET28a(+)* und *pCOLDI*

Alle Klonierungsarbeiten wurden ausgehend von synthetischen Genen durchgeführt, welche vor Beginn der Arbeit kommerziell erhalten wurden. Diese sind bereits für die Verwendung in *E. coli*-Stämmen optimiert worden.

Um ausreichende Mengen DNA für die Klonierung zu erhalten, wurden zunächst chemisch kompetente *E. coli* TOP10®-Zellen mit den bezogenen Vektoren transformiert und auf kanamycinhaltigen Agarplatten kultiviert. *E. coli* TOP10®-Zellen weisen eine hohe Transformationsrate auf und erlauben eine effiziente Plasmidvervielfältigung *in-vivo*. Im Anschluss an die Transformation wurden positive Klone auf Agarplatten für die Inokulation von Flüssigmedium zur Erstellung einer Übernachtskultur verwendet. Nach der Isolierung und Reinigung der Plasmid-DNA (*Miniprep*) erfolgte der Restriktionsverdau mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen, um komplementäre DNA-Überhänge für die Insertion in die Expressionsvektoren zu generieren. Für die Konstrukte *jerE7(TE)_pMK-T*, *jerF_pMK-T*, *jerP_pMK-T* und *jerL_pMK* wurden jeweils *NdeI* und *EcoRI* verwendet. Für die Restriktion von *jerO_pMK* wurde *NdeI* und *HindIII* verwendet.

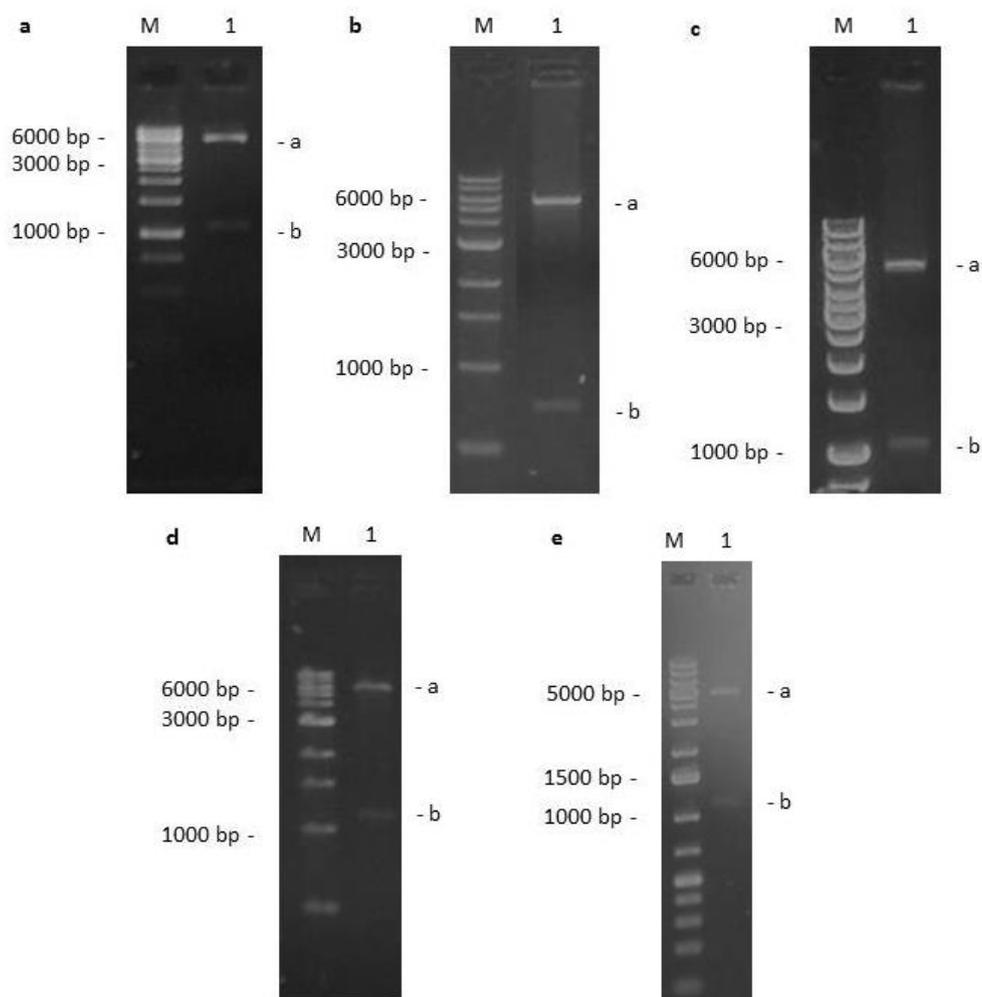


Abbildung 9: Agarosegele (1%) unter UV-Licht nach doppeltem Restriktionsverdau, angefärbt mit Ethidiumbromid. **a:** **M** = Markerbande; **1** = *jerL_pET28a(+)* verdaut mit *NdeI* und *EcoRI*. **b:** **M** = Markerbande; **1** = *jerF_pET28a(+)* verdaut mit *NdeI* und *EcoRI*. **c:** **M** = Markerbande; **1** = *jerP_pET28a(+)* verdaut mit *NdeI* und *EcoRI*. **d:** **M** = Markerbande; **1** = *jerE7(TE)_pET28a(+)* verdaut mit *NdeI* und *EcoRI*. **e:** **M** = Markerbande; **1** = *jerO_pET28a(+)* verdaut mit *NdeI* und *HindIII*. Größe der DNA-Fragmente: *pET28a(+)*: 5323 bp; *jerL*: 1080 bp; *jerF*: 696 bp; *jerP*: 1068 bp; *jerE7(TE)*: 1107 bp; *jerO*: 1140 bp.

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Restriktionsansätze konnten die so erhaltenen, linearisierten DNA-Fragmente aus Agarosegel extrahiert, gereinigt und durch die Insertion in die linearisierten Vektoren rezykliert.

Das Einbringen der synthetischen Gene in *pET28a(+)* und *pCOLDI* konnte auf diese Weise erfolgreich durchgeführt werden. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden Testrestriktionen (siehe Abbildung 9) und DNA-Sequenzierung (GATC Biotech oder Eurofins Scientific SE) durchgeführt. In Abbildung 9a-e sind die charakteristischen DNA-Banden nach einer Testrestriktion von den rekombinanten *pET28a(+)*-Konstrukten im Agarosegel visualisiert. Der Vergleich der Bandenhöhe mit dem jeweils aufgetragenen DNA-Standard (Marker, M) ermöglicht es, eine Aussage über die ungefähre Größe der DNA-Fragmente (ausgedrückt in bp) zu treffen. In Abbildung 9a ist eine intensive Bande (a) bei ca. 6000 bp zu erkennen, welche dem linearisierten *pET28a(+)*-Vektor (5323 bp) zugeordnet werden kann. Des Weiteren ist eine Bande mit geringerer Intensität (b) bei ca. 1100 bp zu erkennen, welche *jerL* (1080 bp) zugeordnet werden kann. Der Intensitätsunterschied zwischen beiden Banden hat verschiedene Ursachen. Zum einen ist die Anzahl der in die DNA interkalierten Ethidiumbromid-Moleküle proportional zu der Anzahl an vorhandenen Nukleobasen, d.h. längere DNA-Fragmente fluoreszieren stärker als kürzere. Zusätzlich kommt es durch Diffusionseffekte zur Intensitätsminderung bei Banden mit einer längeren Laufstrecke (kürzere DNA-Fragmente) im Gel. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid ist in Lösung positiv geladen und wandert somit während der Elektrophorese zur Anode und reichert sich somit im oberen Teil des Gels an.

In den Abbildung 9 finden sich ebenfalls je eine Bande für den linearisierten *pET28a(+)*-Vektor und jeweils eine für das insertierte Gen. DNA-Sequenzierung der *pET28a(+)*-und *pCOLDI*-Konstrukte ergab, dass alle erhaltenen rekombinanten Plasmide frei von Mutationen waren. Die rekombinanten Plasmide wurden daraufhin in die Expressionstämme von *E. coli* eingebracht.

3.1.2 Klonierung von synthetischen Genen in *pET20b(+)*, *pGEX-4T-3* und *pGEX-6P-1*

Für die Klonierung in die Vektoren *pET20b(+)*, *pGEX-4T-3* und *pGEX-6P-1* wurden die 5'- und 3'-Enden der synthetischen Gene *jerE7(TE)*, *jerF*, *jerO*, *jerP* und *jerL* angepasst. Ein Grund hierfür ist, dass die Vektoren der *pGEX*-Serie keine *NdeI*-Schnittstelle aufweisen. Zur Vereinheitlichung der Experimente sollten daher alle fünf Gene über eine *EcoRI*-Schnittstelle am 5'-Ende und über eine *XhoI*-Schnittstelle am 3'-Ende in die Vektoren eingebracht werden. Zusätzlich sollte das Stop-codon vor der neu eingeführten *XhoI*-Erkennungssequenz (5'-CTCGAG-3') entfernt werden. Zu diesem Zweck wurden Primerpaare (siehe Tabelle 20) entworfen, um diese Änderungen in den DNA-Sequenzen über die Polymerasekettenreaktion (*PCR*) zu realisieren.

Unter einem Primer versteht man hierbei eine kurze DNA-Sequenz, welche als Startpunkt für eine DNA-replizierende Polymerase (DNA-Polymerase) fungiert. Die DNA-Polymerase katalysiert den nucleophilen Angriff einer endständigen Hydroxygruppe am 3'-C der Desoxyribose auf die α -Phosphatgruppe eines Desoxynukleosidtriphosphats (dNTP) unter Abspaltung von Pyrophosphat (Abbildung 10b).

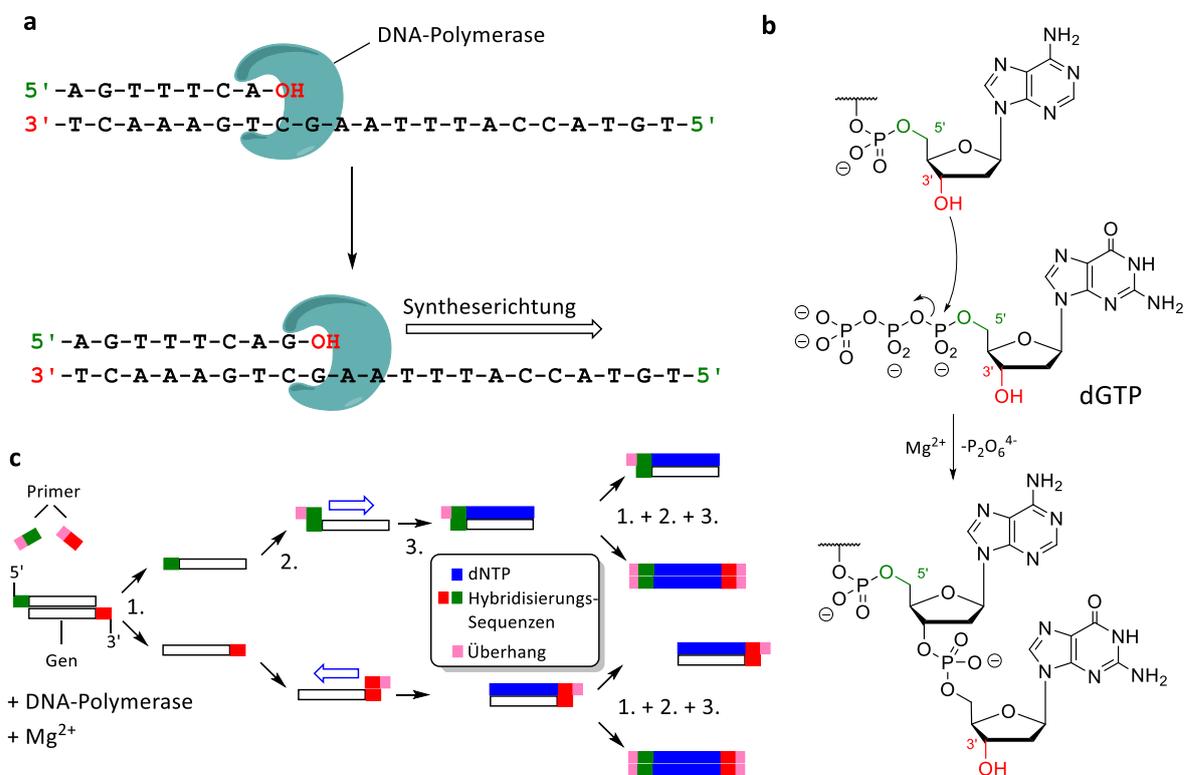


Abbildung 10: a: Vereinfachte schematische Darstellung der templatgesteuerten DNA-Synthese. b: Reaktionsschema für die polymerasekatalysierte, nucleophile Substitution. c: Vereinfachtes Fließschema zum Verlauf der Polymerasekettenreaktion: 1. Denaturierung, 2. Hybridisierung, 3. Elongation.

Auf diese Weise kann ein zu einem Matrizenstrang komplementärer DNA-Strang synthetisiert werden. Die Syntheserichtung erfolgt dabei stets vom 5'-Ende zum 3'-Ende des neugebildeten Stranges. Dieses universelle Prinzip der *in-vivo*-Replikation von DNA im Zuge der Zellkernteilung kann für die *in-vitro*-Synthese von doppelsträngiger DNA genutzt werden. Der theoretische Ablauf einer konventionellen *PCR* ist in Abbildung 10c dargestellt.

Im ersten Schritt wird ein Molekül doppelsträngiger DNA, welches die zu amplifizierende Gensequenz enthält, durch Erhitzen auf 95 °C in zwei komplementäre Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung).

Im zweiten Schritt wird die Temperatur auf einem Wert gehalten, der eine sequenzspezifische Anlagerung der in Lösung vorhandenen Primer an die Einzelstränge erlaubt (Primerhybridisierung). Ein Primer besitzt dafür einen Sequenzbereich von ca. 6-15 Nukleotiden, der die Hybridisierungstemperatur vorgibt und komplementär zum 5'- oder 3'-Ende eines jeweiligen Einzelstranges ist. An diese Hybridisierungssequenz schließt sich eine kurze Nukleotidsequenz, der sog. Überhang, an. Über diese Überhänge können nun gezielt Sequenzen, beispielsweise für Restriktionsschnittstellen oder Codons, in die Amplifikate eingebracht werden.

Im dritten Schritt erfolgt die eigentliche Polymerisation (Elongation) bei 72 °C. Die entscheidende Verbesserung der *PCR*-Technologie war die Optimierung des Elongationsschritts durch die Einführung thermostabiler DNA-Polymerasen im Jahr 1988.^[116] DNA-Polymerasen aus thermophilen Mikroorganismen wie *Thermus aquaticus* (Taq) oder *Pyrococcus furiosus* (Pfu) haben eine ausreichend hohe Halbwertszeit unter den *PCR*-Temperaturbedingungen und mit ihrem Einsatz bestand keine Notwendigkeit mehr, der Reaktion ständig neue Polymerase zuzugeben. Somit konnte der gesamte Prozess erheblich effizienter und automatisierter gestaltet werden. Die drei Schritte der *PCR* können bis zu 30-mal wiederholt werden wobei die Zahl der Amplifikate gewünschter Länge exponentiell zunimmt. Wie aus Abbildung 10c ersichtlich, erhält man theoretisch aus einem Molekül Templat-DNA nach dem zweiten Zyklus der *PCR* zwei Amplifikate gewünschter Länge. Nach insgesamt 30 Zyklen ergibt das die Bildung von 2^{28} Molekülen doppelsträngiger DNA mit identischer Sequenz.

In Abbildung 11 ist das Resultat einer *PCR* zur Modifizierung der 3'- und 5'-Enden der synthetischen Gene bei verschiedenen Hybridisierungstemperaturen (T_H) dargestellt. Es

wurde die Phusion® *High-Fidelity*-DNA-Polymerase verwendet, welche eine zusätzliche 3' → 5'-Exonukleaseaktivität („Korrekturlesefunktion“) und damit eine geringere Fehlerrate aufweist. Die Berechnungen der Richtwerte für T_H erfolgten mit thermodynamischen Parametern nach BRESLAUER *et al.*^[117], unter Berücksichtigung der Salzkonzentrationen.^[118] Als Template wurden jeweils 2 μ L des entsprechenden *pET28(+)*-Konstruktes (ca. 10 ng DNA) verwendet.

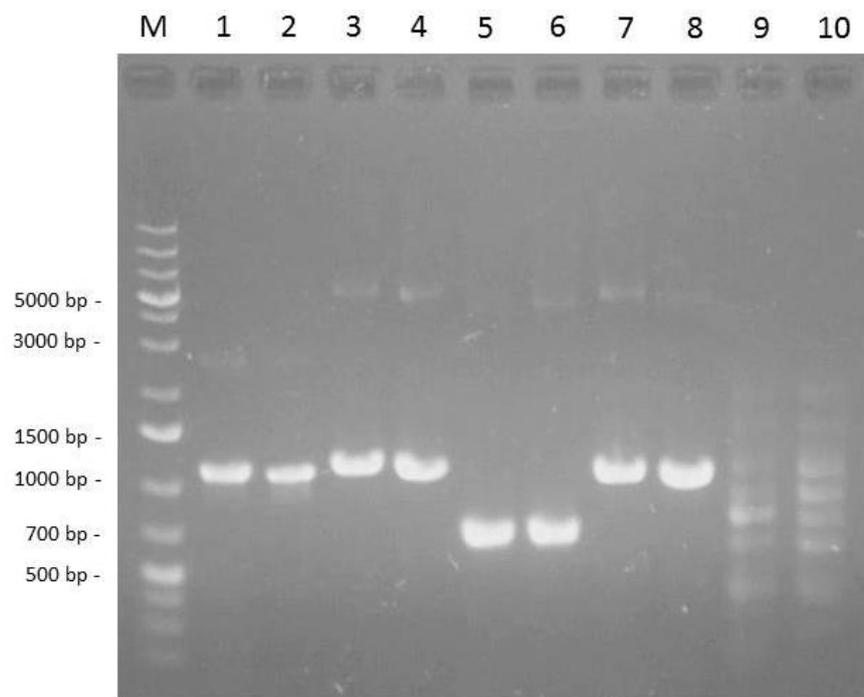


Abbildung 11: Agarosegel (1%) unter UV-Licht nach einer PCR, angefärbt mit Roti®-GelStain. T_H : Hybridisierungstemperatur; für Primerdetails siehe Tabelle 20. **M** = Markerbande; **1** = *jerL* (T_H = 59.3 °C, Primer P17, P18); **2** = *jerL* (T_H = 67.5 °C, Primer P17, P18); **3** = *jerO* (T_H = 65.8 °C, Primer P20, P21); **4** = *jerO* (T_H = 61.4 °C, Primer P20, P21); **5** = *jerF* (T_H = 63.5 °C, Primer P14, P15); **6** = *jerF* (T_H = 64.5 °C, Primer P14, P15); **7** = *jerE7(TE)* (T_H = 62.5 °C, Primer P11, P12); **8** = *jerE7(TE)* (T_H = 66.8 °C, Primer P11, P12); **9** = *jerP* (T_H = 61.3 °C, Primer P23, P24); **10** = *jerP* (T_H = 67.9 °C, Primer P23, P24).

Für die Amplifizierung von *jerL* lieferte eine konstante Hybridisierungstemperatur von 67.5 °C ein optimales Resultat (Bahn 2 in Abbildung 11). Eine Erniedrigung von T_H auf 59.3 °C (Bahn 1 in Abbildung 11) lieferte, neben der gewünschten Bande bei ca. 1100 bp (*jerL*: 1080 bp), ein zweites Amplifikat bei ca. 2800 bp. Für *jerO* konnte Amplifikat gewünschter Größe (Bahn 3 und 4 in Abbildung 11, *jerO*: 1140 bp) erhalten werden. Hierbei könnte eine weitere Erhöhung der T_H um 3-4 °C die Bildung des ungewünschten Amplifikats bei ca. 5000 bp komplett unterdrücken. Generell erhöht sich mit der Hybridisierungstemperatur die Spezifität der Primer-Hybridisierung. Höhere Temperaturen in den Hybridisierungsphasen der PCR können allerdings einen negativen Effekt auf die Gesamtausbeute an Amplifikat haben. Für die Amplifizierung von *jerF*

lieferte $T_H = 63.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ein optimales Ergebnis (Bahn 5 in Abbildung 11, *jerF*: 696 bp). Für *jerE7(TE)* (1107 bp) konnte bei $T_H = 66.8 \text{ }^\circ\text{C}$ noch eine schwache Bande bei ca. 5000 bp detektiert werden, welche durch eine Erhöhung von T_H um 2-3 $^\circ\text{C}$ eliminiert werden könnte. Die Amplifikation von *jerP* (Bahn 9 und 10 in Abbildung 11, *jerP*: 1068 bp) war nicht erfolgreich und führte zur vermehrten Bildung kurzer, unspezifischer Amplifikate in geringen Konzentrationen. In einem Wiederholungsexperiment konnte *jerP* erfolgreich mit frisch präparierten Plasmid als Templat amplifiziert werden ($T_H = 62.5 \text{ }^\circ\text{C}$, Primer P23, P24, siehe Tabelle 20).

Nach erfolgter Genervielfältigung durch *PCR* konnten die Banden aus den Agarosegelen (siehe Abbildung 11) ausgeschnitten, gereinigt, enzymatisch verdaut (mit *EcoRI* und *XhoI* nach Tabelle 7) und in die linearisierten Vektoren *pET20b(+)*, *pGEX-4T-3* und *pGEX-6P-1* eingebracht werden. Dieser Klonierungsansatz wurde zwar in der Arbeit erfolgreich angewendet, scheiterte jedoch des Öfteren an den Reinigungsschritten nach der Agarosegelextraktion, da diese mit hohen Ausbeuteverlusten verbunden sind. Außerdem geht jeder Gelextraktionsschritt mit einer zusätzlichen UV-Lichtexposition der DNA einher, was unter Umständen zu Punktmutationen führen kann. Erfolgreicher erwies sich ein alternativer Ansatz über eine direkte Ligation der unbehandelten *PCR*-Produkte in den linearisierten *pJET1.2/blunt*-Vektor und anschließender Transformation von *E. coli* OneShot TOP10[®]-Zellen. Nach Plasmidpräparation konnte dann die Klonierung analog zu Seite 78 durchgeführt werden. Auf diese Weise entfiel ein Gelextraktionsschritt und durch das Einbringen in *E. coli* konnte beliebig viel Plasmid-DNA für nachfolgende Schritte reproduziert werden.

3.1.3 Genexpression und Isolierung von Fusionsproteinen

3.1.3.1 Thioesterase-Domäne His₆-JerE7(TE)

Die Thioesterase-Domäne JerE7(TE) besteht aus 364 Aminosäuren und hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 40.2 kDa. Sie besteht aus der eigentlichen Thioesterase-Domäne (242 AS) sowie dem vollständigen *Acyl Carrier Protein (ACP)* aus dem PKS-Modul 7 (86 AS). Beide sind durch eine kurze Sequenz (36 AS) voneinander getrennt.^[119] Die Thioesterase gehört zu der Esterase/Lipase-Superfamilie von Enzymen,

welche eine katalytische Triade bestehend aus Serin, Glutamat oder Aspartat und Histidin aufweisen.

Die Genexpression erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid *jerE7(TE)_pET28a(+)*. Zur Bestimmung geeigneter Expressionsbedingungen für die Bildung von löslichem Protein wurden Testexpressionen durchgeführt. In Tabelle 2 ist eine Auswahl der durchgeführten Experimente gezeigt.

Tabelle 2: Parameter für die Expression von *jerE7(TE)_pET28a(+)* in *E. coli* BL21(DE3).

Ansatz	Medium	T _{Exp} [°C]	t _{Exp} [h]	OD ₆₀₀ bei Induktion	c _{IPTG} [mM]	m _{Pellet} [g]	c _{Protein} [mg/mL]
1	LB	28	19	0.8	0.1	0.65	3.7
2	2TY	25	23	1.3	0.1	0.70	7.8
3	2TY	16	23	1.2	0.1	1.20	7.5
4	2TY	16	3	0.6	0.1	n.b.	0.3
5	2TY	16	23	0.6	0.1	n.b.	3.9

T_{Exp}: Expressionstemperatur, t_{Exp}: Expressionszeit (Zeit zwischen Induktion und Zellernte), c_{IPTG}: IPTG-Konzentration am Zeitpunkt der Induktion, m_{Pellet}: Zellmasse nach Zentrifugation, c_{Protein}: Gesamtproteinkonzentration. Der grau hervorgehobene Ansatz lieferte das beste Expressionsprofil.

Alle Expressionen wurden in 50 mL Medium (250-mL-Erlenmeyerkolben) durchgeführt. Entsprechend den Bedingungen aus Tabelle 2, Eintrag 2 wurde ebenfalls eine Negativkontrolle (*pET28a(+)*) mitgeführt, um die Basalexpression von *E. coli* BL21(DE3) für die folgende Analytik zu bestimmen. Erwartungsgemäß stieg die gewonnene Zellmasse und Gesamtproteinmenge mit längerer Expressionszeit und durch die Verwendung eines nährstoffreicheren Mediums (2TY statt LB-Medium). Idealerweise sollte die Induktion mit IPTG bei einer optische Zelldichte zwischen 0.5 und 1.0 erfolgen.

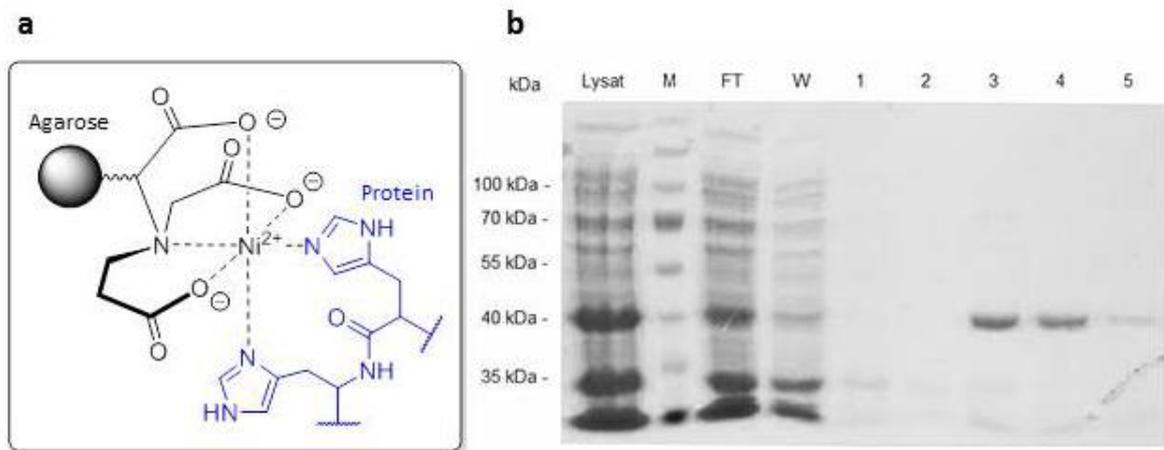


Abbildung 12: a: Koordinative Wechselwirkungen zweier benachbarter Histidine mit immobilisierten Nickelionen. b: SDS-PAGE nach Affinitätschromatographie von löslichen His₆-JerE7(TE). **M:** Marker; **FT:** Säulendurchlauf; **W:** Waschpuffer-Fraktion; **1:** Eluat (5 mM ImH); **2:** Eluat (20 mM ImH); **3:** Eluat (100 mM ImH); **4:** Eluat (200 mM ImH); **5:** Eluat (500 mM ImH). Theoretische Masse His₆-Jer7 = 42.5 kDa.

Die Analyse der Ansätze durch SDS-PAGE ergab, dass es unter allen Bedingungen zu einer induzierbaren Bildung von zwei Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa bzw. 30 kDa kommt (siehe Abbildung 12b). Die nachfolgende Analyse der SDS-gele nach Affinitätschromatographie zeigte, dass es sich bei dem einem Protein um das gewünschte Fusionsprotein His₆-JerE7(TE) handelte (die berechnete Masse beträgt 42.5 kDa). Das Zielprotein befand sich nach dem Zellaufschluss sowohl in der löslichen-(Lysat), als auch in der unlöslichen Fraktion (Pellet). In der unlöslichen Fraktion machte es fast den gesamten Proteinanteil aus.

Die Reinigung und Isolierung von His₆-JerE7(TE) erfolgte ausgehend von der löslichen Fraktion des Zellaufschlusses aus Eintrag 3 in Tabelle 2. Dazu wurde eine Metallaffinitätschromatographie durchgeführt, wobei als stationäre Phase eine mit Ni²⁺-Ionen beladene Nitrilotriessigsäure-Agarosematrix (Ni-NTA) verwendet wurde (siehe Abbildung 12a). Das Trennprinzip beruht auf der Retention von Proteinen mit poly-Histidinsequenzen durch Chelatisierung der Nickelionen mit Imidazolseitenketten der Histidine.

Abbildung 12b zeigt den erzielten Reinigungserfolg für His₆-JerE7(TE) mittels Affinitätschromatographie. Es wurden 4 mL (ca. 30 mg Gesamtproteinmenge) des Lysats pro 1 mL Säulenmatrix verwendet. Anhand der Banden für den Säulendurchlauf (FT-Bande in Abbildung 12b) wird ersichtlich, dass ein Teil der enthaltenen Proteine nicht an das Säulenmaterial gebunden hat. Durch Waschen mit TRIS-Bindepuffer (100 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 8.0) wurde bereits der größte Teil der ungewünschten Proteine

(MW \leq 35 kDa) von der Säule entfernt. Das gewünschte Protein konnte mit 100 – 200 mM Imidazolpuffer eluiert werden (siehe Abbildung 12b, Bande 3 und 4).

Für eine abschließende Charakterisierung des 40 kDa-Protein aus Fraktion 3 und 4 aus Abbildung 12 wurden Flugzeitmassenspektren aufgenommen. Dazu wurden 2 mL der Fraktion 4 konzentriert, in 100 μ L salzarmen Puffer (10 mM TRIS, 50 mM NaCl, pH 8.0) gelöst und massenspektrometrisch untersucht.

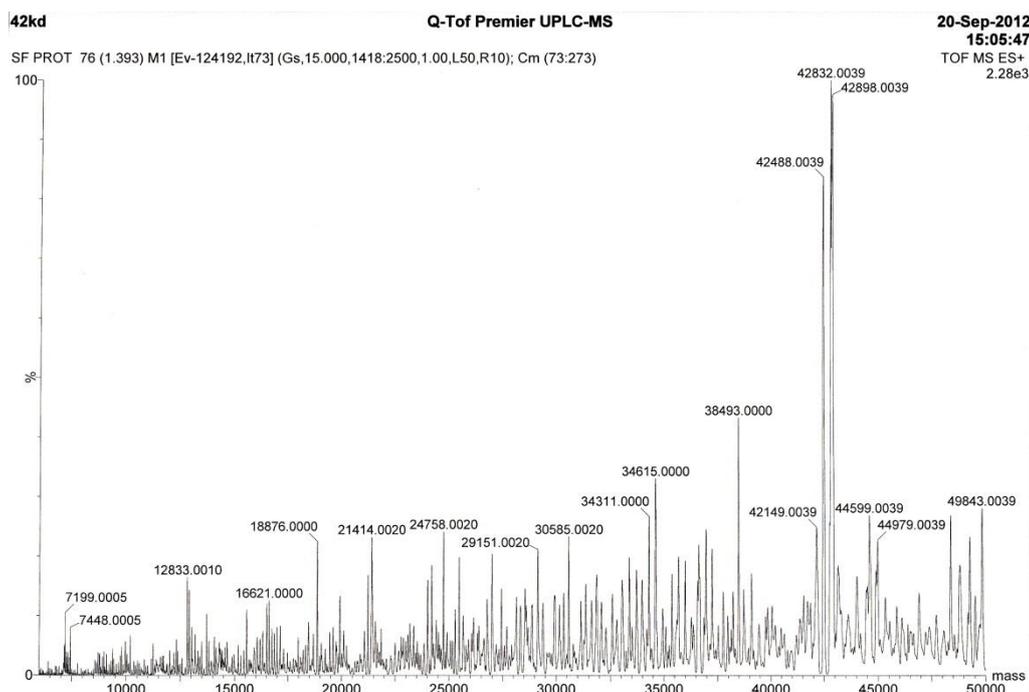


Abbildung 13: Flugzeitmassenspektrum der Thioesterase JerE7. Monoisotopische molekulare Masse His₆-JerE7: 42441.92 Da (385 AS); mittlere molekulare Masse His₆-JerE7: 42468.77 Da. Detektierte Massen: 42488.00 Da, 42832.00 Da, 42898.00 Da.

Die detektierte Masse von 42488.00 Da stimmt zu 99.9% mit der monoisotopischen Masse des erwarteten Fusionsproteins überein.

3.1.3.2 O-Methyltransferase His₆-JerF

Die O-Methyltransferase JerF besteht aus 228 Aminosäuren und hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 25.3 kDa. Eine Sequenzanalyse zeigte charakteristische Motive für eine S-Adenosyl-L-methionin-abhängige Methyltransferase der Klasse I.^[99] Das VGVGTGY-Motiv ist beispielsweise für die Bindung des Adenins im Cofaktor verantwortlich. Weiterhin existiert eine für diese Enzymklasse hochkonservierte, saure Aminosäure (D81) für eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Hydroxyfunktion

der Ribose.^[119] JerF weist Homologien zu den Pyron-methylierenden O-Methyltransferasen Aurl aus der Aureothin-Biosynthese^[108,120] und Enck aus der Enterocin-Biosynthese auf.^[121]

Die Genexpression in *E. coli* BL21(DE3) mit dem Plasmid *jerF_pET28a(+)* wurde wiederholt unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt (siehe Tabelle 3), führte aber stets zur Bildung von unlöslichem Protein. Eine Reinigung der löslichen Fraktion nach Zellaufschluss durch Metallaffinitätschromatographie, wie auf Seite 83 beschrieben, führte zu keiner Isolierung des gewünschten Fusionsproteins His₆-JerF (27.5 kDa).

Tabelle 3: Parameter für die Expression von *jerF_pET28a(+)* in *E. coli* BL21(DE3).

Ansatz	Medium	T _{exp} [°C]	t _{exp} [h]	OD ₆₀₀ bei Induktion	C _{IPTG} [mM]	m _{Pellet} [g]	C _{Protein} [mg/mL]
1	2TY	32	3.7 h	0.8	0.1	1.16	0.03
2	2TY	32	3.7 h	0.8	0.3	1.02	0.03
3	2TY	28	5.5 h	0.8	0.1	1.32	0.09
4	2TY	28	5.5 h	0.8	0.3	0.90	0.05
5	2TY	25	23 h	1.0	0.1	0.70	4.40
6	2TY	16	18 h	0.8	0.1	1.00	n.b.

Daraufhin wurden Genexpressionen mit *jerF_pCOLDI* in *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* RosettaTM(DE3)pLysS durchgeführt. Das durch Expression von *jerF_pCOLDI* gebildete Fusionsprotein His₆-JerF hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 27.3 kDa und einen theoretischen isoelektrischen Punkt P_i = 8.84. Die Expressionen erfolgten in 100 mL 2TY-Medium mit 1% D-Glucose (v/v). Die Zugabe von D-Glucose beschleunigt das Wachstum der Zellen bei 37 °C. Bei einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 0.6 erfolgte ein schneller Temperaturwechsel von 37 °C auf 15 °C für 30 min (Kälteschock), gefolgt von der Induktion mit IPTG. Für die Expression bei 15 °C wurden verschiedene Induktions- und Aufschlussbedingungen getestet. In Abbildung 14a ist der Einfluss von 0.1 mM IPTG auf die 24-stündige Expression bei 15 °C gezeigt. Nach dem Zellaufschluss in einem Phosphat-Bindepuffer (pH 7.4, siehe Tabelle 22) ist in der induzierten Probe das gewünschte Protein in großen Mengen in der unlöslichen Fraktion und in der löslichen Fraktion in geringen

Mengen vorhanden. Die nicht-induzierte Probe weist unter identischen Bedingungen keinerlei Banden im Bereich von 27 kDa auf.

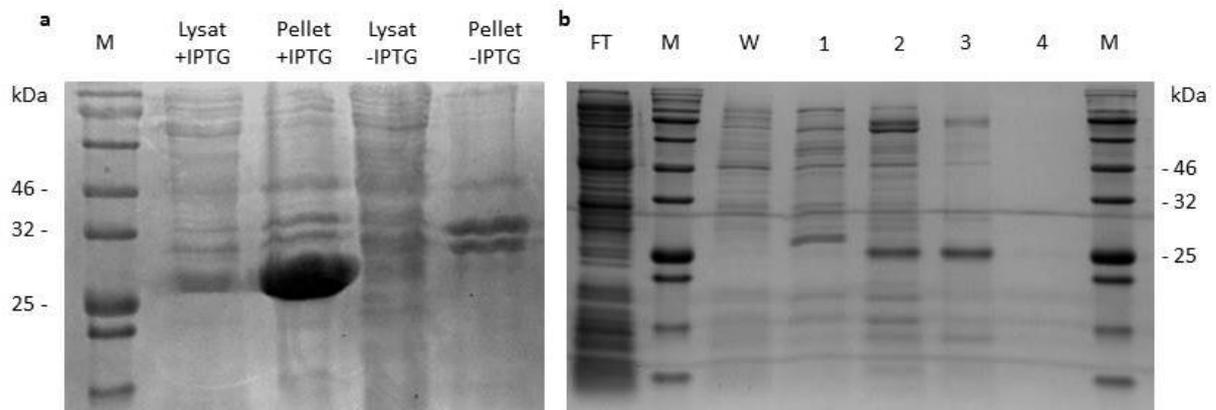


Abbildung 14: a) SDS-PAGE nach Zellaufschluss von *jerF_pCOLDI* in *E. coli* BL21(DE3). **M:** Marker; induzierte Proben sind mit „+IPTG“ bezeichnet; nicht-induzierte Proben sind mit „-IPTG“ bezeichnet. b) SDS-PAGE nach Affinitätschromatographie von löslichem His₆-JerF nach Expression von *jerF_pET20b(+)* in *E. coli* BL21(DE3). **M:** Marker; **FT:** Säulendurchlauf; **W:** Waschpuffer-Fraktion; **1:** Eluat (20 mM ImH); **2:** Eluat (50 mM ImH); **3:** Eluat (100 mM ImH); **4:** Eluat (200 mM ImH). Theoretische Masse His₆-JerF = 26.4 kDa.

Massenspektrometrische Untersuchungen (Prof. Dr. Braun, Universität Hannover) der Gelbanden im Lysat und Pellet bestätigten, dass es sich bei dem induzierten Protein um JerF handelt.

Nachdem der Nachweis erbracht wurde, dass die Expression nach 24 h in geringem Umfang auch lösliches Protein gewünschter Masse ergibt, wurde der zeitliche Verlauf der Expression näher untersucht. Dazu wurden durch Kälteschock und IPTG induzierte Zellen von *E. coli* BL21(DE3) mit *jerF_pCOLDI* nach jeweils 2, 4 und 22 h Expression geerntet und aufgeschlossen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Zeitabhängigkeit der Expression von *jerF_pCOLDI* in *E. coli* BL21(DE3).

Ansatz	t_{exp} [h]	m_{Pellet} [g]	C_{Protein} [mg/mL]	m_{Protein} [mg]	Kommentar
1	2 h	0.33	1.88	13.2	Schwache 27-kDa-Bande im Lysat und im Pellet.
2	4 h	0.28	1.96	13.7	Schwache 27-kDa-Bande im Lysat, starke 27-kDa-Bande im Pellet.
3	22 h	0.55	3.92	27.4	Schwache 27-kDa-Bande im Lysat, sehr starke 27-kDa-Bande im Pellet.

Die Induktion erfolgte jeweils durch Kälteschock für 1 h und anschließender Zugabe von 0.1 mM IPTG bei $OD_{600} = 1.2$. Die Analyse der Aufschlussfraktionen lässt einen starken Anstieg der Bildung von unlöslichen His₆-JerF mit zunehmender Expressionszeit erkennen. Der Anteil an löslichem Protein bleibt im zeitlichen Verlauf von 2 h nach 22 h nahezu unverändert. Die ungefähre Verdopplung der Proteingesamtkonzentration im Lysat von Ansatz 3 im Vergleich zu Ansatz 1 ist vor allem dadurch zu erklären, dass es bei längerer Expressionszeit zu einer vermehrten Bildung unspezifischer Proteine kommt.

Wie in Abbildung 14 gezeigt, führt die Expression von *jerF_pCOLDI* vorrangig zur Bildung von unlöslichen Proteinen. In darauffolgenden Versuchsreihen wurden daher verschiedene Detergenzien getestet, um unlösliches His₆-JerF nach dem Aufschluss zu solubilisieren. Dieses Verfahren ist für membranständige und transmembrane Proteine etabliert.^[122,123] Zu diesem Zweck wurden geringe Mengen Zellpellet nach dem Aufschluss in einem Detergenz über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation wurde der Überstand mittels SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 15). Die Inkubation mit dem anionischen Tensid *N*-Lauroylsarcosin (Bahn 1, Abbildung 15) führte zu einer sehr effektiven Solubilisierung, während nichtionische Tenside keinen nennenswerten Effekt erzielten. Eine weitere Reinigung der mit *N*-Lauroylsarcosin solubilisierten Proteine durch Ni-NTA konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden, da es zu keiner Bindung von Protein an die Säulenmatrix kam. Die Anteile an *N*-Lauroylsarcosin im Lysat konnten auch nicht durch Gelfiltration entfernt werden.

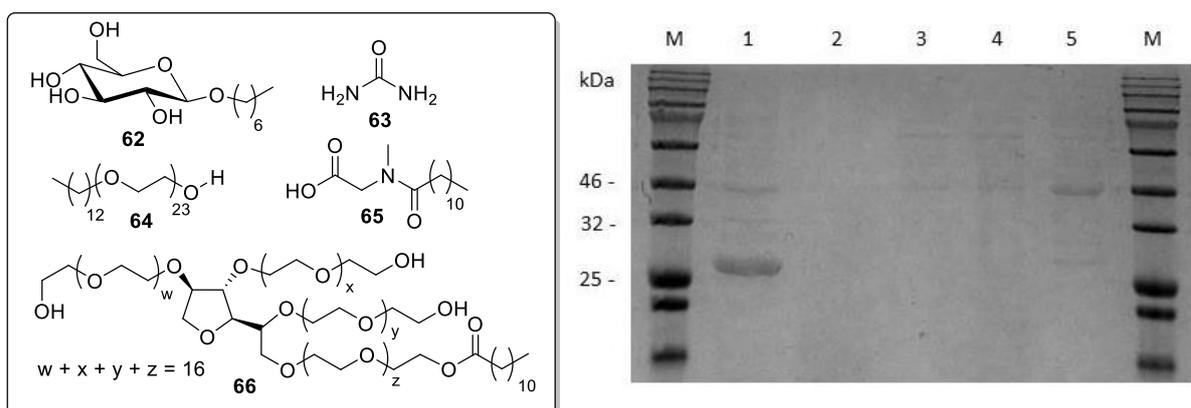
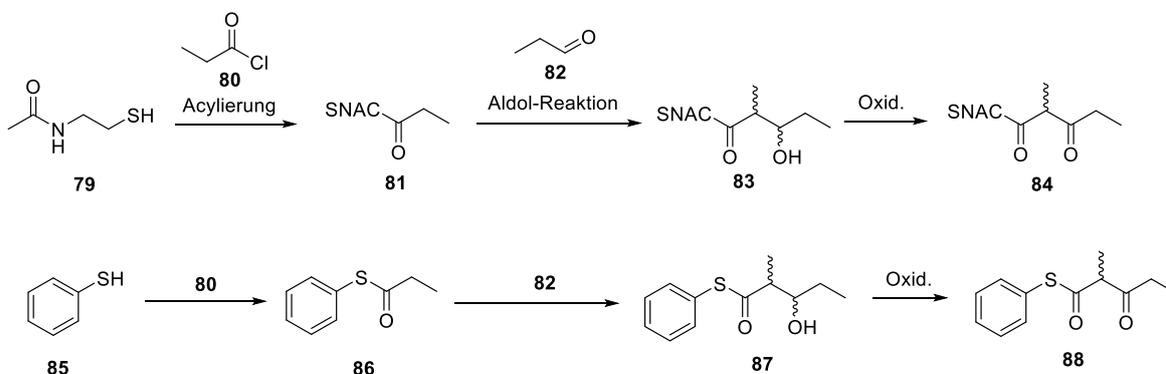


Abbildung 15: Verwendete Detergenzien zur Solubilisierung von unlöslichem His₆-JerF. SDS-PAGE von Lysaten nach Solubilisierungsversuchen. **1:** *N*-Laurylsarcosin (**65**), 1% in H₂O_{dd}; **2:** Polyoxyethylen (23) laurylether (**64**), 23.5 mM in H₂O_{dd}; **3:** Octyl-β-D-glucopyranosid (**62**), 30 mM in TBS-Puffer; **4:** Polysorbat 20 (**66**), 1% in H₂O_{dd}; **5:** Harnstoff (**63**), 4 M in H₂O_{dd}.

Lösliches His₆-JerF konnte erfolgreich durch Expression von *jerF_pET20b(+)* in *E. coli* BL21(DE3) erhalten werden. Das durch die Expression von *jerF_pET20b(+)* gebildete

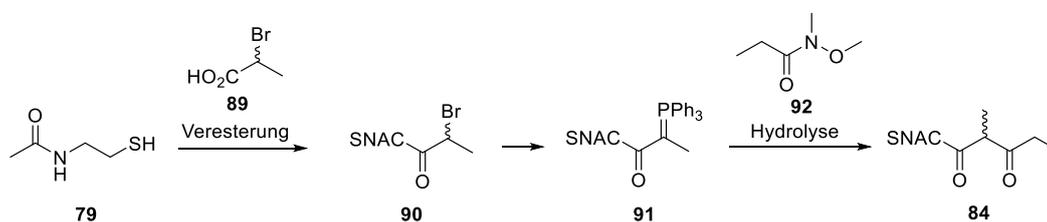
Fusionsprotein His₆-JerF hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von 26.4 kDa und einen theoretischen isoelektrischen Punkt $P_I = 8.3$. Die Polyhistidin-Sequenz befindet sich im Unterschied zu den bisher beschriebenen Fusionsproteinen von JerF an dessen C-Terminus. Diese Änderung der Proteinstruktur war ausschlaggebend für die erfolgreiche Reinigung des löslichen Proteins mittels Ni-NTA. In der Elutionsfraktion 3 in Abbildung 14b ist eine deutliche Anreicherung eines Proteins im gewünschten Massenbereich von ca. 26 kDa erkennbar. Eine weitere Optimierung der Reinigung durch Affinitätschromatographie wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Um geeignete Reaktionsbedingungen für die ungerichtete Aldolreaktion aus Schema 14b zu etablieren, wurden Testreaktionen mit Propionaldehyd (**82**) und den Thioestern **81** und **86** durchgeführt. Auf diese Weise wurden die strukturell einfacheren β -Keto-Thioester **84** und **88** nach dem in Schema 15 gezeigten Weg synthetisiert.



Schema 15: Synthesepfad zur Darstellung der β -Ketothioester **84** und **88**. Die propionierten Thioester **81** und **86** wurden unter verschiedenen Bedingungen mit Propionaldehyd zur Reaktion gebracht.

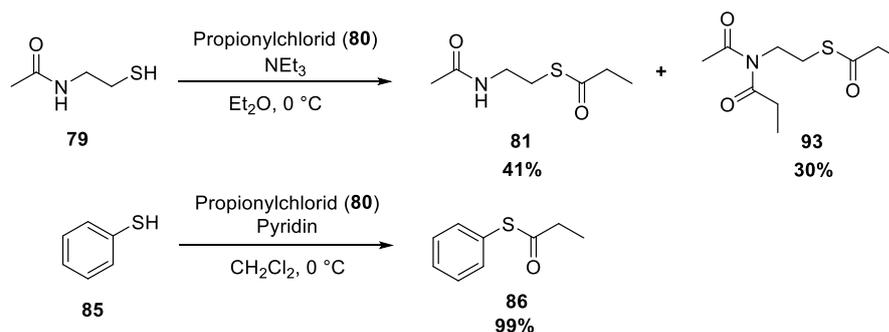
Weiterhin wurde für die Darstellung von **84** eine von MURPHY *et al.*^[124] beschriebene WITTIG-Reaktion zur Darstellung von Carbonylverbindungen aus Weinrebamiden getestet (siehe Schema 16).



Schema 16: Alternativer Synthesepfad für die Darstellung von **84** über das Phosphor-Ylen **91** nach Murphy *et al.*^[124]

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte aus Schema 14, Schema 15 und Schema 16 ausführlich beschrieben.

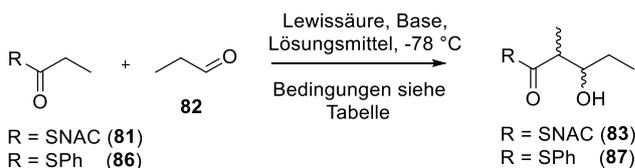
Für die Darstellung des Thioesters **81** wurde *N*-Acetylcysteamin (**79**) mit Propionylchlorid *S*-acyliert (siehe Schema 17). Die Ausbeute dieser Reaktion betrug 41% und es konnte unter den verwendeten Reaktionsbedingungen das *N,N*-bis-Acylamid **93** als Nebenprodukt isoliert werden. Die Darstellung von Thioester **86** erfolgte analog mit Thiophenol (**85**) und Propionylchlorid unter Verwendung von Pyridin als Base (Schema 17). Diese Reaktion lieferte das gewünschte Produkt **86** in nahezu quantitativer Ausbeute.



Schema 17: Ergebnis der Acylierung von *N*-Acetylcysteamin (**79**) und Thiophenol (**85**). Unter den verwendeten Reaktionsbedingungen wurden die gewünschten Produkt **81** und **86** in 41% bzw. 99% Ausbeute erhalten.

Mit den Verbindungen **81** und **86** wurden anschließend verschiedene Bedingungen für die Aldolreaktion mit Propionaldehyd getestet. Dabei wurde die Art der verwendeten LEWIS-Säure und der Base variiert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Durchgeführte Aldolreaktionen mit propionylierten Thioestern **81** und **86**.

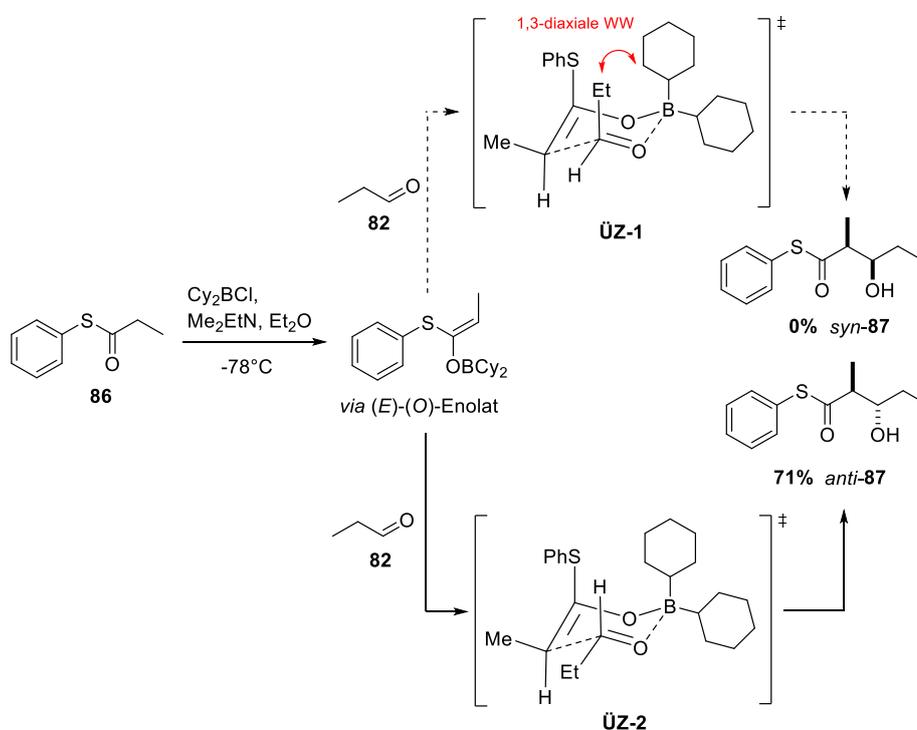


Eintrag	R	Lewisäure	Base	Lösungs- mittel	Ausbeute	<i>d.r.</i> (syn:anti)
1	SNAC	TiCl_4 (2.4 Äq.)	NEt_3 (2.8 Äq.)	CH_2Cl_2	44%	3:1
2	SNAC	TiCl_4 (2.4 Äq.)	DIPEA (2.8 Äq.)	CH_2Cl_2	81 reisol.	-
3	SNAC	TiCl_4 (8.0 Äq.)	NEt_3 (2.8 Äq.)	CH_2Cl_2	Zersetzung	-
4 ^[125]	SNAC	Bu_2BOTf (2.0 Äq.)	NEt_3 (3.0 Äq.)	CH_2Cl_2	81 reisol.	-
5 ^[125]	SNAC	Bu_2BOTf (2.0 Äq.)	DIPEA (3.0 Äq.)	CH_2Cl_2	81 reisol.	-
6 ^[126]	SNAC	Cy_2BCl (1.5 Äq.)	Me_2NEt (1.8 Äq.)	Et_2O	81 reisol.	-
7	SPh	Cy_2BCl (1.5 Äq.)	Me_2NEt (1.8 Äq.)	Et_2O	71%	1:20
8	SPh	TiCl_4 (2.4 Äq.)	NEt_3 (2.8 Äq.)	CH_2Cl_2	n.b.	3:1

Die Aldolreaktionen mit Borenolaten des SNAC-Thioesters **81**, durchgeführt in Anlehnung an Vorschriften von WHITE^[125] und PATERSON^[126], führten unter keinen Bedingungen zum gewünschten Produkt (Einträge 4-6, Tabelle 5). Die Verwendung von Titan(IV)chlorid mit

Triethylamin als Base lieferte das Produkt **83** in 44% Ausbeute (Eintrag 1, Tabelle 5) und eine Diastereomerenverhältnis von ca. 3:1 zugunsten des *syn*-Diastereomers. Bei einem Austausch der Base von Triethylamin zu Diisopropylethylamin wurde keine Reaktion beobachtet. Die Erhöhung der Titan(IV)chlorid-Äquivalente führte zu komplexen Nebenreaktionen.

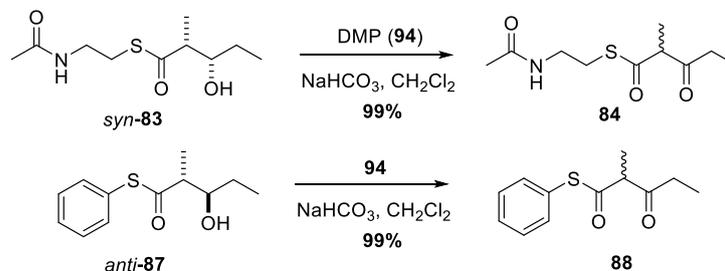
Die Aldolreaktion nach PATERSON^[126,127] mit Thioester **86** unter Verwendung von Dicyclohexylborchlorid und Dimethylethylamin in Et₂O verlief in guten Ausbeuten bis zu 71% und lieferte ausschließlich ein Diastereomer (siehe Eintrag 7, Tabelle 5). Die Auswertung der Kopplungskonstanten im ¹H-NMR-Spektrum weist auf die Bildung des *anti*-Diastereomers **87** hin.



Schema 18: Diastereoselektive Boraldolreaktion zwischen **86** und **82**. Die Verwendung von Cy_2BCl und Me_2EtN führt zur selektiven Bildung des (*E*)-(*O*)-Enolats, welches stereospezifisch zum *anti*-Diastereomer weiterreagiert.

Mechanistisch lässt sich die hohe Diastereoselektivität der Reaktion durch einen geometrisch hochgeordneten, sesselförmigen Übergangszustand beschreiben (Schema 18). Entscheidend ist hierbei die Tatsache, dass Dicyclohexylborchlorid als Lewisäure in Verbindung mit dem tertiären Amin ausschließlich das (*E*)-(*O*)-Borenolat aus Verbindung **86** erzeugt.^[128] Dieses Enolat kann bei -78°C zusammen mit dem Aldehyd einen sogenannten Zimmerman-Traxler-Übergangszustand (\ddagger ÜZ-1 und \ddagger ÜZ-2 in Schema 18) ausbilden.^[129] Im Übergangszustand \ddagger ÜZ-1 nimmt die Ethylgruppe des Aldehydes eine axiale Position ein, was zu einer energetisch ungünstigen 1,3-diaxialen Wechselwirkung

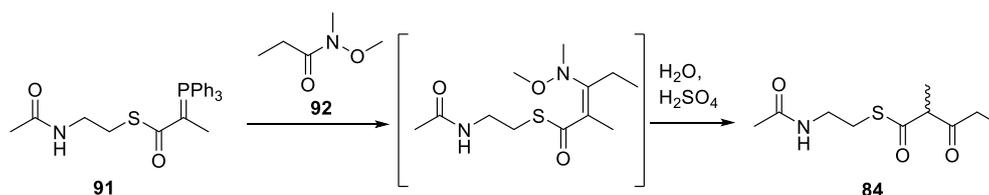
mit einem der beiden Cyclohexylreste führt. im Übergangszustand **ÜZ-2** befindet sich ein sterisch weniger anspruchsvolles Wasserstoffatom in axialer Position, wodurch dieser energetisch bevorzugt ist. Dieser generell auftretende Effekt wird durch die kurze Sauerstoff-Bor-Bindung noch verstärkt. Die Aldolreaktion verläuft somit ausschließlich über den Übergangszustand **ÜZ-2** ab.



Schema 19: Oxidation der Aldolprodukte mit DESS-MARTIN-Periodinan (**94**).

Die Aldolprodukte **83** und **87** konnten nahezu quantitativ mit DMP (**94**) in die gewünschten β -Keto-Thioester überführt und nach extractiver Aufarbeitung für Enzymaktivitätstests eingesetzt werden (siehe Schema 19).

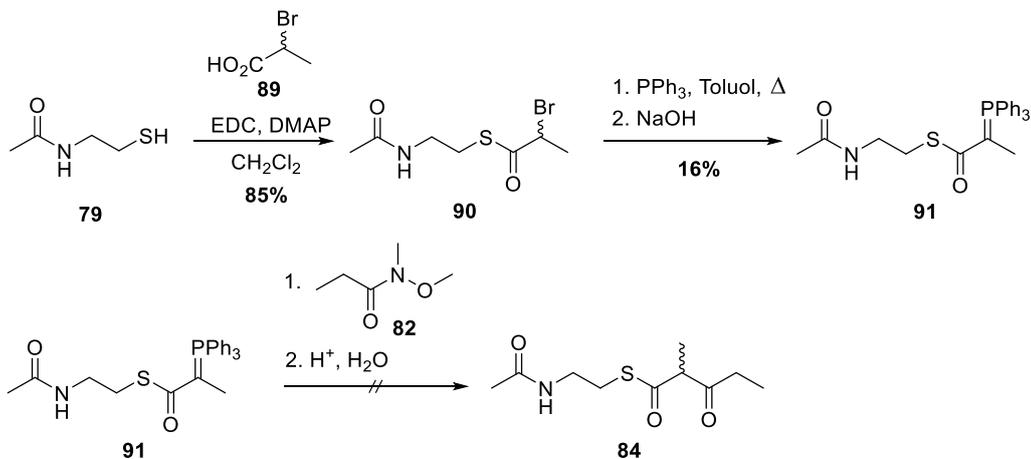
Außerdem wurde versucht, das Substrat **84** ausgehend von Ylen **91** zu synthetisieren. Es konnte von MURPHY *et al.* gezeigt werden, dass Weinrebamide sehr effizient und unter milden Bedingungen mit elektronenreichen Alkylidetriphenylphosphinen zu den entsprechenden Ketonen umgesetzt werden können.^[124] Der Einsatz von elektronenarmen WITTIG-Salzen (wie Verbindung **90**) für diese Reaktion ist bisher nicht beschrieben. Die Reaktion ist in Schema 20 dargestellt.



Schema 20: Postulierter Reaktionspfad für die Bildung von **84** aus **91**. Vermutlich wird im Hydrolyseschritt intermediär ein Halbaminal gebildet, welches zum β -Ketoester weiterreagiert.

Die Darstellung des Phosphor-Ylens **91** erfolgte über das Bromid **90**, welches ausgehend von *N*-Acetylcysteamin (**79**) durch Veresterung mit D/L-2-Brompropionsäure (**89**) in 85% Ausbeute dargestellt wurde. Alternativ kann Verbindung **79** auch mit D/L-2-Brompropionylbromid acyliert werden, was allerdings schlechtere Ausbeuten (37%) des Bromids **90** liefert. Dieses wurde mit Triphenylphosphin zunächst in das Phosphoniumbromid überführt und anschließend unter stark basischen Bedingungen zum

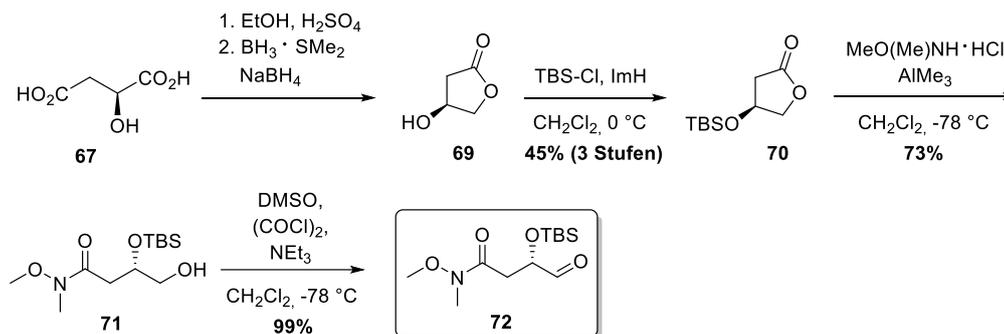
Ylen **91** deprotoniert. Die Reaktion wurde in Toluol durchgeführt und ergab eine Ausbeute von lediglich 16%.



Schema 21: Darstellung von Ylen **91** ausgehend von *N*-Acetylcysteamin (**79**). Die Umsetzung von **91** zum β -Keto thioester **84** nach Bedingungen von MURPHY *et al.* war unter den getesteten Bedingungen nicht erfolgreich.^[124]

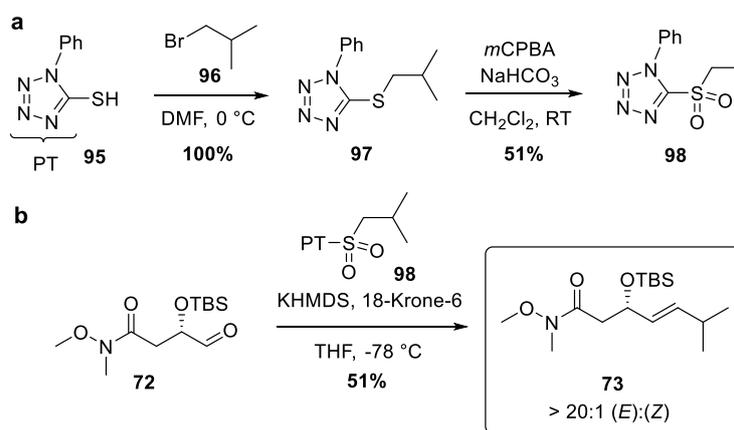
Das Ylen **91** wurde mit dem Weinrebamid **82** bei verschiedenen Temperaturen umgesetzt. Bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ in Tetrahydrofuran konnte kein Umsatz festgestellt werden. Auch eine Erhöhung der Reaktionstemperatur auf $50\text{--}70\text{ }^\circ\text{C}$ führte zu keinem Umsatz. Bei allen Reaktionen konnte das Weinrebamid **82** reisoliert werden.

Die Darstellung des Substrats **78** aus Schema 14b erfolgte in 10 linearen Synthesestufen. Zunächst wurde das Butyrolacton **69** nach einer Vorschrift von BODE *et al.*^[130] ausgehend von kommerziell erhältlicher L-Äpfelsäure (**67**) in zwei Stufen mit einer Gesamtausbeute von 57% dargestellt (Schema 22). Verbindung **69** wurde ohne weitere Reinigung zum Silylether **70** umgesetzt. Dieser wurde unter Verwendung von AlMe_3 als Lewisäure zu dem entsprechenden Weinrebamid **71** geöffnet. Die Ausbeute für diese Reaktion im 5-g-Maßstab betrug bis zu 73%. Weinrebamid **71** wurde anschließend durch SWERN-Oxidation in quantitativen Ausbeuten zu dem Aldehyd **72** umgesetzt.



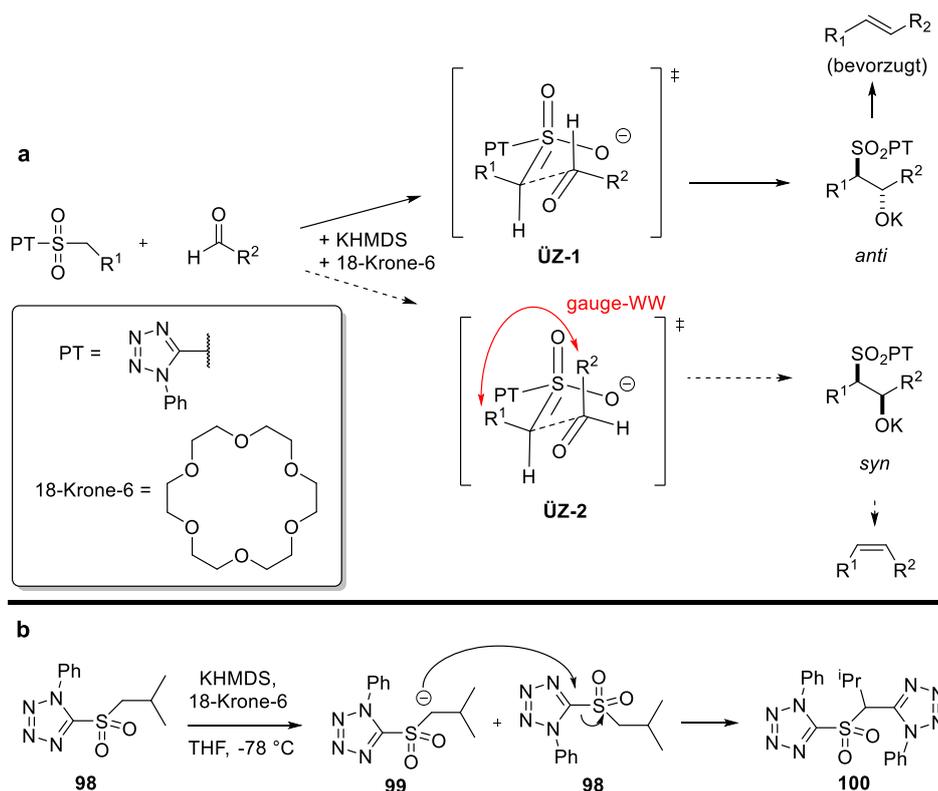
Schema 22: Darstellung von Aldehyd **72** ausgehend von L-Äpfelsäure (**67**). ImH = Imidazol. Der Aldehyd **72** wurde für nachfolgende JULIA-KOSCIENSKI-Olefinierungen verwendet.

In einer JULIA-KOSCIENSKI-Olefinierung^[131] wurde der Aldehyd **72** mit dem Sulfon **98** zum (*E*)-Alken **73** umgesetzt. Das Sulfon **98** konnte in moderater Ausbeute in zwei Stufen ausgehend von kommerziell erhältlichen 1-Phenyl-1*H*-tetrazol-5-thiol (**95**) dargestellt werden.^[132]



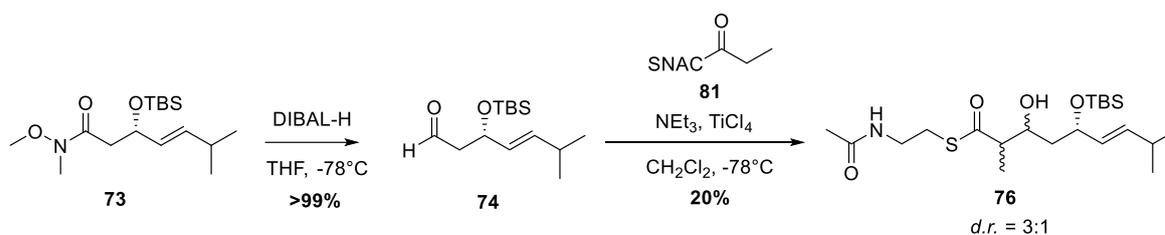
Schema 23: a: Darstellung des Sulfons **98**. b: Hochdiastereoselektive JULIA-KOSCIENSKI-Olefinierung zur Darstellung des (*E*)-Alkens **73**.

Die verwendete Synthesevorschrift für die Olefinierung nach POSPÍŠIL^[132] lieferte Verbindung **73** zunächst in geringen Ausbeuten (10%) mit hervorragenden (*E*):(*Z*)-Selektivitäten (> 20:1) zugunsten des gewünschten (*E*)-Isomers.



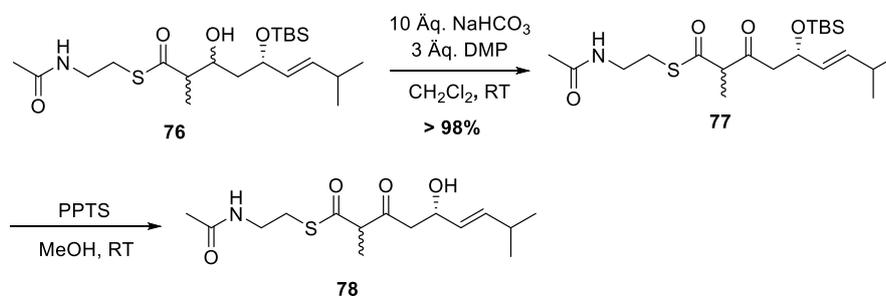
Schema 24: **a:** Allgemeiner Mechanismus der JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung nach POSPÍŠIL. **b:** Die Selbstkondensation des Sulfons **98** tritt unter den basischen Bedingungen der JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung als unerwünschte Nebenreaktion auf.

Der beobachtete, hochstereoselektive Ausgang der JULIA-KOCIENSKI-Olefinierung nach POSPÍŠIL wird auf den Einsatz von Metallchelatlignern (z.B. 18-Krone-6) zurückgeführt, welche im Reaktionsverlauf ein reaktives Sulfonylanion **99** erzeugen. Durch ein zeitlich sehr genau festgelegtes Protokoll, bei der die Aldehydzugabe unmittelbar nach der Zugabe der Base erfolgt, wird die Selbstkondensation von **98** unterdrückt und die Reaktion verläuft ausschließlich über einen offenen Übergangszustand **ÜZ-1** zum *anti*-Produkt, welches stereospezifisch zum (*E*)-Alken weiterreagiert. Der ebenfalls mögliche offene Übergangszustand **ÜZ-2** würde das entsprechende (*Z*)-Alken liefern, ist aber energetisch ungünstiger als **ÜZ-1**, da zwischen den Resten R^1 und R^2 eine stärkere *gauge*-Wechselwirkung auftritt. Im Fall der Synthese von **73** konnte jedoch ebenfalls eine sehr hohe (*E*)-Selektivität beobachtet werden, wenn die Reaktion unter BARBIER-Bedingungen durchgeführt wurde. Dabei wird die Base (KHMDS) sehr langsam zu einer Lösung aus Aldehyd und Sulfon gegeben. Unter diesen Bedingungen konnte die Ausbeute der Reaktion auf bis zu 51% gesteigert werden bei einer gleichbleibend hohen (*E*)/(*Z*)-Selektivität von > 20:1.



Schema 25: Darstellung des Aldolproduktes **76** ausgehend vom Olefin **74**.

Das Alken **73** wurde mithilfe von DIBAL-H quantitativ in den Aldehyd **74** überführt. Dieser wurde stets ohne zusätzliche Reinigung unmittelbar für die Aldolreaktion (Schema 25) mit dem Propionat **81** eingesetzt. Unter Verwendung der gleichen Bedingungen wie aus Tabelle 5, Eintrag 1 konnte Verbindung **76** in einem Diastereomerenverhältnis von 3:1 zugunsten des *syn*-Produktes erhalten werden (Schema 25).



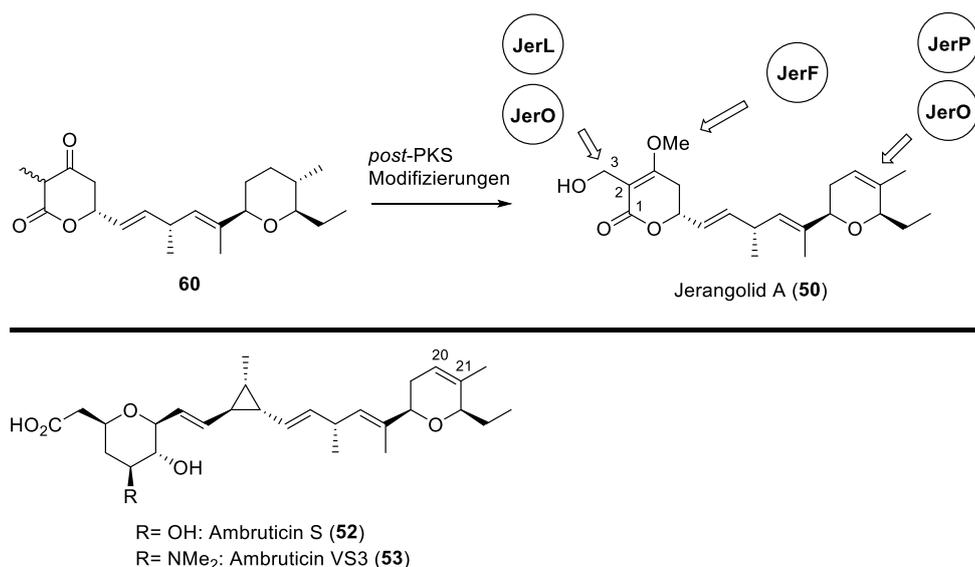
Schema 26: Darstellung des Substrats **78** ausgehend von dem Aldolprodukt **76**.

Die geringe Stereokontrolle unter den verwendeten Reaktionsbedingungen ist für die geplante Syntheseroute (siehe Schema 14b) irrelevant, da die Hydroxygruppe an dem neu entstandenen Stereozentrum im nächsten Schritt oxidiert wurde. Das Aldolprodukt **76** wurde quantitativ mit DMP in das gewünschte Testsubstrat **78** überführt und ohne weitere Reinigung für die Enzymaktivitätstests eingesetzt.

Die Oxidation der Hydroxygruppe in Verbindung **76** gelang in sehr guten Ausbeuten unter basischen Bedingungen mithilfe von 3 Äquivalenten DESS-MARTIN-Periodinan.^[133,134] Der β -Keto-Thioester **77** ist bei Raumtemperatur in organischen Lösungsmitteln (Et_2O , CHCl_3) über Tage stabil. Die Entfernung der Silylschutzgruppe erfolgte durch den überschüssigen Einsatz Pyridinium-*p*-toluolsulfonat (PPTS) in Methanol über 2 Tage bei RT. Das so erhaltene Substrat **78** ist insbesondere in wässriger Lösung instabil und wurde ohne weitere Reinigung für Enzymaktivitätstests eingesetzt.

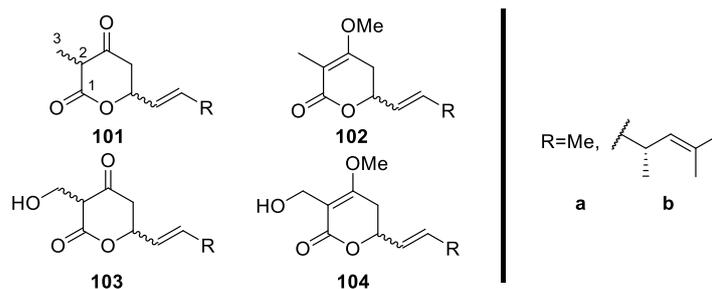
3.2.2 Synthese von 3-Oxo- δ -Lactonen für Enzymaktivitätstests mit His₆-JerF und den Oxidoreduktasen JerO, JerP und JerL

Die *O*-Methyltransferase JerF ist gemäß JULIEN *et al.* verantwortlich für die Methylierung des Ketons der Verbindung **60**.^[108] Die flavinabhängige Monooxygenase JerO und das RIESKE-2Fe-2S-Protein JerP sind nahe Homologe von AmbO beziehungsweise AmbP (Identität auf genetischer Ebene jeweils 78%) aus dem Ambruticin-Biosyntheseweg. Inaktivierung von *ambP* oder *ambO* in *Sorangium cellulosum* führte jeweils zur ausschließlichen Bildung von 20,21-Dihydroambruticinen, wonach AmbP und AmbO für die Bildung der trisubstituierten Doppelbindung im Tetrahydropyranring der Ambruticine essentiell sind. In Analogie dazu sollten JerP und JerO für die Desaturierung des THP-Rings in Jerangolid A verantwortlich sein. Ein weiteres präzedenzloses RIESKE-2Fe-2S-Protein JerL könnte, im Zusammenspiel mit JerO als Elektronendonator, für die Hydroxylierung der C2-Methylgruppe des Jerangolid D zuständig sein.



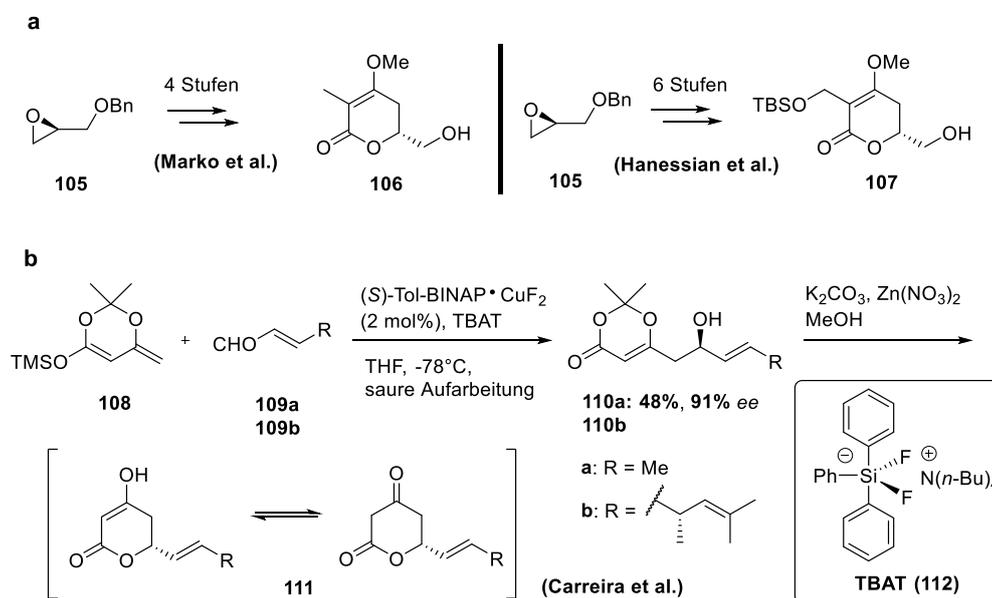
Schema 27: Hypothetische späte Schritte in der Jerangolid-Biosynthese. JerO und JerL sind vermutlich für die Bildung von Jerangolid A (**50**) durch die Hydroxylierung der C2-ständigen Methylgruppe verantwortlich. Die Reihenfolge der enzymatischen Reaktionen ist unbekannt.^[108]

Für die biochemische Charakterisierung der rekombinant aus *E. coli* hergestellten Enzyme JerF, JerO und JerL wurden vereinfachte Vorläufer- und Referenzverbindungen entworfen, welche strukturell dem nativen Vorläufer **60** bezüglich der Lactonuntereinheit ähnlich sind und über einen möglichst kurzen, flexiblen Syntheseweg zugänglich gemacht werden können.



Schema 28: Zielstrukturen für die *in-vitro*-Charakterisierung von JerF, JerO und JerL. Verbindungen **101a** und **102b** ähneln strukturell dem PKS-Produkt **60**.

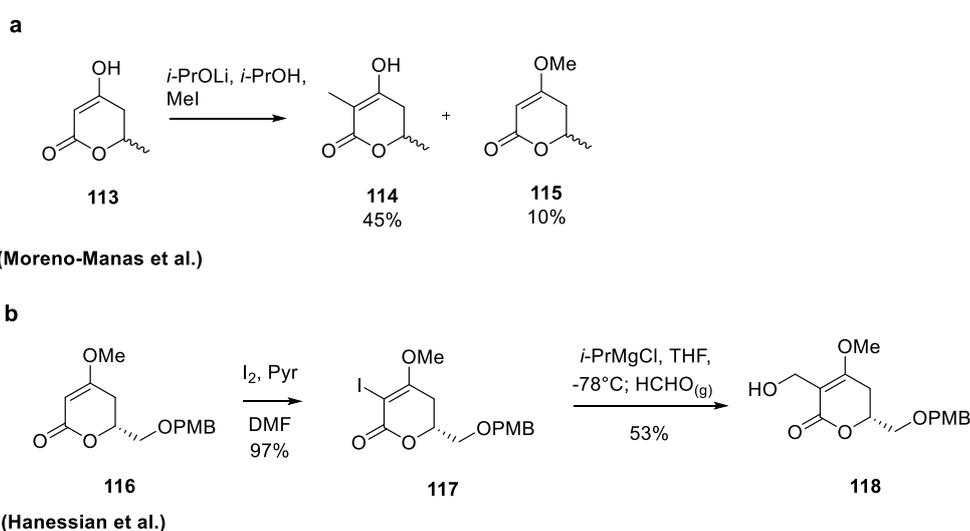
Die stereoselektiven Synthesen der Lactone **106** und **107** ausgehend von dem enantiomerenreinen Epoxid **105** wurde im Rahmen der Totalsynthese von Jerangolid A^[135] und D^[136] beschrieben (Schema 29a). Beide Routen könnten in Teilen für die Darstellung geeigneter Substrate und Referenzverbindungen für die enzymatische Oxidation an C2 mit JerO und JerL herangezogen werden. Beide Synthesen haben allerdings die Gemeinsamkeit, dass die *O*-Methylenolether-Funktion bereits in frühen Stufen eingeführt wird. Daher ist es für die geplanten biochemischen Untersuchungen mit der *O*-Methyltransferase JerF erforderlich, eine neue Syntheseroute für Substrate wie **101** und **103** zu entwickeln.



Schema 29: a: "Chiral pool"-basierter Zugang zum C2-methylierten Lacton **106**^[136] und C2-hydroxymethylierten Lacton **107**^[135]. b: Katalytische, enantioselektive VMAR nach CARREIRA und anschließende Lactonisierung.^[137]

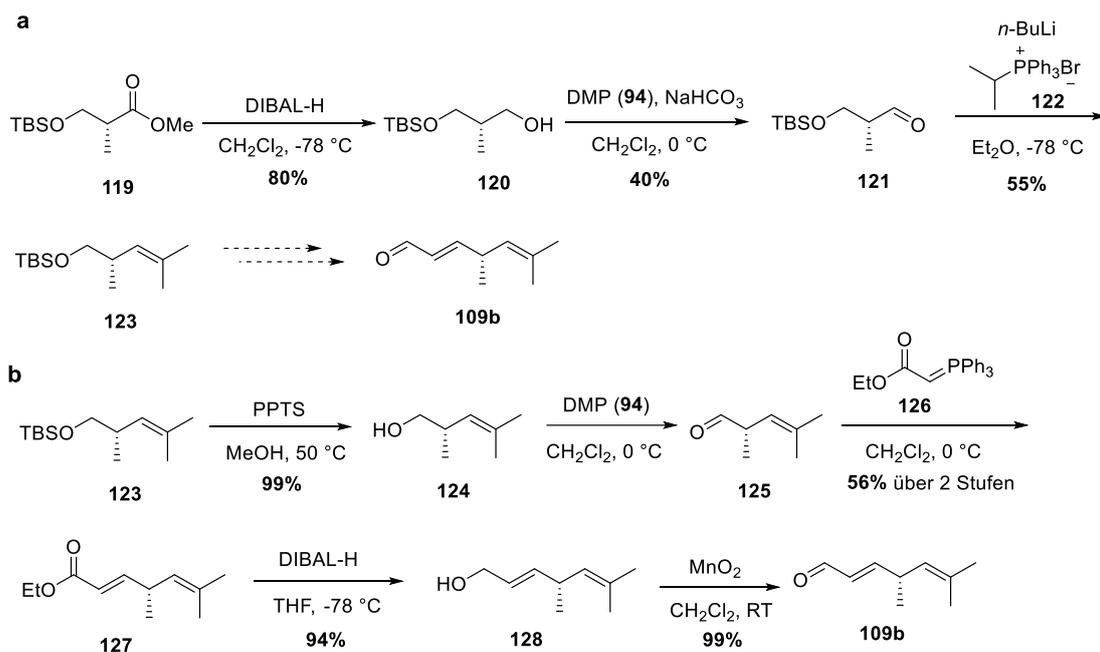
Einen flexiblen Zugang zu 3-Oxo- δ -Lactonen liefert die kupferkatalysierte, enantioselektive Addition von Silyldienolethern an Aldehyde nach CARREIRA *et al.*^[137,138] Diese Variante der vinylogenen MUKAIYAMA-Aldolreaktion (VMAR) liefert moderate bis sehr

gute Ausbeuten für nicht-enolisierbare Aldehyde bei stets hoher Enantioselektivität. Die so erhaltenen Aldolprodukte lassen sich unter milden, basischen Bedingungen lactonisieren (siehe Schema 29b). Deprotonierung an der C2-Position von **111** mit Lithiumisopropoxid und anschließende Methylierung mit Methyljodid liefert Zielverbindung **101**. Selektive C-Methylierung an ähnlichen Substraten sind in der Literatur beschrieben (siehe Schema 30a).^[139,140] Alternativ können Hydroxymethylierungen an der C2-Position des Methyl-Enolethers **111** durch eine Umpolung des entsprechenden Vinyljodids und anschließende Reaktion mit Formaldehyd durchgeführt werden, um die Verbindung **103** zu synthetisieren (siehe Schema 30b).^[135]



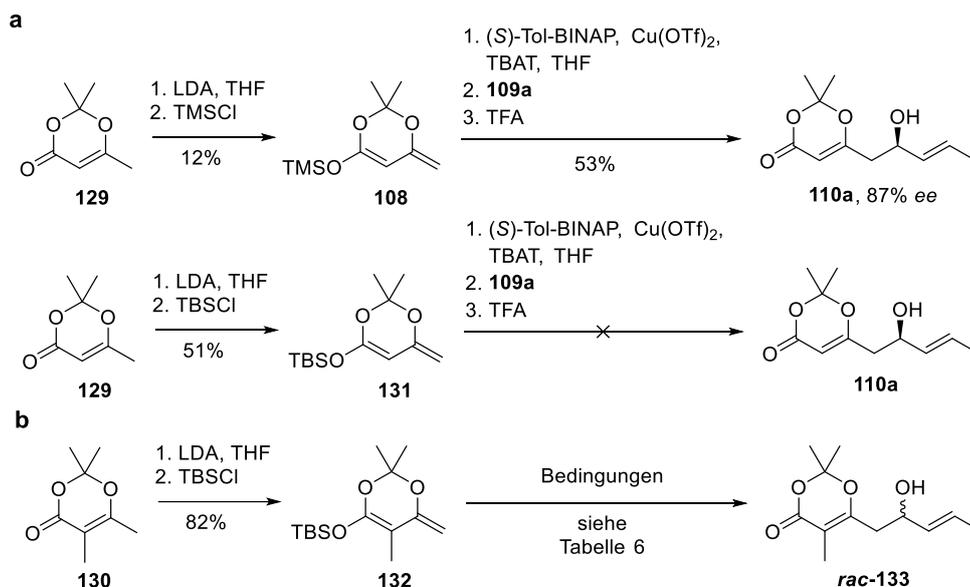
Schema 30: a: Literaturbeispiel für die Methylierungen von **16** nach MORENO-MANAS *et al.*^[139] b: Literaturbeispiel für die Hydroxymethylierung von **19** nach HANESSIAN *et al.*^[135]

In Schema 31 ist die Synthese des Aldehyds **109b** für die Aldolreaktion nach CARREIRA (siehe Schema 29b) schematisch dargestellt. Die Reduktion mit DIBAL-H zum Aldehyd **121** kann direkt von dem enantiomerenreinen Methylester **119** aus erfolgen, wenn die Reaktion bei -40°C mit gesättigter Na,K-Tartratlösung beendet wird. Dieses Verfahren ist allerdings nicht zuverlässig reproduzierbar und kann durch eine zweistufige Sequenz ersetzt werden, welche die Reduktion zum primären Alkohol **120** mit anschließender, selektiver Oxidation mithilfe von Dess-MARTIN-Periodinan (**94**) beinhaltet. Die WITTIG-Reaktion von Aldehyd **121** mit Bromid **122** den OTBS-geschützten Alkohol **123**. Im Rahmen seiner Masterarbeit konnte F. LINDNER die Synthese von Aldehyd **109b** ausgehend von **123** mit einer Gesamtausbeute von 52% erfolgreich durchführen (siehe Schema 31b).^[141]



Schema 31: **a:** In dieser Arbeit durchgeführte Synthese von **123** als Vorläufer des Aldehyds **109b**. **b:** Optimierung der Syntheseroute und Fertigstellung der Synthese des Aldehyds **109b** nach F. LINDNER.^[141]

Die Synthese des Trimethylsilyldienoethers **108** aus Schema 29b nach einer Vorschrift von KALESSE *et al.*^[142] war erfolgreich, lieferte jedoch nach Vakuumdestillation lediglich 12% des hydrolyse- und wärmeempfindlichen Produktes. Der entsprechende *tert*-Butyldimethyl-silyldienoether **131** ist wesentlich unempfindlicher und kann nach destillativer Reinigung in bis zu 51% Ausbeute erhalten werden. Die Aldolreaktion zwischen **108** und frisch destilliertem (*E*)-Crotonaldehyd unter den Bedingungen nach CARREIRA *et al.* lieferte **110a** in 53% Ausbeute mit einem Enantiomerenüberschuss von 87%. Die Aldolreaktion zwischen **131** und frisch destilliertem (*E*)-Crotonaldehyd führte unter identischen Bedingungen stets zur Hydrolyse des Startmaterials unter Bildung von **129**.^[143] Die TBS-Schutzgruppe ist im Vergleich zur TMS-Schutzgruppe deutlich stabiler gegenüber Fluoridanionen, so dass es möglicherweise während der Reaktion zu keiner nennenswerten Desilylierung unter Bildung der katalytisch aktiven Kupferenolatspezies kommt. Versuche, diesen Prozess durch Verlängerung der Reaktionszeit zwischen TBAT und **131** bei -78 °C oder höheren Temperaturen zu verbessern, waren nicht erfolgreich. In einer weiteren Modifikation der Route, wurde gemäß Schema 32b der α -methylierte TBS-Silyldienoether **132** in verschiedenen Aldolreaktionen getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.



Schema 32: a: Durchgeführte Aldolreaktionen mit verschiedenen Silyldienoolethern und (*E*)-Crotonaldehyd (**109a**) nach CARREIRA.^[143] b: Durchgeführte Aldolreaktionen mit α -methyliertem Silyldienoolether **132** unter verschiedenen Bedingungen (Tabelle 6).

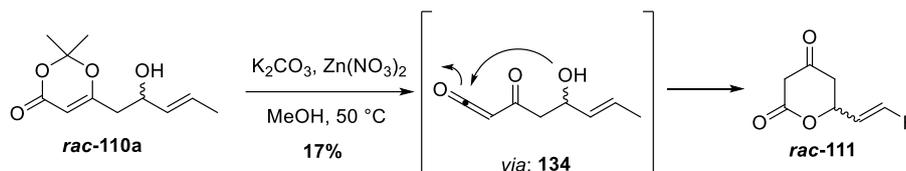
Die Aldolreaktion zwischen α -methylierten TBS-Silyldienoolether **132** und (*E*)-Crotonaldehyd nach CARREIRA (Ansatz 1, Tabelle 6) führte zu keinem Produkt. Es konnte lediglich das Startmaterial reisoliert werden. Die Verwendung von Bortrifluorid und Titan(IV)chlorid als Lewisäure lieferten das racemische Produkt *rac*-**133** in sehr guten Ausbeuten. Die Verwendung von SATOS Katalysatorsystem (Ansatz 4-6, Tabelle 6) lieferte Ausbeuten von 35-53% mit geringen Enantiomerenüberschüssen.^[144,145]

Tabelle 6: Getestete Bedingungen für lewisäurekatalysierte Aldolreaktionen aus Schema 32b.

Ansatz	132	109a	Lösungs- Mittel	Lewis-Säure	Ausbeute 133	<i>ee</i>
1	1.5 Äq.	1.0 Äq.	THF	(<i>S</i>)-Tol-BINAP (0.05 Äq.), Cu(OTf) ₂ (0.05 Äq.), TBAT (0.09 Äq.)	0%	-
2	3.0 Äq.	1.0 Äq.	CH ₂ Cl ₂	BF ₃ ·Et ₂ O (1.0 Äq.)	91%	-
3	1.0 Äq.	3.0 Äq.	CH ₂ Cl ₂	TiCl ₄ (3.2 Äq.)	88%	-
4	2.0 Äq.	1.0 Äq.	THF	Ti(O ^{<i>i</i>} Pr) ₄ / (<i>R</i>)-BINOL (0.10 Äq.)	35%	26%
5	2.0 Äq.	1.0 Äq.	THF	Ti(O ^{<i>i</i>} Pr) ₄ / (<i>R</i>)-BINOL (0.17 Äq.)	35%	27%

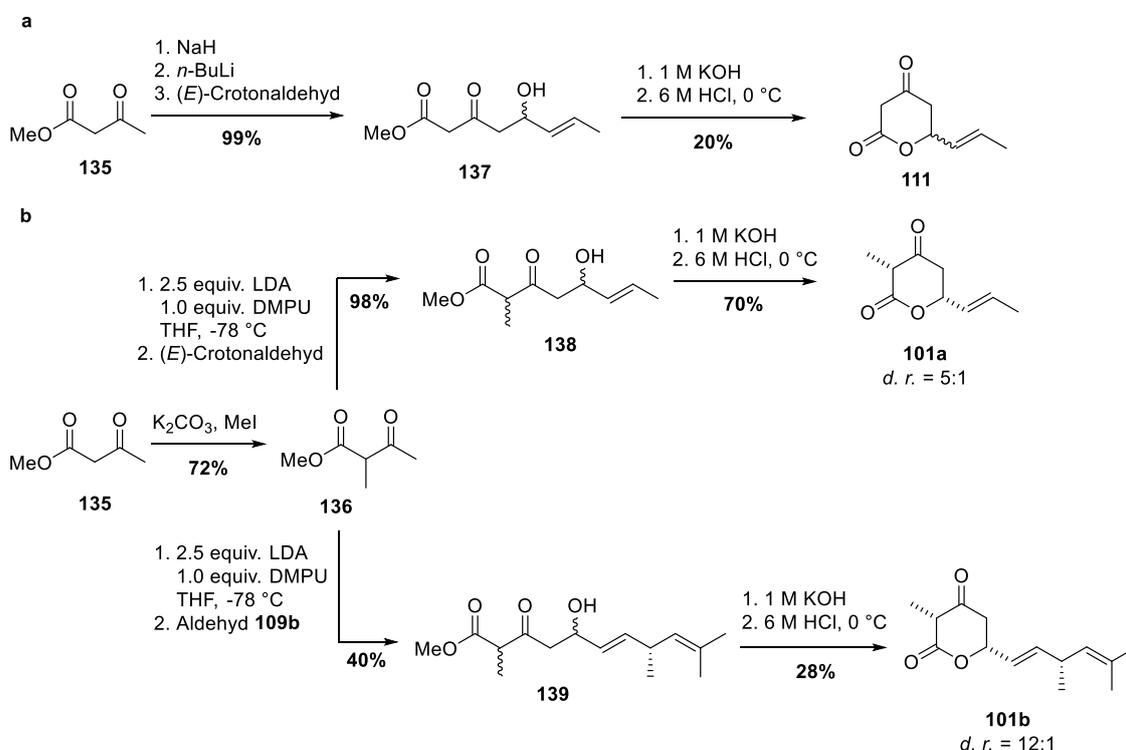
6	2.0 Äq.	1.0 Äq.	THF	Ti(O ^{<i>i</i>} Pr) ₄ /	53%	38%
(<i>R</i>)-BINOL (0.30 Äq.)						

Anschließend wurden Versuche zur Lactonisierung des racemischen Aldolproduktes **rac-110a** durchgeführt. Die Verwendung von katalytischen Mengen Zn(NO₃)₂ und K₂CO₃ als Base in MeOH verliefen nur mit schlechtem Umsatz und lieferten 12-17% der gewünschten Verbindung **111**.



Schema 33: Die Cyclisierung von **rac-110a** nach Bedingungen von CARREIRA^[146] verläuft mechanistisch über eine Retro-DIELS-ALDER-Reaktion unter Ausbildung des Ketens **134** bei gleichzeitiger Abspaltung von Aceton.^[147] Das Keten **134** reagiert unter den gezeigten Bedingungen intramolekular weiter zum Produkt **rac-111**.

Einen noch direkteren Zugang zu racemischen 3-Oxo- δ -Lactonen lieferte die Aldolreaktion mit den Dienolaten der β -Ketoester **135** bzw. **136** (Schema 34) nach WEILER *et al.*^[148,149] Für die Bildung von **137** wird Methylacetoacetat (**135**) zunächst bei 0 °C mit NaH als Base in der α -Position des Esters einfach deprotoniert.



Schema 34: a: Regioselektive, ungerichtete Aldolreaktion mit β -Ketoester **38** und anschließende Zyklisierung nach BLAKE *et al.*^[150] **b:** Methylierung^[151] von β -Ketoester **38** mit anschließender Aldolreaktion nach MULZER *et al.*^[152] und Lactonisierung.

Das so entstandene Natriumenolat lässt sich bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ durch *n*-BuLi effizient in das Dienolat überführen, ohne dass es zu unerwünschten Carbonyladditionen mit dem Startmaterial kommt. Die Deprotonierung von **136** erfolgte durch Verwendung von 2.5 Äq. LDA als Base mit DMPU als Kosolvenz (Schema 34b). Die gebildeten Dienolat der Verbindungen **135** und **136** reagierten hoch regioselektiv über die γ -Position mit Aldehyden. Die so entstandenen Aldolprodukte **137** und **138** konnten nach Verseifung des Methylesters und anschließender Behandlung mit HCl in die entsprechenden Lactone überführt werden.^[153]

Die in Schema 34 gezeigten Aldolreaktionen mit frisch destilliertem (*E*)-Crotonaldehyd lieferten exzellente Ausbeuten für **137** und **138**. Die Verwendung des komplexeren Aldehydes **109b** lieferte eine geringere Ausbeute von 40% an **139**, was unter anderem daran lag, dass er ohne weitere Reinigung eingesetzt wurde. Die Lactonisierungen verliefen mit Ausbeuten zwischen 20% und 70% wobei sämtliche Lactone **111**, **101a** und **101b** als Feststoffe nach der Behandlung mit 6 M HCl ausfielen.

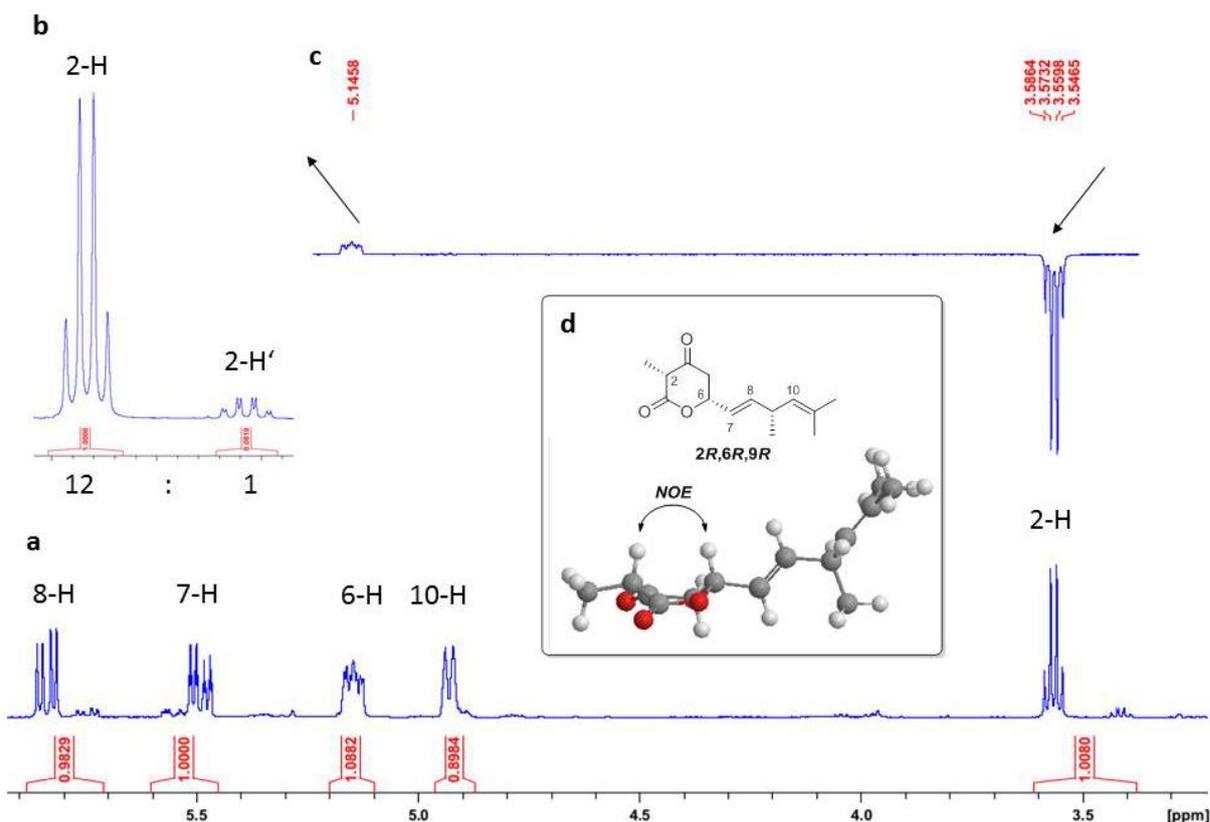


Abbildung 16: a: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) der gereinigten Verbindung **101b**. b: Detailansicht der Region zwischen 3.4-3.6 ppm zeigt insgesamt zwei Signale für das Hauptdiastereomer (3.57 ppm) und das Nebendiastereomer (3.41 ppm). c: Ausschnitt aus dem 1D-NOE-Spektrum mit Sättigung des Spins bei 3.60 ppm bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. d: Berechnete Vorzugskonformation der Verbindung **101b** ($2R,6R,9R$) bei RT in der Gasphase (Programm: Maestro, durchgeführt von Dr. A. Kanakis, AK Prof. Dr. Kirschning).

Basierend auf ^1H -NMR-Analyse wurde das Lacton **101b** als ein Gemisch aus Diastereomeren mit einem Verhältnis von 12:1 erhalten, wobei die einzelnen Diastereomere chromatographisch nicht voneinander getrennt werden konnten. Der *NOE*-Kontakt zwischen den beiden Wasserstoffatomen an C2 und C6 zeigt an, dass sich beide in demselben Halbraum über der Ringebene befinden (Abbildung 16c). Es ist bekannt, dass bereits schwach saure Bedingungen eine Tautomerisierung der C2-Position von 3-Oxo- δ -Lactonen verursachen.^[153] Durch die stark sauren Bedingungen während der Zyklisierung, liegt das Gleichgewicht somit stark auf der Seite des thermodynamisch stabileren Produktes, bei dem die Methylgruppe eine äquatoriale Position einnimmt (siehe Abbildung 16d).

3.3 Enzymaktivitätstests

3.3.1 Thioesterase His₆-JerE7(TE)

Für die Charakterisierung der Thioesterase aus der Jerangolid-Biosynthese wurde die gereinigte His₆-JerE7(TE)-Didomäne aus den Expressionen von *jerF_pET28a(+)* in *E. coli* BL21(DE3) verwendet. Die Reaktionsanalyse erfolgte nach extraktiver Aufarbeitung der Reaktionsmischungen durch HPLC-MS.

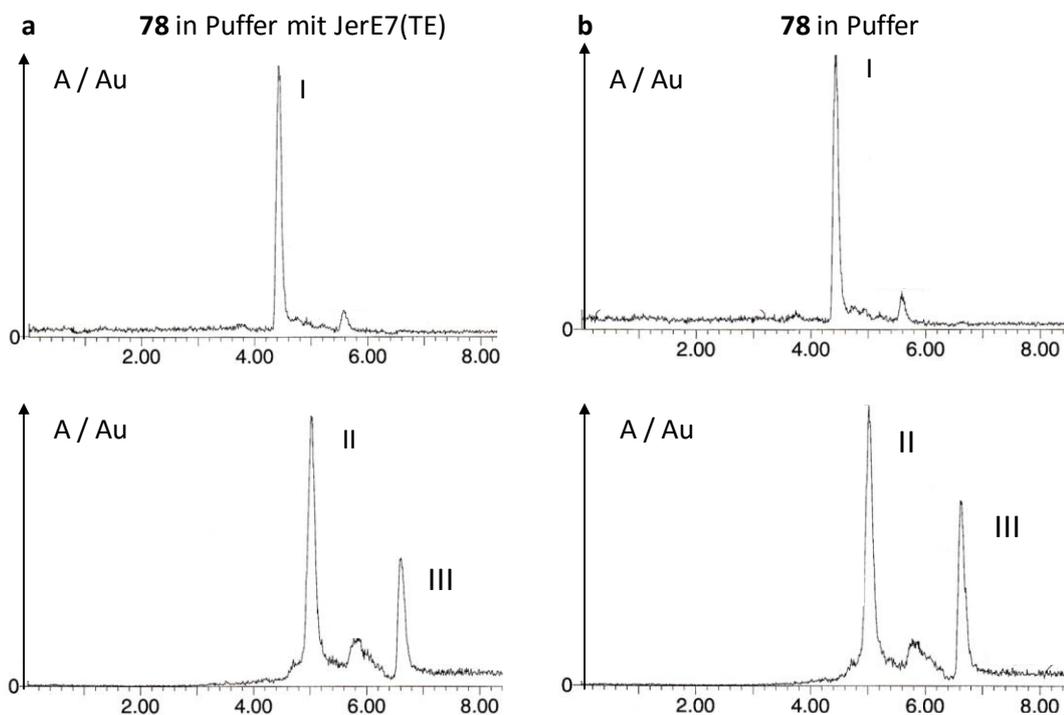
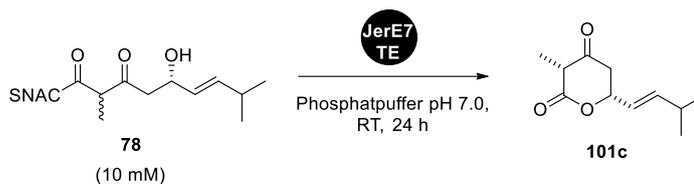


Abbildung 17: *In-vitro*-Enzymaktivitätstests mit His₆-JerE7(TE) und Substrat **78**. **a-b:** HPLC-Chromatogramme aus dem EtOAc-Extrakte der einzelnen Experimente. **a:** Inkubation von 10 mM **78** mit JerE7(TE) in 50 mM Phosphatpuffer pH 7.0 (7.5 mg/mL Gesamtproteinkonzentration). **b:** Inkubation von 10 mM **78** in 50 mM Phosphatpuffer pH 7.0.

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der Umsetzung des offenkettigen *N*-Acetylcysteamin-Thioesters **78** gezeigt. Die Reaktionen wurden in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) mit jeweils 10 mM der Verbindung **78** durchgeführt. Die Gesamtproteinkonzentration an gereinigtem JerE7(TE) betrug jeweils 7.5 mg/mL.

Der Aktivitätstest in Gegenwart der Thioesterase-Didomäne (siehe Abbildung 17a) ergab eine teilweise (ca. 50%) Umsetzung des Startmaterials **78** (II, $t_R = 5.0$ min) in das cyclisierte Produkt **101c** (I, $t_R = 4.4$ min) nach 24 h Inkubationszeit. In dem Chromatogramm ist ein weiteres Signal (III) bei $t_R = 6.6$ min erkennbar. Eine massenspektrometrische Auswertung legt nahe, dass dieses Signal von Restmengen der OTBS-geschützten Verbindung **77** verursacht wird.

In Abbildung 17b ist das Resultat eines Kontroll-experiments mit 10 mM **78** in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7.0) dargestellt. Auch in diesem Versuch konnte nach 24 h Inkubationszeit ein Umsatz (ca. 50%) von **78** in das Lacton **101c** detektiert werden.

Diese Experimente weisen auf eine spontane Lactonisierung von **78** als dominierende Reaktion zur JerE7(TE)-vermittelten Lactonisierung unter den gewählten Reaktionsbedingungen hin. Einen Einfluss der Thioesterase-Didomäne auf die Reaktion konnte unter diesen Umständen nicht ermittelt werden.

3.3.2 O-Methyltransferase His₆-JerF

Für die Charakterisierung der O-Methyltransferase wurde lösliches His₆-JerF-Fusionsprotein aus den Expressionen von *jerF_pCOLDI* und *jerF_pET20b(+)* in *E. coli* BL21(DE3) verwendet (siehe Seite 39). Dieses wurden in Form der ungereinigten Lysate nach dem Zellaufschluss mit synthetisch hergestellten Substraten **101a**, **101b** und **111** zur Reaktion gebracht. Die Reaktionsanalyse erfolgte nach extraktiver Aufarbeitung der Reaktionsmischungen durch HPLC-MS und ¹H-NMR-Spektroskopie.

Für die enzymatische Umsetzung des Substrats **101a** konnten, in Anlehnung an Arbeiten zu anderen O-Methyltransferasen von THORSON *et al.*^[154] und SHERMAN *et al.*^[155], geeignete Reaktionsbedingungen für die Methyltransferase His₆-JerF gefunden werden. Für die Reaktionen wurde der Methyl donor S-Adenosyl-L-Methionin in Form des *p*-Toluolsulfonats (Tosylats) im vierfachen Überschuss zum Substrat eingesetzt. Weiterhin enthielten die Lysate einen Zusatz von 5 mM MgCl₂.

Da für die Versuche kein gereinigtes Enzym verwendet werden konnte, wurden mit dem Substrat **101a** umfangreiche Kontrollexperimente zur Bestätigung der katalytischen Aktivität von His₆-JerF durchgeführt (siehe Abbildung 18c-g). Diese Experimente dienten dazu, Matrixeffekte der komplexen Reaktionslösungen und unspezifische Nebenreaktionen zu bestimmen und gegebenenfalls auszuschließen.

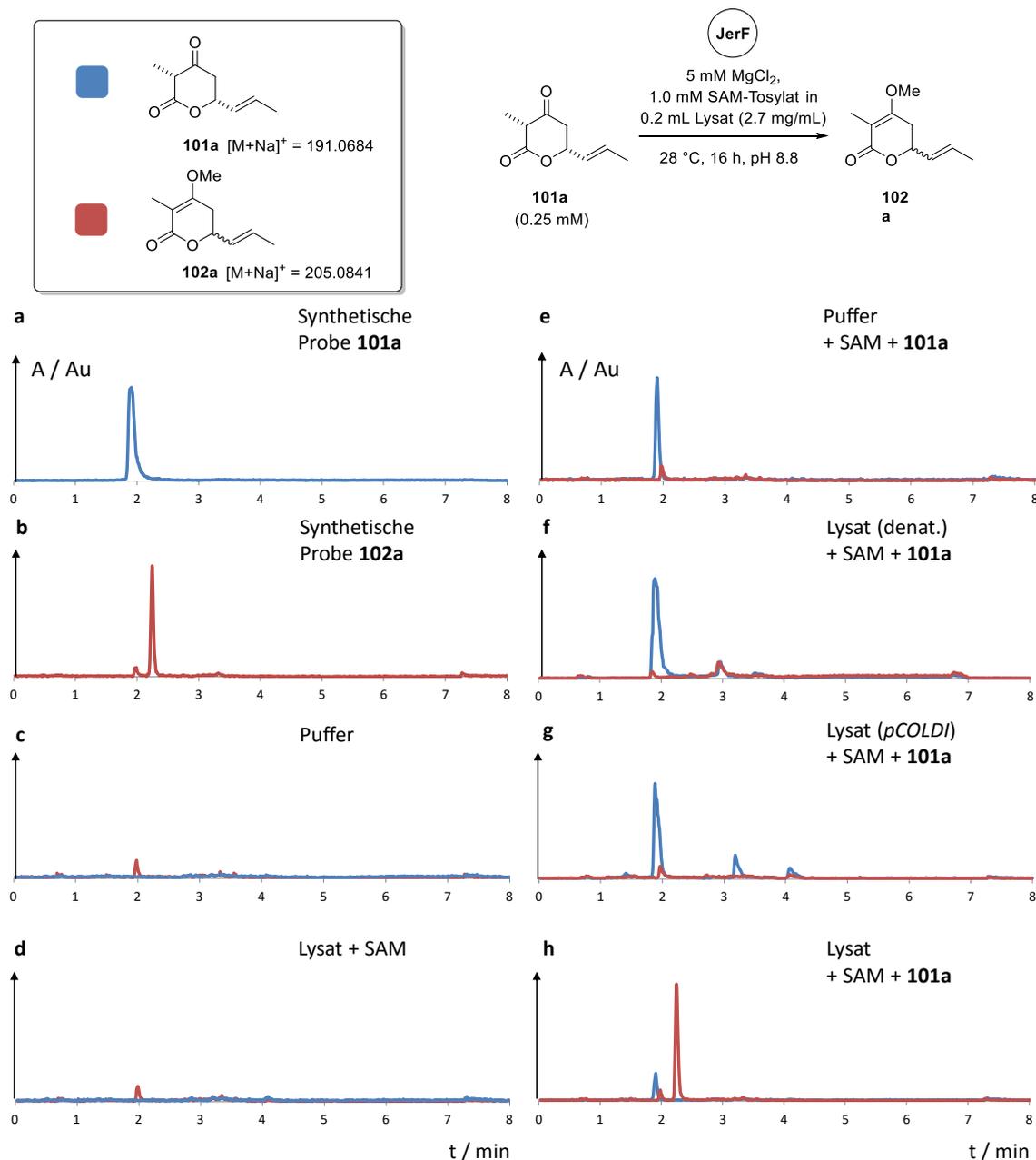


Abbildung 18: *In-vitro*-Enzymaktivitätstests mit His₆-JerF und Substrat **101a**. **a-h:** HPLC-Chromatogramme der EtOAc-Extrakte der einzelnen Experimente. **a:** synthetisch hergestelltes Eduktes (**101a**). **b:** synthetisch hergestelltes Produkt (**102a**). **c:** Aufschlusspuffer (40 mM TRIS, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 8.8). **d:** Lysat (Aufschlusspuffer mit 2.7 mg/mL Gesamtproteinkonzentration) mit 1.0 mM SAM-Tosylat. **e:** Aufschlusspuffer mit 1.0 mM SAM-Tosylat und 0.25 mM **101a**. **f:** Lysat (aus *jerF_pCOLDI* in *E. coli* BL21(DE3), inkubiert für 5 min bei 95°C) mit 1.0 mM SAM-Tosylat und 0.25 mM **101a**. **g:** Lysat (Expression von *pCOLDI*-Vektor in *E. coli* BL21(DE3)) mit 1.0 mM SAM-Tosylat und 0.25 mM **101a**. **h:** Lysat (aus *jerF_pCOLDI* in *E. coli* BL21(DE3)) mit 1.0 mM SAM-Tosylat und 0.25 mM **101a**.

In Abbildung 18a und b sind die Chromatogramme des synthetisch hergestellten Eduktes (**101a**) und Produktes (**102a**) dargestellt. Für die Verbindung **101a** konnte eine Retentionszeit $t_R = 1.9$ min und ein hochaufgelöstes Masse-Ladungs-Verhältnis $m/z = 191.0684$ [M+Na]⁺ detektiert werden. Für die Verbindung **102a** wurde eine

Retentionszeit $t_R = 2.2$ min und ein hochaufgelöstes Masse-Ladungs-Verhältnis $m/z = 205.0841$ $[M+Na]^+$ ermittelt.

In Abbildung 18c und d sind die Hintergrundsignale zu erkennen, die von den Puffer- und Lysatbestandteilen und dem Cofaktor in dem untersuchten Massenbereich hervorgerufen werden. Deutlich zu erkennen ist ein Signal bei $t_R = 2.0$ min mit geringer Intensität, welches annähernd das erwartete Masse-Ladungs-Verhältnis $m/z = 205.08$ $[M+Na]^+$ des Produktes **102a** aufweist. Dieses Signal ist durchgehend in allen gemessenen Proben detektierbar und daher als ein Artefakt des Messprozesses zu bewerten.

Aus Abbildung 18e geht hervor, dass das Substrat **101a** keine unspezifische Reaktion mit dem Methylgruppen-Donor (SAM-Tosylat) eingeht und unter den Pufferbedingungen hinreichend stabil ist. Das verwendete Lysat aus der Expression von *jerF_pCOLDI* in *E. coli* BL21(DE3) erwies sich als katalytisch inaktiv, wenn es zuvor für 5 min bei 95°C behandelt wurde (Abbildung 18f). In einem weiteren Versuch wurde der Vektor *pCOLDI* (ohne *jerF*-Insert) in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und das daraus gewonnene Lysat mit **101a** inkubiert. Unter diesen Bedingungen konnte keine Bildung der *O*-methylierten Spezies **102a** durch HPLC-MS-Analyse nachgewiesen werden (Abbildung 18g).

In Abbildung 18h ist das Resultat der enzymatischen Umsetzung von **101a** gezeigt. Dabei wurden ca. 8.4 µg Substrat durch das Lysat aus der Expression von *jerF_pCOLDI* in *E. coli* BL21(DE3) nach Inkubation über 16 h bei 28 °C größtenteils in den *O*-Methylenolether **102a** überführt (Abbildung 18h). Damit konnte nachgewiesen werden, dass das nicht gereinigte Lysat aus der Expression von *jerF_pET20b(+)* in *E. coli* BL21(DE3) eine katalytische Methyltransferaseaktivität ausübt.

Im Gegensatz dazu führten die Umsetzungen von **101a** mit gereinigtem His₆-JerF aus der Expression von *jerF_pET20b(+)* in *E. coli* BL21(DE3) (Fraktion 3 und 4 aus Abbildung 14b) zu keinem nachweisbaren Produkt **102a**. Diese gegensätzlichen Resultate könnten darin begründet sein, dass JerF nur in nativer Form katalytisch aktiv ist. Ebenso könnte das Vorhandensein einer C-terminalen Polyhistidinsequenz an JerF zu einer Inaktivierung des Enzyms führen. Ein weiterer möglicher Grund könnten zu geringe Konzentrationen an His₆-JerF (0.2-0.7 mg/mL) nach der Affinitätschromatographie und Umpufferung sein. Es ist darüber hinaus möglich, dass das Enzym durch den Reinigungsschritt seine aktive Struktur verliert.

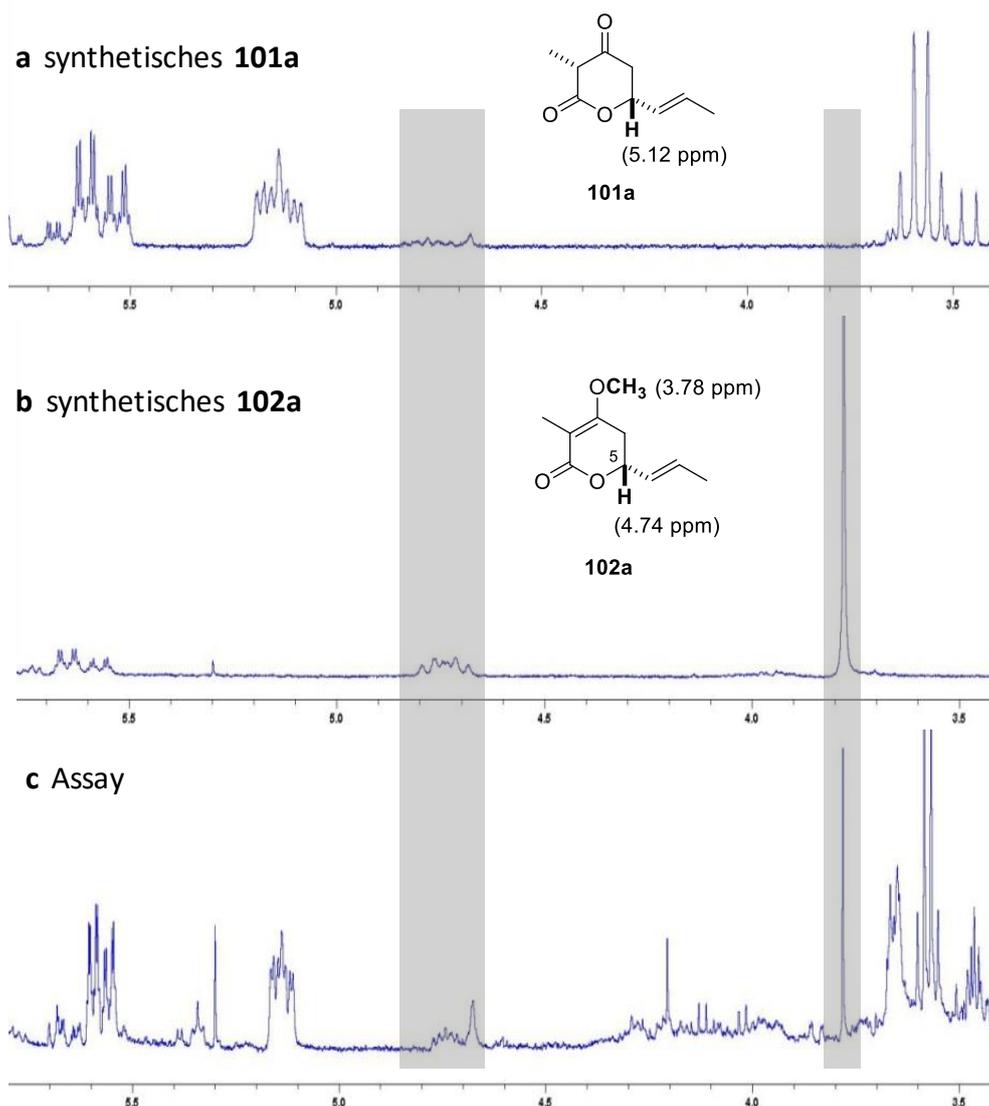


Abbildung 19: a-c: ^1H -NMR-Spektren (Ausschnitte) a: Edukt **101a**. b: Produkt **102a**. c: Spektrum des EtOAc-Extraktes der Reaktion mit 7 mg Substrat **101a**. Im Kasten hervorgehoben sind die charakteristischen Signale der Protonen an C5 und der neu gebildeten Methylgruppe.

Einen geringen Umsatz an Substrat konnte auch im semi-präparativen Maßstab (Versuchsbedingungen siehe Seite 86) mit 7.3 mg (0.04 mmol) **101a** und einem Äquivalent SAM-Tosylat in der Reaktion mit dem Lysat aus *jerF_pCOLDI* in *E. coli* BL21(DE3) (1.1 mg/mL Gesamtproteinkonzentration) durch ^1H -NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19c). Charakteristisch für einen erfolgreichen Umsatz ist das Vorhandensein des Singuletts bei 3.78 ppm, welches von der CH_3 -Gruppe des gebildeten Methylenolethers verursacht wird. Gleichzeitig erfährt das Multiplett, welches von dem Wasserstoffatom an C6 stammt, im Produkt **102a** eine Hochfeldverschiebung von ca. 0.4 ppm (zum Vergleich siehe Abbildung 19a und b).

Eine Integration der charakteristischen Signale aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ergab ein ungefähres Verhältnis von **101a/102a** = 9/1 nach einer Reaktionszeit von 24 h. Ein wesentlicher Grund für den geringen Umsatz ist die schlechte Löslichkeit und Durchmischung des Eduktes in dem Lysat.

Im Fall der enzymatischen Umsetzungen von **101a** im semi-präparativen Maßstab (siehe Seite 86) konnten nur sehr geringe Ausbeuten an Startmaterial reisoliert werden.

Inkubationsversuche von **101a** in verschiedenen Puffersystemen mit anschließender $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischer Auswertung der EtOAc-Extrakte wiesen auf eine starke pH-Wert-Abhängigkeit der Substratstabilität hin (siehe Seite 87). Bei einem pH-Wert von 6.8 war das Lacton **101a** im Puffer über einen Zeitraum von 16 h ausreichend stabil (80% Reisolation von **101a**). Eine zunehmende Zersetzung, vermutlich einhergehend mit basenvermittelter Ringöffnung und der Bildung wasserlöslicher Produkte, trat bereits bei pH-Werten zwischen 6.8 und 8.0 auf. Bei einem pH-Wert der wässrigen Phase von 9.0 konnte nach 16 h Inkubation kein Startmaterial reisoliert werden.

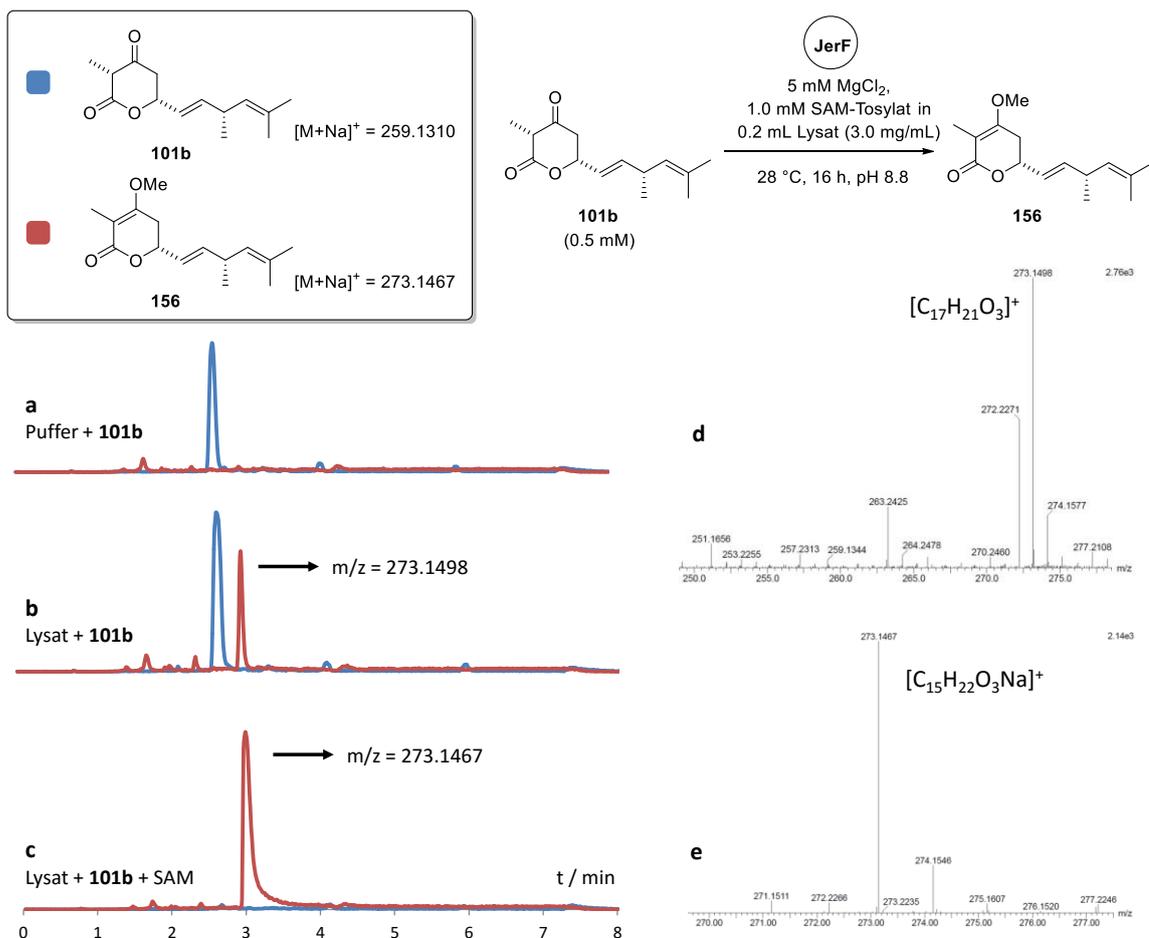


Abbildung 20: *In-vitro*-Enzymaktivitätstests mit His₆-JerF und Substrat **101b**. **a-c:** HPLC-Chromatogramme der EtOAc-Extrakte der einzelnen Experimente **a:** Chromatogramm des synthetisch hergestellten Eduktes (**101b**) in Reaktionspuffer (40 mM TRIS, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ pH 8,8). **b:** Lysat (Reaktionspuffer mit 3,0 mg/mL Gesamtproteinkonzentration) mit 0,5 mM **101b**. **c:** Lysat (Reaktionspuffer mit 3,0 mg/mL Gesamtproteinkonzentration) und 1,0 mM SAM-Tosylat mit 0,5 mM **101b**. **d:** Ausschnitt aus dem hochaufgelösten Massenspektrum für das Signal bei t_R = 3,0 min aus Teilabbildung b. **e:** Ausschnitt aus dem hochaufgelösten Massenspektrum für das Signal bei t_R = 3,0 min aus Teilabbildung c.

Analog zu den Versuchen mit dem Lacton **101a**, wurden Enzymaktivitätstests mit dem komplexen Substrat **101b** durchgeführt. Dafür wurden jeweils 0,5 mM Substrat **101b** mit Ganzzell-Lysaten aus der Expression von *jerF_pET20b(+)* in *E. coli* BL21(DE3) inkubiert und die im Anschluss erhaltenen EtOAc-Extrakte mittels HPLC-MS analysiert. Die verwendeten Reaktionsbedingungen und die erhaltenen Resultate sind in Abbildung 20 dargestellt.

In dem Kontrollexperiment (Abbildung 20b) mit dem Lysat und ohne Zusatz von SAM-Tosylat konnte das Startmaterial nach 16 h Inkubation nachgewiesen werden. Auffällig war hierbei das Auftreten eines Signals bei t_R = 3,0 min. Die Auswertung des Massenspektrums ergab eine Molekülmasse von m/z = 273.1498, welcher formal einer Elementzusammensetzung C₁₇H₂₁O₃ entspricht (Abbildung 20d). Es ist nicht

auszuschließen, dass es sich hierbei um ein Nebenprodukt einer Reaktion zwischen **101b** und dem Lysat handelte.

Wird Verbindung **101b** mit dem Lysat in Gegenwart von SAM-Tosylat inkubiert, so konnte ein vollständiger Umsatz des Startmaterials festgestellt werden (Abbildung 20c). Das Reaktionsprodukt ($t_R = 3.0$ min) besitzt eine Molekülmasse von $m/z = 273.1467$ und konnte somit dem Natriumaddukt des methylierten Produktes **156** eindeutig zugeordnet werden (Abbildung 20e).

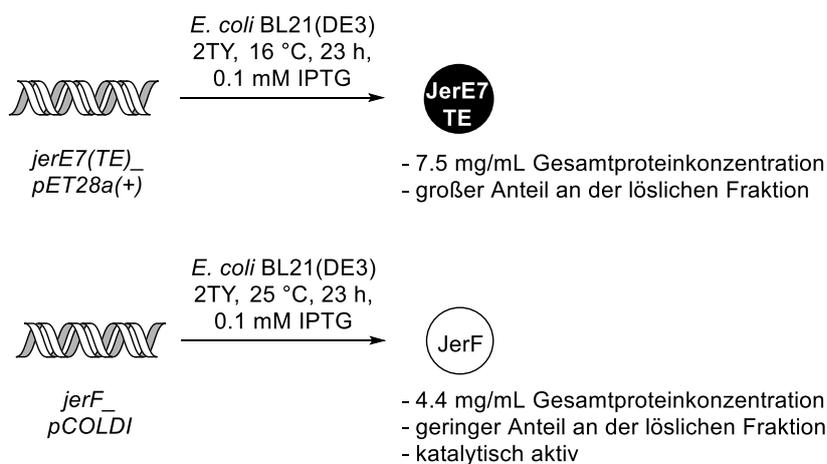
Im Vergleich zum Substrat **101a** weist **101b** eine deutlich höhere strukturelle Ähnlichkeit zu dem postulierten Jerangolid-Vorläufer **60** auf. Dies ist ein plausibler Grund für den erhöhten Umsatz der Verbindung **101b** im Vergleich zu **101a** (Vergleiche Abbildung 18h und Abbildung 20c). Die durchgeführten Enzymaktivitätstests wiesen darauf hin, dass His₆-JerF eine beachtliche Substrattoleranz bezüglich der δ -Lacton-Seitenkette an C5 besitzt.

Das Lacton **111** wurde ebenso für Aktivitätstests mit His₆-JerF umgesetzt, um den Einfluss der α -Methylgruppe auf die enzymatische Reaktion zu untersuchen. Dabei wurden die Reaktionsbedingungen aus Abbildung 18 verwendet. Allerdings konnte nach der Inkubation von **111** mit dem Lysat aus der Expression von *jerF_pCOLDI* in *E. coli* BL21(DE3) in keinem Fall das Startmaterial oder methyliertes Produkt durch HPLC-MS nachgewiesen werden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

4.1 Molekularbiologische Arbeiten

Die synthetischen Gene der ACP-Thioesterase-Didomäne JerE7(TE) und der vier *Tailoring*-Enzyme JerF, JerO, JerP und JerL aus Jerangolid-Biosynthese (Tabelle 18) wurden erfolgreich in die zur Verfügung stehenden Expressionsvektoren (*pET20b(+)*, *pET28a(+)*, *pCOLDI*, *pGEX-6P-1*, *pGEX-4T-3*) kloniert.



Schema 35: a: Optimierte Genexpression von *jerE7(TE)_pET28a(+)* in *E. coli* BL21(DE3) führte zur Bildung des gewünschten, löslichen Proteins. b: Die Genexpression von *jerF_pCOLDI* in *E. coli* BL21(DE3) führte zu geringen aber katalytisch aktiver Mengen an löslichem Protein.

Die Genexpression von *jerE7(TE)_pET28a(+)* in *E. coli* BL21(DE3) lieferte nach Optimierung ein lösliches Fusionsprotein, welches erfolgreich durch Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt werden konnte.

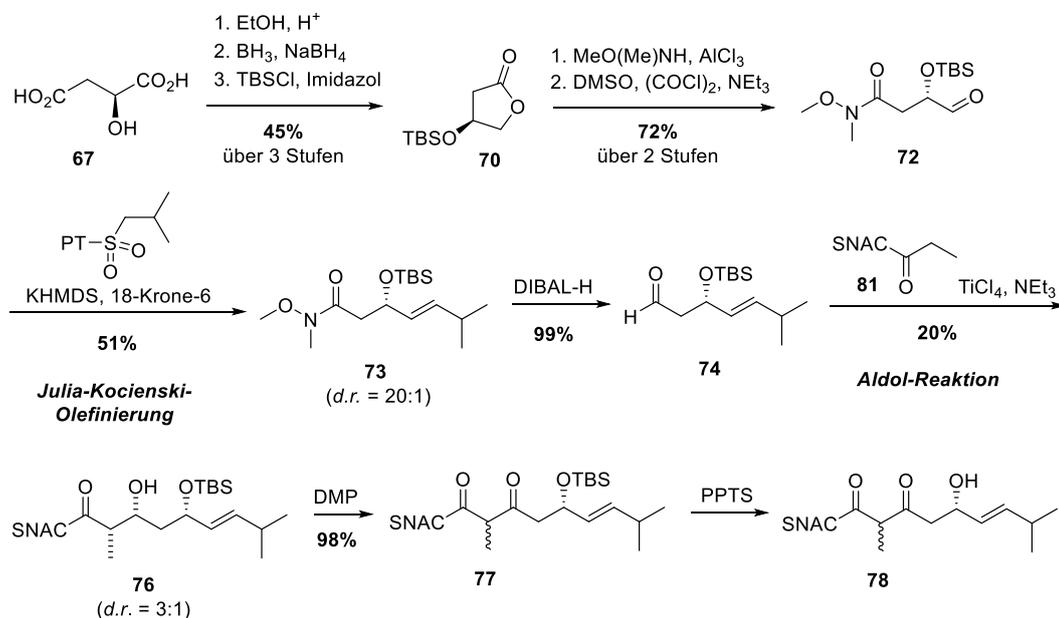
Die Genexpression von *jerF_pCOLDI* in *E. coli* BL21(DE3) lieferte geringe Mengen eines löslichen Fusionsproteins, welches sich nicht chromatographisch reinigen ließ. Unter allen getesteten Bedingungen für die Expression der O-Methyltransferase JerF kam es vermehrt zur Bildung von unlöslichem Protein, was auf nicht-optimale Expressionsbedingungen zurückgeführt werden könnte. Aufgrund der Expressionsergebnisse und der in dieser Arbeit durchgeführten Solubilisierungsversuche ist nicht auszuschließen, dass es sich bei JerF um ein Membran-assoziiertes Protein handelt. Die heterologe Genexpression von myxobakteriellen Genen in *E. coli* ist prinzipiell möglich.^[156] In diesem Fall könnte jedoch die Verwendung eines anderen Expressionsstammes basieren auf *Streptomyces* spp. erfolgversprechend sein. So konnte

die zu JerF homologe *O*-Methyltransferase Enck aus der Enterocin-Biosynthese erfolgreich in *S. coelicolor* YU105 exprimiert und gereinigt werden.^[87]

Ein verbessertes Expressionprotokoll verbunden mit höheren Ausbeuten an löslichem, gereinigtem Protein ist eine essentielle Voraussetzung für weiterführende Studien von JerF. Die Untersuchungen zu den Oxidoreduktasen JerO, JerP und JerL kamen in der vorliegenden Arbeit nicht über die Klonierung in die Expressionsvektoren und erste Expressionsversuche hinaus. Die heterologe Expression von funktionalen RIESKE-(2Fe-2S)-abhängigen Oxidoreduktasen (JerP, JerL) für *in-vitro*-Charakterisierung ist oft problematisch.

4.2 Synthetische Arbeiten

Die Syntheseroute zur Darstellung des β -Keto- δ -Hydroxy-Thioesters **78** zur *in-vitro*-Untersuchung von JerE7(TE) konnte zuverlässig und reproduzierbar bis zur OTBS-geschützten Vorstufe **77** realisiert werden. Schlüsselschritte waren eine (*E*)-selektive JULIA-KOSCIENSKI-Olefinierung und eine ungerichtete Aldolreaktion des Aldehyds **74** mit einem *N*-Acetylsteamin-Thioester **81**.

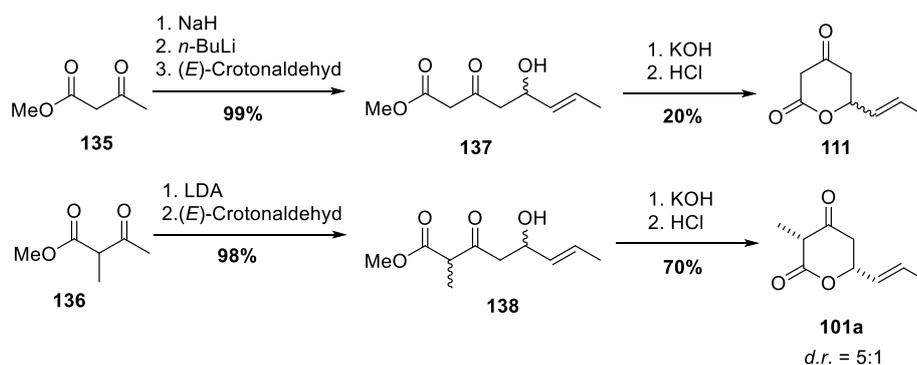


Schema 36: Die Synthese des geschützten β -Keto- δ -Hydroxy-Thioesters **77** erfolgte linear in 9 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 3%.

Die JULIA-KOSCIENSKI-Olefinierung gelang nach Modifikation eines Protokolls von POSPÍŠIL^[132] mit einer Ausbeute von 51% bei sehr guter Diastereoselektivität. Die Titan(IV)-vermittelte Aldolreaktion zwischen **74** und **81** gelang nach Optimierungsstudien mit Propionaldehyd

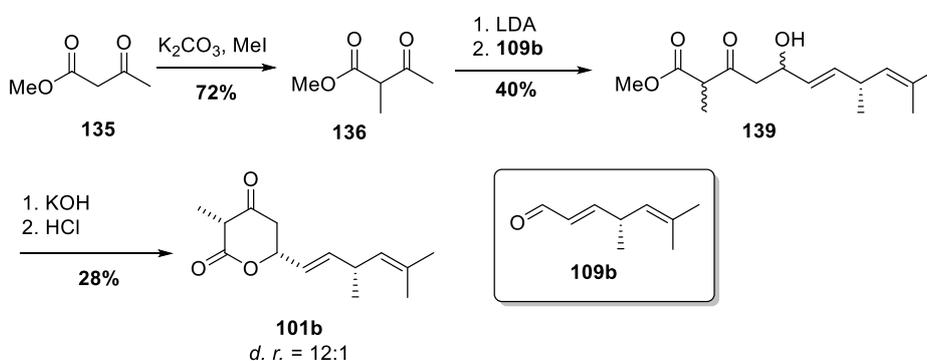
in 20% Ausbeute. Die in dieser Arbeit entwickelte Reaktionssequenz von Aldehyd **74** zur Verbindung **77** bietet einen zweistufigen, reproduzierbaren Zugang zu δ -Hydroxy- β -Keto-Thioestern (siehe Schema 36). Durch die Verwendung des Propionats **81** konnten für die Darstellung von Verbindung **77** potentielle instabile Zwischenstufen wie β -Ketosäuren vermieden und der *N*-Acetylcysteamin-Rest ohne zusätzliche Transesterifikationen eingeführt werden. Die OTBS-Entschützung von **77** wurde für Enzymaktivitätstest im 1-mg-Maßstab durchgeführt.

Die Substrate **111** und **101a** für die *in-vitro*-Untersuchung der *O*-Methyltransferase wurden gemäß Schema 37 dargestellt. Dabei wurden aus den Estern **135** und **136** die entsprechenden Dienolate generiert und mit α,β -ungesättigten Aldehyden zur Reaktion gebracht.



Schema 37: Die Darstellungen der 3-Oxo- δ -Lactone **111** und **101a** erfolgte durch eine Sequenz aus Aldolreaktion und Verseifung der Methylester **137** und **138**. Die Lactonisierung von **138** erfolgte diastereoselektiv.

Analog dazu wurde der komplexe Vorläufer **101b** aus Verbindung **135** in 3 linearen Stufen dargestellt. Der enantiomerenreine Aldehyd **109b** wurde von F. LINDNER bereitgestellt und kann in 8 Stufen und 33% Gesamtausbeute synthetisiert werden.^[141]



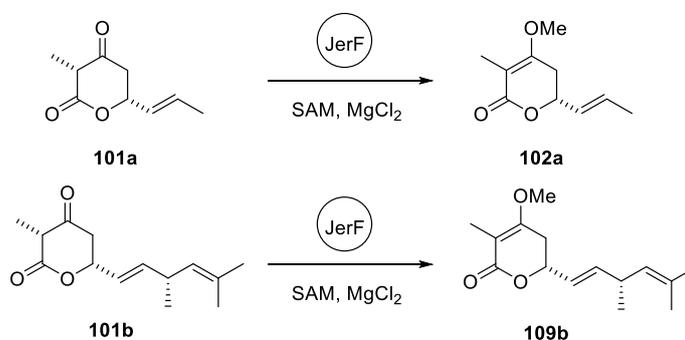
Schema 38: Die Darstellung des Substrates **101b** erfolgte ausgehend von **135** in 3 Stufen mit einer Gesamtausbeute von 8%.

4.3 Enzymologische Arbeiten

Die HPLC-MS-Untersuchungen von **78** mit JerE7(TE) lieferten keine aussagekräftigen Ergebnisse bezüglich der enzymatischen Aktivität der Thioesterase-Didomäne. Die Tests zeigten eine spontane Lactonisierung des Substrates **78** als Konkurrenzreaktion unter den gewählten Reaktionsbedingungen. Weiterführende Studien sollten daher auf die Bereitstellung geeigneter Reaktionspuffer abzielen, unter denen Substrate wie **78** ausreichend inert sind. Da der geschützte Vorläufer **77** eine wesentlich höhere chemische Stabilität besitzt, könnte auch eine *in-situ* OTBS-Entschützung von **78** in Gegenwart von JerE7(TE) durch einen PPTS-haltigen Puffer in Erwägung gezogen werden.

Falls die Voraussetzung der Substratstabilität erfüllt werden kann, sollte der Fokus insbesondere auf die Untersuchung der Stereo- und Regioselektivität der enzymatischen Lactonisierung gelegt werden. Dabei sollte eine Bewertung des biokatalytischen Potentials von JerE7(TE) stets vor dem Hintergrund der bereits zur Verfügung stehenden, leistungsfähigen Syntheserouten zum stereoselektiven Aufbau von cyclischen Estern erfolgen.

Die enzymatischen Reaktionen zwischen der *O*-Methyltransferase His₆-JerF und den Substraten **101a** und **101b** lieferten die methylierten Produkte **102a** und **109b**. Somit konnte die Rolle von JerF im Rahmen der Jerangolid-Biosynthese nach JULIEN *et al.* experimentell bestätigt werden.^[108] Es konnte gezeigt werden, dass His₆-JerF eine beachtliche Substrattoleranz bezüglich der Lacton-Seitenkette aufweist. Dabei konnte für das Substrat **101b** ein höherer Umsatz im zu **101a** festgestellt werden.



Schema 39: Erfolgreich durchgeführte, enzymatische Umsetzungen mit His₆-JerF.

Die Ergebnisse dieser Arbeit charakterisieren JerF als substrattolerante *O*-Methyltransferase, welche chemoselektiv 3-Oxo- δ -Lactone in 4-Methoxy-5,6-

dihydropyrone umsetzt. Weiterführende Studien könnten an die hier durchgeführten Ansätze zur Evaluierung der Substrattoleranz anknüpfen. Neben dem Einfluss der Lacton-Seitenkette an C5 sollte der Einfluss der α -Methylgruppe (C2) auf die Reaktivität näher untersucht werden (z.B. durch Verbindung **141**, Abbildung 21). Versuche mit den hypothetischen Substraten **140** und **141** könnten weiterhin zur Aufklärung der Reihenfolge der *Tailoring*-Prozesse innerhalb der Jerangolid-Biosynthese beitragen.

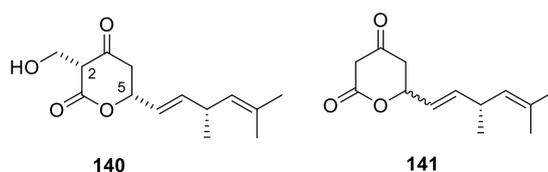


Abbildung 21: Vorgeschlagene Verbindungen **140** und **141** für die weiterführende Evaluation der Substrattoleranz der *O*-Methyltransferase JerF.

Die Hydroxymethylgruppe an der C2-Position in Verbindung **140** repräsentiert die postulierte, enzymatische Modifikation durch die Oxidoreduktasen JerL und JerO nach JULIEN *et al.* Wenn Verbindung **140** im Gegensatz zu **101b** nicht durch JerF akzeptiert werden würde, wäre dies ein starker Beleg dafür, dass JerF früher in die Biosynthese von Jerangolid A eingreift als JerO und JerL.

5 Experimenteller Teil

5.1 Methoden

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

In einem 10-mL-Reaktionsgefäß wurden 5 mL LB-oder 2TY-Medium mit den gewünschten *E. coli*-Zellen aus einer Gefrierkultur (-78 °C) inokuliert und über Nacht im Schüttler bei 37 °C und 180 U/min inkubiert. Von dieser Kultur wurde 1 mL in einen 250-mL-Erlenmeyer-Kolben mit 50 mL LB-oder 2TY-Medium überführt und für 3 h im Schüttler (37 °C, 180 U/min) inkubiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 4°C und 3500g zentrifugiert und auf Eis gestellt. Das Pellet wurde vorsichtig in 50 mL Kompetenzpuffer I (Tabelle 22) resuspendiert und für 1 h bei 4 °C gelagert. Die Zellen wurden für 10 min bei 4 °C und 3500g zentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 5 mL Kompetenzpuffer II (Tabelle 22) resuspendiert. Die chemisch kompetenten Zellen wurden bei 4 °C zu 100 µL aliquotiert und bei -78 °C gelagert.

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

Für die Transformation wurden 100 µL chemisch kompetente Zellen für 10 min auf Eis angetaut. Anschließend wurden in einem 1.5-mL-Reaktionsgefäß 0.5-1.0 µL Plasmid-DNA-Lösung vorgelegt und mit den chemisch kompetenten Zellen vermischt. Die Mischung wurde danach für 10 min auf Eis gestellt. Die Transformation erfolgte im Anschluss durch Hitzeschock bei 42 °C für 60 s. Die Proben wurden für weitere 10 min auf Eis gestellt, mit 500 µL LB-oder 2TY-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 30 s bei 8000g wurden 500 µL Überstand verworfen, der Rückstand vorsichtig resuspendiert und auf LB-oder 2TY-Agarplatten (25 mL Agar versetzt mit 0.1% (v/v) Antibiotikum, siehe Tabelle 22) ausgestrichen. Anschließend wurden die Agarplatten bei 37 °C inkubiert.

5.1.3 Stammhaltung

Zur Konservierung der Stämme wurden Gefrierkulturen angefertigt. Hierzu wurden 500 μL einer Bakterienkultur mit 500 μL Glycerin (50% in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$) in einem 1.8-mL-Kryoröhrchen vermischt und bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

5.1.4 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* One Shot® TOP10 (Miniprep)

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte aus *E. coli* One Shot® TOP10-Zellen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Dazu wurden 5 mL einer Bakterienkultur über Nacht bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 180 U/min kultiviert. Von dieser Kultur wurden 2 mL abgenommen, bei 10000g für 30 s zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Das erhaltene Pellet wurde in 200 μL Lösung I (Tabelle 22) resuspendiert. Nach 1-2 min Inkubation bei RT wurden 200 μL Lösung II (Tabelle 22) hinzugegeben und gut vermischt. Nach 2 min Inkubation bei RT wurden 200 μL Lösung III (Tabelle 22) hinzugegeben und mehrfach vorsichtig invertiert, für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 13000g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen 1.5-mL-Reaktionsgefäß auf 300 μL Chloroform gegeben und die Mischung nach mehrfachem Invertieren bei 13000g für 5 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues 1.5-mL-Reaktionsgefäß überführt und mit 350 μL Isopropanol gut vermischt. Die resultierende Lösung wurde bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und 13000g für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 μL 70% (v/v) Ethanol resuspendiert und bei $4\text{ }^\circ\text{C}$, 13000g für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und Reste von Ethanol bei $45\text{ }^\circ\text{C}$ und vermindertem Druck entfernt. Das Pellet wurde anschließend in 50 μL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ gelöst. Plasmid-DNA-Lösungen wurden bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

5.1.5 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* One Shot® TOP10 (Midiprep)

Die Präparation von größeren Mengen ($\approx 350\text{ }\mu\text{g}$) Plasmid-DNA erfolgte aus *E. coli* One Shot® TOP10-Zellen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Dazu wurden 5 mL einer Bakterienkultur über Nacht bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 180 U/min kultiviert. Von dieser wurden 2 mL abgenommen, bei 5000g für 10 min zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Das erhaltene Pellet wurde in 2 mL Lösung I (Tabelle 22) resuspendiert. Nach 10 min

Inkubation bei RT wurden 4 mL Lösung II (Tabelle 22) hinzugegeben und gut vermischt. Nach 1 min Inkubation bei RT wurden 3 mL Lösung III (Tabelle 22) hinzugegeben und mehrfach vorsichtig invertiert und anschließend bei 10000g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem neuen 15-mL-Reaktionsgefäß auf 1 mL Chloroform/Isoamylalkohol gegeben und nach mehrfachem Durchmischen bei 10000g für 10 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues 15-mL-Reaktionsgefäß überführt und mit 7.2 mL Isopropanol gut vermischt. Die resultierende Lösung wurde bei 4 °C und 10000g für 60 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 mL 70% (v/v) Ethanol resuspendiert und bei 4 °C, 10000g für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und Reste von Ethanol bei 45 °C und vermindertem Druck entfernt. Das Pellet wurde anschließend in 100 µL H₂O_{dd} gelöst. Plasmid-DNA-Lösungen wurden bei -20 °C gelagert.

5.1.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von zirkulärer und linearisierter DNA erfolgte durch spektroskopische Analyse (*NanoDrop*) gegen H₂O_{dd} als Referenz.

5.1.7 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA nach ihrer Größe erfolgte in einer Agarosematrix durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die Agarosematrix wurde im geschmolzenen Zustand wahlweise mit 2 µL 0.1% Ethidiumbromid oder 5 µL Roti®-GelStain versetzt. Als DNA-Größenstandard wurden 3 µL der Marker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Plus)* der Firma *Fermentas* oder *Quick-Load® 1 kb DNA Ladder* der Firma *New England Biolabs* verwendet. DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 des Probenvolumens an 6-fach DNA-Ladepuffers versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 110 V (250 mA, 150 W) für 45 min durchgeführt. Die Gel-Maße betragen in der Regel 7 cm x 8.5 cm bei einer Gelhöhe von 3-5 mm. Die Visualisierung und Dokumentation der Agarosegele erfolgte unter UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$).

5.1.8 Enzymatische Hydrolyse von Plasmid-DNA

Die enzymatische Hydrolyse der Expressionsvektoren und der erworbenen, synthetischen Gene erfolgte unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *NdeI*, *EcoRI*, *XhoI* und *HindIII*. Die Gesamtreaktionsvolumina betragen zwischen 20 μL („Testrestriktion“) und 100 μL . Die Reaktion erfolgte für Ansätze bis zu einem Gesamtvolumen von 20 μL bei 37 °C für 1 h. Für Ansätze ab einem Gesamtvolumen von 50 μL erfolgte die Reaktion bei RT über Nacht.

Tabelle 7: Standardprotokoll für die enzymatische Hydrolyse von Plasmid-DNA.

Reagenzien	Volumen ($V_{\text{gesamt}} = 20 \mu\text{L}$)	Volumen ($V_{\text{gesamt}} = 50 \mu\text{L}$)
Plasmid-DNA (400 ng/ μL)	2.5 μL	40.0 μL
Restriktionsendonuklease 1 (10 u/ μL)	1.0 μL	2.0 μL
Restriktionsendonuklease 2 (10 u/ μL)	1.0 μL	2.0 μL
10x Reaktionspuffer	2.0 μL	5.0 μL
H ₂ O _{dd}	13.5 μL	1.0 μL

*die Zugabe der Restriktionsendonukleasen erfolgte stets zuletzt.

5.1.9 Isolierung und Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Reinigung und Isolierung von linearisierter DNA aus Agarosegelen erfolgte mithilfe des molekularbiologischen Kits *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* der Firma *Macherey-Nagel* nach den Anleitungen des Herstellers.

5.1.10 Ligation von linearisierter DNA

Die enzymatische Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierter Plasmid-DNA erfolgte durch die T4 DNA Ligase (*Thermo Fisher Scientific*). Die Ligationsreaktionen erfolgten bei RT über Nacht. Die Inaktivierung der Ligase erfolgte anschließend durch Inkubation bei 65 °C für 10 min. Im Anschluss daran wurden 20 μL des Ligationsansatzes für die Transformation von 100 μL chemisch kompetenten *E. coli* One Shot® TOP10 Zellen verwendet.

Tabelle 8: Standardprotokoll für die Ligation von linearisierter DNA.

Reagenzien	Volumen ($V_{\text{gesamt}} = 40 \mu\text{L}$)
linearisierte Plasmid-DNA (2.4 ng/ μL)	12.5 μL
Insert-DNA (10 ng/ μL)	15.0 μL
10x T4 DNA-Ligase Puffer	4.0 μL
T4 DNA-Ligase (5 u/ μL)	0.5 μL
H ₂ O _{dd}	8.0 μL

Die Ligation von *PCR*-Produkten in den Vektor *pJET1.2/blunt* erfolgte mit dem *CloneJET PCR Cloning Kit* (*Thermo Fisher Scientific*). Das *PCR*-Produkt wurde ohne weitere Reinigung eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten bei RT über Nacht. Die Inaktivierung der Ligase erfolgte anschließend durch Inkubation bei 65 °C für 10 min. Im Anschluss wurde der komplette Ligationsansatz für die Transformation von 100 μL chemisch kompetenten *E. coli* One Shot® TOP10 Zellen verwendet.

Tabelle 9: Standardprotokoll für die Ligation von *PCR*-Produkten.

Reagenzien	Volumen ($V_{\text{gesamt}} = 20 \mu\text{L}$)
<i>PCR</i> -Produkt (siehe Tabelle 11)	1.0 μL
<i>pJET1.2/blunt</i> (50 ng/ μL)	0.5 μL
2x Reaktionspuffer	10.0 μL
T4-DNA-Ligase (5 u/ μL)	1.0 μL
H ₂ O _{dd}	7.5 μL

5.1.11 Polymerasekettenreaktionen (*PCR*)

Für die Insertion von Genen in die Expressionsvektoren *pET20b(+)*, *pET32a(+)*, *pGEX-4T-3* und *pGEX-6P-1* (siehe Tabelle 19), mussten zum Teil die Restriktionsschnittstellen der synthetischen Gene am 3'- und am 5'-Ende durch *PCR* modifiziert werden. Zum Einsatz kamen dabei die thermostabilen DNA-Polymerasen Pfu (*Thermo Fisher Scientific*) und Phusion® *High-Fidelity* DNA-Polymerase (*Thermo Fisher Scientific*), welche beide eine zusätzliche 3'→5'-Exonukleaseaktivität („Korrekturlesefunktion“) aufweisen.

Tabelle 10: PCR-Ansatz unter Verwendung der Pfu-DNA-Polymerase.

Reagenzien	Volumen ($V_{\text{gesamt}} = 50 \mu\text{L}$)	Endkonzentration
10x Pfu-Puffer (mit MgSO_4)	5.0 μL	1x
10 mM dNTP-Mix*	1.0 μL	200 μM
100 μM 5'-Primer	0.5 μL	1 μM
100 μM 3'-Primer	0.5 μL	1 μM
DNA-Matrize	10.0 μL ($\leq 10 \text{ ng}$)	$\leq 0.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$
DMSO	1.5 μL	3% v/v
Pfu-DNA-Polymerase u/ μL)	(2.5 1.0 μL)	0.05 u/ μL
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	30.5 μL	-

*dNTP-Mix enthält jeweils 2.5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP.

Tabelle 11: PCR-Ansatz unter Verwendung der Phusion®-DNA-Polymerase.

Reagenzien	Volumen ($V_{\text{gesamt}} = 50 \mu\text{L}$)	Endkonzentration
5x Phusion® HF- oder 5x GC-Puffer	10.0 μl	1x
10 mM dNTP-Mix	1.0 μl	200 μM
10 μM 5'-Primer	2.5 μl	0.5 μM
10 μM 3'-Primer	2.5 μl	0.5 μM
DNA-Matrize	1.0 μL ($\leq 10 \text{ ng}$)	$\leq 0.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$
Phusion®-DNA-Polymerase (2.0 u/ μL)	0.5 μl	0.02 u/ μL
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$	32.5 μl	-

*dNTP-Mix enthält jeweils 2.5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP.

Die PCR wurden in 0.2-mL-Reaktionsgefäßen in einem *Thermocycler* mit folgendem Temperaturprogramm (Tabelle 12) durchgeführt.

Tabelle 12: Allgemeines *PCR*-Protokoll für die DNA-Amplifikation mithilfe der Pfu- oder Phusion®-DNA-Polymerase.

Zyklen	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
1	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
Zugabe der DNA-Polymerase (Pfu oder Phusion®)			
35	Denaturierung	95 °C	30 s
	Primerhybridisierung	56-68 °C	30 s
	Elongation	72 °C	5 min 25 s
1	Finale Elongation	72 °C	15 min
1	Lagerung	4 °C	bis zur Probenentnahme

Für den Nachweis positiver Transformanten nach einer erfolgten Ligation (siehe hierfür Seite 78) wurde eine Kolonie-*PCR* durchgeführt. Zur Durchführung wurde jeweils eine einzelne Kolonie von *E. coli* One Shot® TOP10 Zellen von einer Agarplatte zuerst auf eine weitere Agarplatte überführt und dann die verbleibenden, geringe Restmengen in ein 0,2-mL-*PCR*-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden diese mit *Mastermix* 1 (siehe Tabelle 13) versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde zu der Lösung frisch angesetzter *Mastermix* 2 (siehe Tabelle 13) hinzugegeben und danach das Temperaturprogramm (Tabelle 14) gestartet. Es wurden die genspezifischen Primer aus Tabelle 20 verwendet. Die Amplifikate wurden im Anschluss mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

Tabelle 13: *PCR*-Ansatz für die Kolonie-*PCR* mithilfe der Taq-DNA-Polymerase.

	Reagenzien	Volumen ($V_{\text{gesamt}} = 25.0 \mu\text{L}$)	Endkonzentration
Mastermix 1	10x Taq-Puffer	2.5 μl	1x
	H ₂ O _{dd}	20.9 μl	-
Mastermix 2	10 mM dNTP-Mix	0.5 μl	200 μM
	10 μM 5'-Primer	0.5 μl	0.2 μM
	10 μM 3'-Primer	0.5 μl	0.2 μM
	Taq-DNA-Polymerase	0.1 μl	0.02 u/ μL
	(5.0 u/ μL)		

Tabelle 14: PCR-Protokoll für die Kolonie-PCR mithilfe der Taq-DNA-Polymerase.

Zyklen	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
1	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
Zugabe von <i>Mastermix 2</i>			
40	Denaturierung	95 °C	20 s
	Primerhybridisierung	56-68 °C	30 s
	Elongation	72 °C	1 min 30 s
1	Finale Elongation	72 °C	15 min
1	Lagerung	8 °C	Bis zur Proben- entnahme

5.1.12 Heterologe Genexpression in *E. coli* BL21(DE3)

Die Expression der Thioesterase (JerE7(TE)) und der *Tailoring*-Enzyme JerF, JerO, JerP und JerL erfolgte mit *E. coli* BL21(DE3) oder *E. coli* RosettaTM(DE3)pLysS in LB- oder 2TY-Medium. Zunächst wurde das gewünschte Expressionsplasmid in den gewünschten Expressionsstamm transformiert. Die transformierten Zellen (Einzelkolonie auf einer Agarplatte oder eine Gefrierkultur) wurden für die Inokulierung von 5 mL Medium, versetzt mit 5 µL der entsprechenden Antibiotika-Stammlösung, verwendet. Diese wurde bei 37 °C und 180 U/min über Nacht (ca. 16 h) kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurde eine antibiotikahaltige 50-mL-Hauptkultur in einem 250-mL-Erlenmeyerkolben auf eine $OD_{600} = 0.05$ angeimpft und bei 37 °C und 180 U/min kultiviert. Nach Erreichen einer $OD_{600} = 0.5 - 1.0$ wurde die Genexpression durch Zugabe einer IPTG-Lösung induziert. Die IPTG-Konzentration, sowie die Inkubationsbedingungen vor und nach IPTG-Zugabe variierten für die einzelnen Proteine. Im Anschluss wurde die Zellsuspension bei 4 °C und 10000g für 45 min zentrifugiert und das Zellpellet für die Weiterverwendung auf Eis gestellt oder bei -20 °C gelagert.

5.1.13 Herstellung von Ganzzellextrakten

Die nach 5.1.12 gewonnenen Zellpellets wurden in einem Bindepuffer (siehe Tabelle 22) resuspendiert. Typischerweise wurden 10 mL Puffer pro Gramm Zellpellet verwendet. Es

wurden zwei verschiedene, mechanische Zellaufschlussmethoden in Abhängigkeit von dem Gesamtprobenvolumen verwendet.

5.1.14 Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung

Der Zellaufschluss von Suspensionen mit einem Gesamtvolumen zwischen 1 - 10 mL erfolgte durch Behandlung mit Ultraschall. Die Proben wurden während des Aufschlusses stets auf Eis gekühlt. Die Proben wurden im Anschluss bei 4 °C und 10000g für 40 min zentrifugiert. Die erhaltene lösliche Fraktion (Zelllysat) wurde direkt für Reinigungsverfahren, Proteinanalytik beziehungsweise für Enzymaktivitätstests verwendet oder separat mit der unlöslichen Fraktion (Zellpellet) bei -20 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

Tabelle 15: Protokoll für den Zellaufschluss mittels Ultraschalltauchsonde.

Zyklen	Programmschritt	Dauer
7	45% Amplitude	30 s
	0.02 kJ/s Leistungseintrag	
	Pause	30 s

5.1.15 Zellaufschluss durch die *French-Press*

Der Zellaufschluss von Suspensionen mit einem Gesamtvolumen zwischen 10 - 40 mL erfolgte mittels der *French-Press*. Die Zellen wurden in zwei Zyklen bei ≈ 6.9 MPa (1000 psi) aufgeschlossen. Alle mit dem Lysat in Kontakt kommenden Geräteteile wurden vorher für 10 min bei -80 °C gekühlt. Die Proben wurden im Anschluss bei 4 °C, 10000g für 40 min zentrifugiert. Das erhaltene Zelllysat wurde direkt für Reinigungsverfahren, Proteinanalytik beziehungsweise für Enzymaktivitätstests verwendet oder separat mit dem Zellpellet bei -20 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

5.1.16 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie

Die Reinigung der His₆-Fusionsproteine JerE7(TE), JerF, JerO, JerP und JerL erfolgte durch Nickelchelate-Affinitätschromatographie. Als stationäre Phase wurden 2 mL eines

Nitrilotriacetat-quervernetzten Agaroseharzes in einer offenen 10-mL-Spritze mit Cellulosefritte verwendet. Als Harze kamen Ni-NTA His-Bind® Resin (*Qiagen*) und Protino® Ni-NTA Agarose (*Macherey-Nagel*) zum Einsatz. Das Waschen des Harzes und die Elution der einzelnen Fraktionen erfolgten gravitativ. Alle manuellen Schritte wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei 4 °C durchgeführt. Die Äquilibration erfolgte durch Waschen des Harzes mit 20 mL Bindepuffer. Die Beladung erfolgte daraufhin durch wiederholten Durchfluss des Zelllysats oder gegebenenfalls durch Inkubation des Lysats mit dem Harz bei 4 °C, 50 U/min über Nacht. Das Waschen, d.h. das Entfernen von unspezifisch gebundenen Proteinen und anderen Zellbestandteilen, erfolgte mit 10 mL Bindepuffer. Ausgehend von den Binde- und Elutionspuffern (Tabelle 22) wurden Lösungen zu jeweils 10 mL mit Imidazol-Konzentrationen von 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 und 1000 mM hergestellt und nacheinander für die Elution von gebundenen Proteinen eingesetzt. Die Entfernung sämtlicher Fremdbestandteile von der stationären Phase erfolgte mit 10 mL 0.1 M NaOH. Die Lagerung des Harzes erfolgte in 20% EtOH (v/v) in H₂O_{dd} bei 4 °C.

5.1.17 Gelfiltration

Die Gelfiltration erfolgte gravitativ mit PD-10 *desalting columns* (Sephadex G-25, *GE Healthcare*). Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

5.1.18 Entsalzung und Konzentrierung von proteinhaltigen Lösungen

Für die Änderung der Pufferzusammensetzung und Salzkonzentrationen wurden folgende Zentrifugationseinheiten verwendet: Roti®-Spin MINI-10 (*Carl Roth*, 1.5 mL, MWCO = 10 kDa), Vivaspin 20 (*Sartorius*, 20 mL, MWCO = 10 kDa) und Amicon Ultra-15 (*Merck Millipore*, 15 mL, MWCO = 10 kDa) verwendet. Die Zentrifugation erfolgte bei 4 °C, 6000g.

5.1.19 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in Lösung erfolgte nach BRADFORD^[157]. Hierzu wurden in Mikrotiterplatten 50 µL einer verdünnten Proteinprobe mit 200 µL Arbeitslösung Roti®-Nanoquant (20 mL 5-fach Roti®-Nanoquant, 80 mL H₂O_{dd}) versetzt

und für 5 min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde bei den Wellenlängen $\lambda_1 = 590$ nm und $\lambda_2 = 450$ nm bestimmt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde durch externe Kalibrierung anhand einer zuvor erstellten BSA-Verdünnungsreihe berechnet. Für jede Probe wurde stets eine Dreifachbestimmung der Absorptionswerte durchgeführt.

5.1.20 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse der Proteinzusammensetzung und Reinheit der Zelllysate und Zellpellets erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dazu wurden 20 μ L Zelllysate mit 20 μ L Protein-Ladepuffer versetzt. Zur Analyse der Zellpellets wurden 20 μ L 10 x LAEMMLI-Mix mit 20 μ L Protein-Ladepuffer und einer Pipettenspitze des Zellpellets suspendiert. Alle Proben wurden, soweit nicht anders vermerkt, anschließend für 10 min bei 95 °C inkubiert. Pro Geltasche wurden 12-15 μ L Proteinprobe aufgetragen. Als Proteinstandard wurden 5 μ L *PageRulerTM Prestained/Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific)* oder *Color Protein Standard, Broad Range (11-245 KDa, NEB)* verwendet. Die Fokussierung der Proteine erfolgte für 10 min bei 125 V (190 mA, 125 W). Die Auftrennung erfolgte für 50 min bei 175 V (500 mA, 150 W). Die Gele wurden im Anschluss über Nacht in Färbelösung bei RT und 60 U/min inkubiert und mittels Entfärbelösung bis zur gewünschten Farbtintensität entfärbt.

5.1.21 Western Blot und Immunodetektion von Proteinen

Für den immunologischen Nachweis von His₆-Fusionsproteinen wurden *Western Blots* durchgeführt. Die Übertragung elektrophoretisch aufgelöster Proteine von dem Polyacrylamidgel auf eine 0.2 μ m Nitrocellulose-Membran (OPTITRAN BA-S 83 REINFORCED NC, *Schleicher & Schuell*) erfolgte im elektrischen Feld nach dem *Semidry*-Verfahren. Dazu wurden 6 Lagen Gel-Blotting Papier (2 mm Cellulose, *Schleicher & Schuell*) und die Nitrocellulose-Membran auf die Gelgröße zurechtgeschnitten und für 10 min in Blot-Puffer inkubiert. Zur Entfernung des SDS wurde das Gel für 10 min in TBS-Puffer inkubiert.

Der Transfer erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 190 V (140 mA) für 30 min. Anschließend wurde zur Blockierung der freien Proteinbindungsstellen die Nitrocellulose-Membran für 15 min in TBS-T-MP-Puffer bei RT und 60 U/min inkubiert.

Zur reversiblen Visualisierung der Proteinbanden wurde der TBS-T-MP-Puffer durch eine Ponceau S-Lösung ersetzt und für 15 min bei RT, 60 U/min inkubiert. Der Ponceau S Azofarbstoff wurde anschließend durch Inkubation in TBS-T-MP-Puffer entfernt.

Die Immunofärbung erfolgte durch eine Farbstoffpräzipitation, die durch die Alkalische Phosphatase katalysiert wurde. Dazu wurde die Nitrocellulose-Membran mit 10 μ L Antikörper-Lösung I (Tabelle 22) in 10 mL TBS-T-MP-Puffer versetzt und für 15 min, 60 U/min bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal mit TBS-T-MP-Puffer gewaschen (Inkubation für 5 min, 60 U/min bei RT). Im Anschluss daran wurden 2 μ L Antikörper-Lösung II (Tabelle 22) in 10 mL TBS-T-MP-Puffer hinzugegeben und für 15 min, 60 U/min bei RT inkubiert. Abschließend wurde dreimal mit TBS-Puffer gewaschen.

Zur Detektion wurden 66 μ L der NBT-Stammlösung mit 10 mL Alkalische Phosphatase-Puffer vermischt, mit 33 μ L der BCIP-Stammlösung versetzt und nach mehrfachem Invertieren auf die Nitrocellulose-Membran gegeben. Nach 5-10 min Inkubation bei RT und 60 U/min wurden Banden von His₆-Fusionsproteinen sichtbar.

5.1.22 Enzymaktivitätstests mit His₆-JerF

Die Reaktionen für die Auswertung mittels HPLC-MS-Methoden wurden in einem 1.5-mL Reaktionsgefäß bei 28 °C für 16 h durchgeführt. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 200 μ L. Als Reaktionspuffer wurde 40 mM TRIS, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ (pH 8.8) verwendet. Die Konzentrationen der Substrate betrug jeweils 0.25 mM (1 μ L einer 50 mM Stammlösung in EtOAc, getrocknet in der Speedvac). Die Konzentration an S-(5'-Adenosyl)-L-methionin-tosylat (SAM-Tosylat) betrug 0.97 M (4 μ L einer 50 M Stammlösung in H₂O_{dd}). In den Experimenten mit His₆-JerF betrug die Gesamtproteinkonzentration (Doppelbestimmung nach Bradford) des Totallysats ca. 2.7 mg/mL. Das Totallysat wurde durch Aufschluss von 1.4 g Zellen (*E. coli* BL21 (DE3), *jerF_pCOLDI*) in 14 mL Aufschlusspuffer (40 mM TRIS, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 70 μ L Proteaseinhibitorcocktail (ROTH), pH 8.8) gewonnen. Der Aufschluss erfolgte durch Ultraschall unter Eiskühlung (siehe Seite 83). Nach Entfernen der Zelltrümmer durch

Zentrifugation (4 °C, 10000g, 45 min) wurde der Überstand mittels Gelfiltration gereinigt (PD-10 *desalting column*, GE) und direkt für die Assays verwendet. Nach der Reaktion wurde die Reaktionslösung mit 100 µL gesättigter NaCl-Lösung versetzt und anschließend zweimal mit 400 µL EtOAc extrahiert. Nach dem Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in 1 mL Acetonitril gelöst und davon 100 µL per HPLC-MS (Q-ToF Premier, H₂O_{dd}/MeCN = 95:5 → 5:95 + 0.1% FA, 0.4 mL/min, 8 min) analysiert.

Die Reaktionen im semi-präparativen Maßstab erfolgten analog mit 1.0 bis 7.3 mg Substrat (ca. 0.006 bis 0.04 mmol) und wurden anschließend ¹H-NMR-spektroskopisch ausgewertet. Für die enzymatische Umsetzung von **4a** wurden in einem 250-mL-Erlenmeyerkolben 7.3 mg Substrat (0.04 mmol, 1.0 Äq.) in 40 mL Lysat (40 mM TRIS, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 8.8 mit 1.1 mg/mL Gesamtproteinkonzentration) suspendiert. Anschließend wurden 25 mg SAM-Tosylat (0.04 mmol, 1.0 Äq.) zu der Suspension gegeben und die Reaktion bei 28 °C und 75 U/min für 24 h inkubiert. Danach wurden 60 mL gesättigte NaCl-Lösung hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 5 min bei 10000g zentrifugiert. Der Überstand wurde dreimal mit 100 mL EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet.

5.1.23 Stabilitätstests mit Substrat **101a**

5 mg (0.03 mmol) des 3-Oxo- δ -Lactons **101a** wurden in 20 mL Puffer gelöst und in einem 100-mL-Erlenmeyerkolben bei 70 U/min und 28°C inkubiert. Nach 16 h Inkubation wurde die homogene wässrige Phase dreimal mit 20 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 40 mL gesättigter wässriger NaCl-Lösung gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand ¹H-NMR-spektroskopisch untersucht. Die verwendeten Pufferzusammensetzungen und Ausbeuten an reisolierem Startmaterial sind der Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: Verwendete Puffersysteme für die Stabilitätstests mit **101a**.

Puffer	pH-Wert	Ausbeute
25 mM HEPES, 100 mM NaCl	6.8	80% (4.5 mg)

50 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl	7.5	20%
25 mM TRIS, 5 mM MgCl ₂	8.0	5%
50 mM TRIS, 10 mM MgCl ₂	9.0	>1%

5.2 Material

5.2.1 Organismen

In Tabelle 17 sind alle in dieser Arbeit verwendeten bakteriellen Organismen aufgelistet.

Tabelle 17: Verwendete Bakterienstämme.

Name	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> One Shot® TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)	Life
	Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1</i>	Technologies
	<i>araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK</i>	
	<i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i>	Novagen
<i>E. coli</i> Rosetta™(DE3)pLysS	(DE3)	Novagen
	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i>	
<i>Sorangium cellulosum</i> (So ce10)	(DE3) pLysSRARE (Cam ^R)	HZI
		Braunschweig
<i>Sorangium cellulosum</i> (So ce307)		HZI
		Braunschweig

5.2.2 Desoxyribonukleinsäuren

5.2.2.1 Plasmide und Vektoren

Für die Enzyme JerF, JerO, JerP und JerL, sowie für die Thioesterasedomäne JerE7(TE) standen synthetisch hergestellte Gene (*jerF*, *jerO*, *jerP*, *jerL* und *jerE7(TE)*), kloniert in *pMK*- und *pMK-T*-Vektoren, zur Verfügung (Tabelle 18).

Tabelle 18: Verwendete Plasmide für die Genvervielfältigung.

Name	Plasmidgröße	Resistenzmarker	Referenz
<i>jerE7(TE)_pMK-T</i>	3418 bp	Kanamycin	Invitrogen
<i>jerF_pMK-T</i>	3007 bp	Kanamycin	Invitrogen
<i>jerL_pMK</i>	3387 bp	Kanamycin	Invitrogen
<i>jerO_pMK</i>	3447 bp	Kanamycin	Invitrogen

<i>jerP_pMK-T</i>	3379 bp	Kanamycin	Invitrogen
<i>pJET1.2/blunt</i>	2974 bp	Ampicillin	Life Technologies

Für die Genexpression (d.h. für die Herstellung von Fusionsproteinen) standen die Vektoren aus Tabelle 19 zur Verfügung.

Tabelle 19: Verwendete Plasmide für die Genexpression.

Name	Plasmidgröße	Resistenzmarker	Referenz
<i>pET20b(+)</i>	3716 bp	Ampicillin	Novagen
<i>pET28a(+)</i>	5369 bp	Kanamycin	Novagen
<i>pET32a(+)</i>	5900 bp	Ampicillin	Novagen
<i>pCOLDI</i>	4407 bp	Ampicillin	Takara Bio Company
<i>pGEX-4T-3</i>	4968 bp	Ampicillin	GE Healthcare
<i>pGEX-6P-1</i>	4984 bp	Ampicillin	GE Healthcare

5.2.2.2 Oligonukleotide

Tabelle 20: Verwendete Primer für Polymerasekettenreaktionen.

Primer- nummer	Primerbezeichnung	Basensequenz 5' → 3' (Anzahl d. Nukleobasen)
P1	Jer7_pET20_5'_XhoI	AGGCTCGAGCAGCTGCAGGGCATGTTCA (28)
P2	Jer7_pET20_5'_NdeI	TTGAGATCTCATATGAGCCTGCGTGATG (28)
P3	JerF_pET20_5'_XhoI	AGGCTCGAGTGCCGGACTTTCGGTGC (26)
P4	JerF_pET20_5'_NdeI	TTGAGATCTCATATGCGTACCAGTGATGC (29)
P5	JerO_pET20_5'_XhoI	GGACTCGAGATTCACACCCTGAATATGAC (29)
P6	JerO_pET20_5'_NdeI	ACGTATACTCATATGCATGTGGAAGAATG (29)
P7	JerP_pET20_5'_XhoI	GAACTCGAGCGGTGCTGCCAGCG (23)
P8	JerP_pET20_5'_NdeI	CCAGAGCTCCATATGGCAGAACTGG (25)
P9	JerL_pET20_5'_XhoI	AGGCTCGAGTGCGCTTGCATGACCAAC (27)
P10	JerL_pET20_5'_NdeI	TGCAGATCTCATATGTGTTATGGTCTGG (28)
P11	JerE7_EcoRI_Vor	ATATGAATTCATGAGCCTGCGTGATGTTT (29)
P12	JerE7_XhoI_Ruck	TATACTCGAGCAGCTGCAGGGCATGTTT (28)
P13	JerE7_XhoI_Ruck_STOP	TATACTCGAGTTACAGCTGCAGGGCATGTTT (31)
P14	JerF_EcoRI_Vor	ATATGAATTCATGCGTACCAGTGATGCAG (29)
P15	JerF_XhoI_Ruck	ATACTCGAGTGCCGGACTTTCGGTG (25)
P16	JerF_XhoI_Ruck_STOP	ATACTCGAGTTATGCCGGACTTTCGGTG (28)
P17	JerL_EcoRI_Vor	TATAGAATTCATGTGTTATGGTCTGGCAATG (31)
P18	JerL_XhoI_Ruck	ATTCTCGAGTGCGCTTGCATGACC (24)
P19	JerL_XhoI_Ruck_STOP	ATTCTCGAGTTATGCGCTTGCATGACC (27)
P20	JerO_EcoRI_Vor	TATAGAATTCATGCATGTGGAAGAATG (27)
P21	JerO_XhoI_Ruck	ACCCTCGAGATTCACACCCTGAATATGAC (29)
P22	JerO_XhoI_Ruck_STOP	ACCCTCGAGTTAATTCACACCCTGAATATGAC (32)
P23	JerP_EcoRI_Vor	ATATGAATTCATGGCAGAACTGGATCATTG (30)
P24	JerP_XhoI_Ruck	TATACTCGAGCGGTGCTGCCAGC (23)
P25	JerP_XhoI_Ruck_STOP	TATACTCGAGTTACGGTGCTGCCAGC (26)

5.2.3 Medien, Nährböden, Puffer und Lösungen für die Biochemie

Tabelle 21: Medien und Nährböden für die Kultivierung von *E. coli* und *Sorangium cellulosum*.

Name	Zusammensetzung
LB-Medium	10.0 g/L Trypton 5.0 g/L Hefeextrakt 5.0 g/L NaCl
2TY-Medium	16.0 g/L Trypton 10.0 g/L Hefeextrakt 5.0 g/L NaCl
LB-Agar	10.0 g/L Trypton 5.0 g/L Hefeextrakt 5.0 g/L NaCl 15.0 g/L Agar
2TY-Agar	16.0 g/L Trypton 10.0 g/L Hefeextrakt 5.0 g/L NaCl 16.0 g/L Agar
So ce10 /DSM 5368-Medium (RINGEL <i>et al.</i> , 1977)	5.0 g/L Kartoffel-Stärke 2.5 g/L Casiton 250 mg/L K ₂ HPO ₄ 250 mg/L MgSO ₄ pH 7.2
So ce307 /DSM 10497-Medium (GERTH <i>et al.</i> , 1995)	10.0 g/L Kartoffel-Stärke 1.0 g/L Glucose-Monohydrat 5.0 g/L Sojabohnenmehl 487,5 mg/L MgSO ₄ 1.0 g/L CaCl ₂ · 2 H ₂ O 5 mg/L Na-Fe-EDTA pH 7.4

Alle Medien, Puffer und Lösungen, die im Rahmen der Bakterienkultivierung eingesetzt wurden, wurden zuvor für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Tabelle 22: Verwendete Puffer und Lösungen.

Verwendungszweck/Name	Zusammensetzung
Isolierung von Plasmid-DNA (Miniprep)	
Lösung I	50 mM TRIS 10 mM EDTA 100 µg/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	
TE-Puffer	10 mM TRIS·HCl 1 mM EDTA pH 8.0
50x TAE-Puffer	2 M TRIS·AcOH 5 mM EDTA pH 8.0
6x DNA-Ladepuffer	0.25% (w/v) Bromphenolblau 0.21% (w/v) Xylencyanol FF 30% (v/v) Glycerin
Herstellung chemisch kompetenter Zellen	
Kompetenzpuffer I	50 mM CaCl ₂ 10 mM KOAc pH 6.2
Kompetenzpuffer II	50 mM CaCl ₂ 10 mM KOAc 20% (v/v) Glycerin pH 6.2

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%, 2 mL)	1.4 mL H ₂ O _{dd} 0.33 mL Rotiphorese Gel 30 0.25 mL <i>Lower</i> TRIS-Puffer 0.02 mL 10% (w/v) SDS 0.02 mL 10% (w/v) APS 2 µL TEMED
Trenngel (10%, 10 mL)	4.0 mL H ₂ O _{dd} 3.3 mL Rotiphorese Gel 30 2.5 mL <i>Upper</i> TRIS-Puffer 0.1 mL 10% (w/v) SDS 0.1 mL 10% (w/v) APS 4 µL TEMED
Trenngel (12%, 10 mL)	3.3 mL H ₂ O _{dd} 4.0 mL Rotiphorese Gel 30 2.5 mL <i>Upper</i> TRIS-Puffer 0.1 mL 10% (w/v) SDS 0.1 mL 10% (w/v) APS 0.4 µL TEMED
Trenngel (15%, 10 mL)	2.3 mL H ₂ O _{dd} 5.0 mL Rotiphorese Gel 30 2.5 mL <i>Upper</i> TRIS-Puffer 0.1 mL 10% (w/v) SDS 0.1 mL 10% (w/v) APS 0.4 µL TEMED
SDS-PAGE-Ladepuffer	0.8 mL 1x Laemmli-Mix 0.1 mL 10% (w/v) SDS 0.1 mL 1 M DTT

10x Laemmli-Mix	150 mM TRIS pH 6.8 6% (w/v) SDS 30% (v/v) Glycerin 0.02% (w/v) Bromphenolblau
Färbelösung	25% (v/v) <i>i</i> PrOH 10% (v/v) AcOH 1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
Entfärbelösung	25% (v/v) <i>i</i> PrOH 10% (v/v) AcOH

Zellaufschluss/Affinitätschromatographie

Phosphat-Bindepuffer (pH 7.4)	20 mM NaH ₂ PO ₄ 500 mM NaCl 5 mM Imidazol
TRIS-Bindepuffer (pH 7.8)	40 mM TRIS·HCl 100 mM NaCl pH 7.8
TRIS-Bindepuffer (pH 8.8)	40 mM TRIS·HCl 100 mM NaCl pH 8.8
CAPS-Bindepuffer	40 mM CAPS 100 mM NaCl pH 10.0
TRIS-Elutionspuffer A	20 mM Imidazol 40 mM TRIS·HCl 100 mM NaCl pH 7.8
TRIS-Elutionspuffer B	1 M Imidazol 40 mM TRIS·HCl 100 mM NaCl pH 8.8

Western Blots

Blot-Puffer	40 mM TRIS 50 mM Glycin pH 9.1
TBS-Puffer	50 mM TRIS 150 mM NaCl pH 7.7
TBS-T-Puffer	50 mM TRIS 150 mM NaCl 0.05% (v/v) Tween® 20 pH 7.7
TBS-T-MP-Puffer	50 mM TRIS 150 mM NaCl 0.05% (v/v) Tween® 20 5% (w/v) Magermilchpulver pH 7.7
Ponceau S-Lösung	0.1% (w/v) Ponceau S 5% (v/v) AcOH

Immunofärbung

NBT-Stammlösung	0.5 g Nitroblautetrazoliumchlorid 10 mL 70% (v/v) DMF in H ₂ O _{dd}
BCIP-Stammlösung	0.5 g 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (<i>p</i> -Toluidin-Salz) 10 mL DMF
Alkalische Phosphatase-Puffer	100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 100 mM TRIS pH 9.5
Antikörper-Lösung I	0.1 mg/μL Anti-His-Antikörper ABIN343677 (polyklonal, Kaninchen) in 300 μL Puffer (40 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7.5), 100 μL Glycerin, 5.0 μL BSA

Antikörper-Lösung II	Anti-Kaninchen IgG (Alkalische Phosphatase-Konjugat) in 50 mM TRIS, pH 8.0, 1% (w/v) BSA, 1 mM MgCl ₂ , 50% (v/v), Glycerol, 15 mM NaN ₃
----------------------	--

Antibiotika-Stammlösung

Ampicillin	50 mg/mL Ampicillin-Natriumsalz in H ₂ O _{dd}
Carbencillin	50 mg/mL Carbencillin-Dinatriumsalz in H ₂ O _{dd}
Chloramphenicol	34 mg/mL Chloramphenicol in EtOH
Kanamycin	50 mg/mL Kanamycin-Monosulfat in H ₂ O _{dd}
Tetracyclin	5 mg/mL Tetracyclin-Hydrochlorid in H ₂ O _{dd}

5.2.4 Geräte

Tabelle 23: Übersicht der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Firma
Autoklaven	
VX-95	Systemec
VX-150	Systemec
Zentrifugen	
5417 R Mikrozentrifuge Rotortyp: F-45-30-11	Eppendorf
Sepatech Biofuge 28RS	Thermo Scientific
Heraeus Megafuge 16R Rotortyp: Highconic II	Thermo Scientific
Qik spin Mikrozentrifuge	Edwards Instruments
Heraeus Fresco 21 Centrifuge Rotortyp: 24 x 1.5/2.0 mL	Thermo Scientific
Sorvall LYNX 6000 Centrifuge Rotortyp: F14-14x50cy Rotortyp: F12-6x500LEX	Thermo Scientific

Schüttler

CH-4103	Infors-AG
Innova 4900 Multi-Tier Environmental Shaker	New Brunswick Scientific
Innova® 44 Incubator Shaker Series	New Brunswick Scientific
Excella E24 Incubator Shaker Series	New Brunswick Scientific

Inkubatoren

HEPATHERM Inkubator	Thermo Scientific
---------------------	-------------------

pH-Meter

Checker	Hanna
pHenomenal™ pH 1000L	VWR

Gel- und Blotkammern

Gelkammer Mini PROTEAN Tetra System	Bio-Rad
Gelkammer ComPhor Mini	Biozym Scientific GmbH
PerfectBlue Gelsystem Mini S	peqlab
PerfectBlue Gelsystem Midi S	Peqlab
Semi-Dry Elektrobloetter Sedec™ S	Peqlab

Netzteile

Power Supply E833	Consort
Power Supply E835	Consort

UV-Tische

N-90M	Benda
Double Vision UV/VIS	Hoefer

Photometer

FoodALYT Photometer	FoodALYT
SPECTRA max 384 Plus	Molecular Devices
Elisa Reader Mithras LB 940	Berthold Technologies

Geräte für Zellaufschlüsse

French Press R 125	American Instrument Company
Ultraschallgerät Sonoplus Typ UW31000	Bandelin

Thermocycler

MJ Research Minicycler PTC-150	Bio-Rad
peqStar	Peqlab

T100™ Thermal Cycler

Bio-Rad

Geldokumentation

Gel Doc™ XR+

Bio-Rad

Reinstwassersystem

BARNSTEAM GENPUREPRO

Thermo Scientific

Proteinreinigung

ÄKTA™ pure

GE Healthcare Life Sciences

mit UV-Detektor U9-L

mit Leitfähigkeitsdetektor C9

HisTrap™ FF 5x5mL

Sonstige Geräte

Thermomixer Comfort

Eppendorf

Vortex-Genie 2

Scientific Industries

Nanodrop DS-11 + Spektrophotometer

DENOVI[®]

Clean Bench SAFE 2020

Thermo Scientific

SpeedvacConcentrator 5301

Eppendorf

5.2.5 Glasgeräte

Luft- oder feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen wurden in ausgeheizten Schlenkgefäßen unter Inertgasatmosphäre (Argon oder Stickstoff) durchgeführt.

5.2.6 Chemikalien

Sämtliche Chemikalien wurden bei den Firmen *ABCR, Acros, AppliChem, Alfa Aesar, Carl Roth, Duchefa Biochemie, Fermentas, Fluka, Fluorochem, New England Biolabs (NEB), Serva, Sigma-Aldrich, TCI* und *Thermo Fisher Scientific* 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/Benzophenon unter Rückfluss erhitzt und anschließend destilliert. Triethylamin und Diisopropylamin wurde vor Verwendung über KOH destilliert. (*E*)-Crotonaldehyd wurde über Na₂SO₄ unter

Rückfluss erhitzt und anschließend destilliert. TMSCI wurde vor Gebrauch über Chinolin unter Rückfluss erhitzt und anschließend destilliert. Lösungsmittel für die Säulenchromatographie wurden vor Gebrauch destilliert.

5.2.7 Chromatographische Verfahren

Für die Umkehrphasen-HPLC wurden entgaste Lösungsmittel (MeOH, MeCN) in HPLC-Qualität verwendet. Das verwendete Wasser wurde zuvor membranfiltriert und anschließend zweifach destilliert. Semi-präparative HPLC wurde an einer HPLC-Anlage der Firma *Merck Hitachi* (Pumpe L-7150, Interface D-7000, *Diode Array Detector* L-7450) durchgeführt. Folgende stationäre Phase wurde verwendet: (C18-SP) *Trentec* Reprosil-Pur 120 C18 AQ 5 μ m, 250 mm \cdot \varnothing 8 mm, entsprechender Vorsäulenkartusche, 40 mm \cdot \varnothing 8 mm; (CN-SP) *Trentec* Reprosil 100 CN 5 μ m, 250 mm \cdot \varnothing 8 mm, entsprechender Vorsäulenkartusche, 40 mm \cdot \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 (Firma *Micromass*, Typ ZMD ESI-Quad-Spektrometer) unter Verwendung der stationären Phase C18-P[B] durchgeführt. Die verwendeten Elutionsprogramme und Retentionszeiten (t_R) sind in den jeweiligen Versuchsvorschriften angegeben.

Zur Bestimmung der Enantiomerenüberschüsse wurde eine HPLC-Anlage der Firma *Beckman* (System Gold[®]) mit UV-Detektion ($\lambda = 254$ nm) verwendet. Als stationäre Phase wurde eine OD-H-Trennsäule der Firma *Chiracel* verwendet. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus *n*-Hexan und Isopropanol verwendet.

Die Normalphasen-Säulenchromatographie erfolgte mit Kieselgel (60 M) der Firma *Merck* (Korngröße 35-70 μ m) unter leichtem Überdruck. Die verwendeten Lösungsmittelgemische sind den jeweiligen Versuchsbeschreibungen zu entnehmen.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel beschichtete Aluminiumfolien ALUGRAM Xtra G/UV254 mit Fluoreszenz-Indikator der Firma *Macherey-Nagel* eingesetzt. Die Detektion erfolgte über UV-Absorption bei $\lambda = 254$ nm und/oder durch Entwicklung mit einem Heißluftfön nach Behandlung mit folgenden Tauchreagenzien: Anisaldehyd-, Kaliumpermanganat-, DNPH-, Vanillin- oder Cer-Molybdat-Lösung.

5.2.8 Kernresonanzspektroskopie

Die Messungen der Kernresonanzspektren wurden mit den Geräten DPX 200, DPX 400, AVANCE-400 und DRX-500 der Firma *Bruker* aufgenommen. Die ^{13}C -NMR-Spektren wurden ^1H -breitbandentkoppelt mit dem Gerät DPX 400 der Firma *Bruker* durchgeführt. Alle Messungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, in deuteriertem Chloroform aufgenommen. ^1H -Spektren und ^{13}C -Spektren wurden auf das Restprotonensignal des deuterierten Lösungsmittels (für CHCl_3 : 7.26 ppm und 77.16 ppm) kalibriert. Chemische Verschiebungen δ wurden in ppm und Kopplungskonstanten J in Hz angegeben. Die Zuordnung der Signale erfolgte anhand der Kopplungskonstanten, sowie COSY-, HSQC und HMBC-Spektren. Für die Beschreibung der Multiplizitäten der ^1H -Spektren wurden die Abkürzungen s (Singulett), br s (breites Singulett), d (Duplett), dd (doppeltes Dublett), ddd (doppeltes Dublett von Dubletts), ddt (doppeltes Dublett von Tripletts), t (Triplet), q (Quartett), dq (Dublett von Quartetts), quint (Quintett), sext (Sextett), sept (Septett) und m (Multipllett) verwendet.

5.2.9 Massenspektrometrie

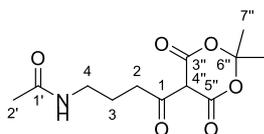
Die aufgeführten, hochaufgelösten Massenspektren wurden nach dem Elektrospray-Verfahren (ESI) an einem *Micromass* LCT mit Lock-Spray-Einheit der Firma *Waters* aufgenommen. Die Injizierung der in Methanol oder Acetonitril gelösten Proben erfolgte über einen Loop in einer HPLC-Anlage der Firma *Waters* (Alliance 2695). Alternativ wurde mit einem *Micromass* Q-TOF in Verbindung mit einer *Waters Aquity* UPLC-Anlage gemessen.

5.2.10 Polarimetrie

Die Drehwerte wurden an einem Polarimeter 341 der Firma *Perkin-Elmer* gemessen. Die Nullwertbestimmung und die Messungen wurden in CH_2Cl_2 durchgeführt. Die Drehwerte wurden bei Raumtemperatur bei einer Wellenlänge von $\lambda = 589.3$ nm (Natriumdampflampe) bestimmt. Die verwendete Quarzglaszelle hatte ein Volumen von 1 mL und eine Länge von 1 dm. Die Konzentrationen c sind in $\text{g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ und die Drehwerte α in $^\circ \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{dm}^{-1}$ angegeben.

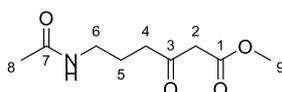
5.3 Synthesevorschriften

N-(4-(2,2-Dimethyl-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-yl)-4-oxobutyl)acetamid (**142**)



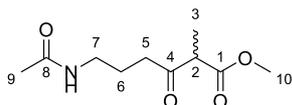
N-Acetyl-4-aminobuttersäure (2.93 g, 20.20 mmol, 1.00 Äq.), 4-(Dimethylamino)-pyridin (2.83 g, 23.20 mmol, 1.20 Äq.) und 2,2-Dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (2.91 g, 20.20 mmol, 1.00 Äq.) wurden in 168 mL (0.12 M) trockenen CH₂Cl₂ unter N₂-Atmosphäre gelöst. Die Reaktion wurde über Nacht bei RT gerührt und der gebildete Harnstoff durch Filtration entfernt. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeeengt, in 300 mL EtOAc aufgenommen und viermal mit 80 mL 5% wässriger KHSO₄-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit 100 mL gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen und anschließend über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 5.27 g Rohprodukt **142** erhalten, welches ohne weitere Reinigung für die Darstellung von **143** eingesetzt wurde.

Methyl-6-acetamido-3-oxohexanoat (**143**)



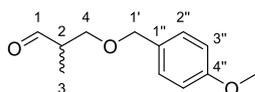
Die Verbindung **142** (5.27 g, 19.40 mmol) wurde in 176 mL (0.11 M) MeOH für 18 h unter Rückfluss erhitzt. Nach Entfernung des Lösungsmittels bei vermindertem Druck wurden 1.28 g Rohprodukt als gelbes Öl erhalten. Säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (CH₂Cl₂:EtOAc = 1:4 mit 5% MeOH) ergab das Produkt **143** als gelben Feststoff (1.14 g, 5.70 mmol, 28% über 2 Stufen).

R_f (EtOAc:DCM = 4:1, 5% MeOH): 0.20; ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ_H = 5.85 (br s, 1 H, NH), 3.77 (s, 3 H, 9-CH₃), 3.51 (s, 2 H, 2-CH₂), 3.30 (q, 2 H, ³J = 6.3 Hz, 6-CH₂), 2.66 (t, 2 H, ³J = 6.8 Hz, 4-CH₂), 2.01 (s, 3 H, 8-CH₃), 1.86 (dt, 2 H, ³J = 6.8 Hz, 5-CH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ_C = 202.7 (3-C), 170.5 (7-C), 167.8 (1-C), 52.5 (9-CH₃), 49.1 (2-CH₂), 40.4 (4-CH₂), 38.9 (6-CH₂), 23.4 (5-CH₂), 23.3 (8-CH₃). HRMS (ESI): *m/z*: berechnet für C₉H₁₆NO₄ [M+H]⁺ 202.1079, gefunden 202.1079 [M+H]⁺.

(R/S)-Methyl-6-acetamido-2-methyl-3-oxohexanoat (144)

Der Methylester **143** (50 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äq.) wurde unter N₂-Atmosphäre in 3.3 mL (0.07 M) THF gelöst, auf 0 °C gekühlt und anschließend mit K₂CO₃ (89 mg, 0.65 mmol, 2.6 Äq.) versetzt. Danach wurde Methyljodid (15 µL, 0.25 mmol, 2.0 Äq.) langsam hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und im Anschluss durch Zugabe von 0.1 mL H₂O beendet. THF wurde bei vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 5 mL EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wurde zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (CH₂Cl₂:EtOAc = 1:4 mit 5% MeOH) ergab das literaturbekannte^[158] Produkt **144** als gelbes Öl (27 mg, 0.13 mmol, 50%).

R_f (EtOAc:DCM = 4:1, 5% MeOH): 0.25; ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ_H = 5.84 (br s, 1 H, NH), 3.77 (s, 3 H, 10-CH₃), 3.59 (q, 1 H, ³J = 8.0 Hz, 2-CH), 3.34–3.24 (m, 2 H, 7-CH₂), 2.81–2.51 (m, 2 H, 5-CH₂), 2.01 (s, 3 H, 9-CH₃), 1.86 (quint, ³J = 6.8 Hz, 2 H, 6-CH₂), 1.38 (d, ³J = 7.2 Hz, 3 H, 3-CH₃).

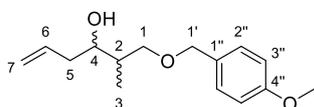
(R/S)-3-(Benzyloxy)-2-methylpropanal (145)

Unter Ar-Atmosphäre wurde Oxalylchlorid (0.82 mL, 9.52 mmol, 2.00 Äq.) in 16.7 mL trockenem CH₂Cl₂ gelöst und auf -78 °C gekühlt. Anschließend wurde DMSO (1.0 mL, 14.27 mmol, 3.00 Äq.) hinzugegeben. Nach 15 min bei -78 °C wurde 3-(Benzyloxy)-2-methylpropan-1-ol (1.0 g, 4.76 mmol, 1.00 Äq.), gelöst in 5.8 mL CH₂Cl₂, zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Nach 15 min wurde die Reaktion von -78 °C auf -45 °C erwärmt und für 1 h gerührt. Triethylamin (3.3 mL, 23.80 mmol, 5.00 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben und der Reaktionsansatz auf 0 °C erwärmt. Nach 15 min rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von 26 mL Et₂O/gesättigter NH₄Cl-Lösung (1:1) beendet. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 10 mL Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit 10 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung und

10 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 1.0 g Rohprodukt von **145** als gelbes Öl erhalten und unverzüglich und ohne weitere Reinigung für die Bildung von **146** eingesetzt.

R_f (EtOAc:PE = 1:2): 0.6; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 9.73$ (d, 1 H, $^3J = 0.8$, 1-CH), 7.28-7.25 (m, 2 H, 2''-CH), 6.91-6.89 (m, 2 H, 3''-CH), 4.48 (s, 2 H, 1'-CH₂), 3.83 (s, 3 H, OCH₃), 3.69-3.61 (m, 2 H, 4-CH₂), 2.69-2.64 (m, 1 H, 2-CH), 1.14 (s, 3 H, 3-CH₃).

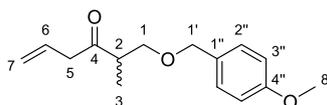
1-(Benzyloxy)-2-methylhex-5-en-3-ol (**146**)



Der Aldehyd **145** (1.0 g, 5.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 6 mL 1:5 THF/ NH_4Cl (v/v) gelöst und mit Zink-Staub (0.41 g, 6.25 mmol, 1.25 Äq.) versetzt. Im Anschluss wurde Allylbromid (0.54 mL, 6.25 mmol, 1.25 Äq.) hinzugegeben. Nach 5 min rühren bei RT hatte sich das Zink größtenteils gelöst. Nach 2 h wurde die wässrige Phase abgetrennt, dreimal mit 10 mL Et_2O extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Es wurden 1.24 g Rohprodukt von **146** als gelbe Flüssigkeit erhalten und ohne weitere Reinigung für die Oxidation zu **147** eingesetzt.

R_f (EtOAc:PE = 1:3): 0.5; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 7.31$ -7.27 (m, 2 H, 2''-CH), 6.94-6.89 (m, 2 H, 3''-CH), 6.05-5.78 (m, 1 H, 6-CH), 5.12-5.10 (m, 2 H, 7-CH₂), 4.48 (s, 2 H, 1'-CH₂), 3.85 (s, 3 H, OCH₃), 3.67-3.45 (m, 3 H, 1-CH₂, 4-CH), 2.29-2.22 (m, 2 H, 5-CH₂), 1.96-1.85 (m, 1 H, 2-CH), 1.01-0.93 (m, 3 H, 3-CH₃).

(R/S)-1-(Benzyloxy)-2-methylhex-5-en-3-on (**147**)

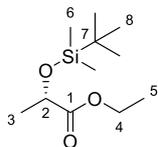


Unter Ar-Atmosphäre wurde der Alkohol **146** (52 mg, 0.21 mmol, 1.00 Äq.) in 1.1 mL CH_2Cl_2 : Et_2O (1:1) gelöst. DESS-MARTIN-Periodinan (130 mg, 0.30 mmol, 1.50 Äq) wurde hinzugegeben und die Mischung für 60 min bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch

Zugabe von 1 mL 1.5 M Na₂S₂O₃-Lösung in 1 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung beendet. Die wässrige Phase wurde fünfmal mit 5 mL Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das literaturbekannte^[159] Produkt **147** wurde als farbloses Öl erhalten (40 mg, 0.16 mmol, 77%).

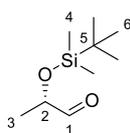
R_f (EtOAc:PE = 1:4): 0.7; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H = 7.25-7.23 (m, 2 H, 2''-CH), 6.91-6.88 (m, 2 H, 3''-CH), 6.01-5.90 (m, 1 H, 6-CH), 5.21-5.11 (m, 2 H, 7-CH₂), 4.47-4.40 (m, 2 H, 1'-CH₂), 3.83 (s, 3 H, OCH₃), 3.61 (dd, 1 H, ³J = 7.7 Hz, ³J = 9.2 Hz, 1-CH₂), 3.47 (dd, 1H, ³J = 5.5 Hz, ³J = 9.1 Hz, 1-CH₂), 3.29 (d, 2 H, ³J = 7.0 Hz, 5-CH₂), 2.95 (m, 1 H, 2-CH), 1.09 (d, 3 H, ³J = 7.0 Hz, 3-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ_C = 211.1 (4-C), 159.3 (4''-C), 130.8 (6-CH), 130.3 (1''-C), 129.3 (2''-CH), 118.7 (7-CH₂), 113.9 (3''-CH), 73.1 (1-CH₂), 72.1 (1'-CH₂), 55.4 (8-CH₃), 47.1 (5-CH₂), 46.2 (2-CH), 13.6 (3-CH₃).

(S)-Ethyl-2-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)propanoat (**148**)



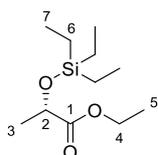
Imidazol (0.89 g, 12.75 mmol, 1.50 Äq.) und 4-(Dimethylamino)-pyridin (30 mg, 0.26 mmol, 0.03 Äq.) wurden unter Ar-Atmosphäre vorgelegt und in 10 mL CH₂Cl₂ gelöst. Bei 0 °C wurde (S)-Ethyllactat (1.00 g, 8.50 mmol, 1.00 Äq.) tropfenweise hinzugegeben. TBSCl (1.41 g, 9.35 mmol, 1.10 Äq.), gelöst in 2 mL CH₂Cl₂ wurden zur Reaktionslösung gegeben, wobei ein farbloser Niederschlag gebildet wurde. Nach 2 h Rühren bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 mL H₂O beendet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 2 mL Et₂O extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 2.0 g des Rohprodukts^[160] **148** als farblose Flüssigkeit erhalten.

R_f (EtOAc:PE = 1:4): 0.9; ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ_H = 4.35 (q, 1 H, ³J = 6.7 Hz, 2-CH), 4.23 (dq, 2 H, ³J = 7.1 Hz, ³J = 2.3 Hz, 4-CH₂), 1.44 (d, 3 H, ³J = 6.7 Hz, 3-CH₃), 1.32 (t, 3 H, ³J = 7.1 Hz, 5-CH₃), 0.95 (s, 9 H, 8-CH₃), 0.13 (s, 6 H, ³J = 5.9 Hz, 6-CH₃).

(S)-2-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)propanal (149)

Der Ethylester **148** (1.00 g, 4.30 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 8.6 mL trockenem CH₂Cl₂ gelöst und auf -78 °C gekühlt. Di-*isobutyl*aluminiumhydrid (4.5 mL, 1 M in Hexan, 4.50 mmol, 1.05 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben und für 35 min bei -78 °C gerührt. Nach Erwärmen auf RT wurde eine Mischung aus 4.4 mL Na,K-Tartratlösung in 16.4 mL Eiswasser zur Reaktion gegeben. Weitere 9 mL CH₂Cl₂ wurden hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 2 h bei 0 °C gerührt. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der literaturbekannte^[160] Aldehyd **149** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (1:4 EtOAc:PE) als farblose Flüssigkeit (478 mg, 2.5 mmol, 59%) erhalten.

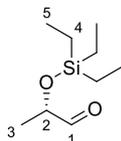
R_f (EtOAc:PE = 1:4): 0.9; ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ_H = 9.66 (d, 1 H, ³J = 1.3 Hz, 1-CH), 4.14 (dq, 1 H, ³J = 6.9 Hz, ³J = 1.3 Hz, 2-CH), 1.32 (d, 3 H, ³J = 6.8 Hz, 3-CH₃), 0.96 (s, 9 H, 6-CH₃), 0.14 (d, 6 H, 2.5 Hz, 4-CH₃).

(S)-Ethyl-2-((Triethylsilyl)oxy)propanoat (150)

(S)-Ethyllactat (1.00 g, 8.50 mmol, 1.00 Äq.) wurden unter Ar-Atmosphäre in 17 mL trockenem CH₂Cl₂ gelöst. Triethylamin (1.53 mL, 11.05 mmol, 1.30 Äq.) wurde bei Raumtemperatur dazugegeben und die Mischung für 30 min gerührt. Anschließend wurde auf -78 °C gekühlt und TESOTf (2.11 mL, 9.35 mmol, 1.10 Äq.) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde auf RT erwärmt und mit 2 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde mit 2 mL CH₂Cl₂ extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (1:15 EtOAc:PE) lieferte die literaturbekannte^[161] Verbindung **150** als schwachgelbes Öl (1.9 g, 8.5 mmol, 100%).

R_f (EtOAc:PE = 1:10): 0.7; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 4.35$ (q, 1 H, $^3J = 6.7$ Hz, 2-CH), 4.24 (dq, 2 H, $^3J = 7.1$ Hz, $^3J = 1.0$ Hz, 4- CH_2), 1.44 (d, 3 H, $^3J = 6.7$ Hz, 3- CH_3), 1.36 (t, 3 H, $^3J = 7.1$ Hz, 5- CH_3), 1.00 (t, 9 H, 7- CH_3), 0.69 (m, 6 H, 6- CH_2).

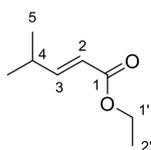
(S)-2-((Triethylsilyl)oxy)propanal (**151**)



Der Ethylester **150** (2.21 g, 9.51 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 19 mL trockenem CH_2Cl_2 gelöst und auf -78 °C gekühlt. Di-*isobutyl*aluminiumhydrid (4.5 mL, 1 M in Hexan, 4.50 mmol, 1.05 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben und für 5 min bei -78 °C gerührt. Nach Erwärmen auf RT wurde für 2 h gerührt und anschließend 10 mL gesättigte Na,K-Tartratlösung zur Reaktion gegeben. Weitere 9 mL CH_2Cl_2 wurden hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 2 h bei 0 °C gerührt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 10 mL CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der literaturbekannte^[161] Aldehyd **151** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (1:10 EtOAc:PE) als farblose Flüssigkeit (119 mg, 0.63 mmol, 7%) erhalten.

R_f (EtOAc:PE = 1:10): 0.4; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 9.66$ (d, 1 H, $^3J = 1.4$ Hz, 1-CH), 4.11 (dq, 1 H, $^3J = 6.9$ Hz, $^3J = 1.4$ Hz, 2-CH), 1.33 (d, 3 H, $^3J = 6.8$ Hz, 3- CH_3), 0.97 (t, 9 H, 5- CH_3), 0.69 (m, 6 H, 4- CH_2).

Ethyl-(E)-4-methylpent-2-enoat (**153**)

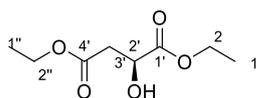


Ethyl-2-(Diethoxyphosphoryl)acetat (5 g, 22.30 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 7 mL trockenem THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Natriumhydrid (80%, 0.80 g, 26.76 mmol, 1.20 Äq.) wurde hinzugegeben und das Gemisch für 1 h bei 0 °C gerührt. Isobutyraldehyd (2 mL, 22.30 mmol, 1.00 Äq.) wurde zugegeben und das Gemisch bei RT über Nacht gerührt. Die Reaktion wurde durch vorsichtige Zugabe von 10

mL H₂O beendet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 10 mL Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 10 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Vakuumdestillation lieferte das Produkt **153** als farblose Flüssigkeit (1.41 g, 9.92 mmol, 44%).

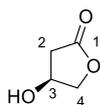
Sdp.: 65 °C (2.9 mbar); **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ_H = 6.94 (dd, 1 H, ³J = 15.8 Hz, ³J = 6.7 Hz, 3-CH), 5.76 (dd, 1 H, ³J = 15.7 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 2-CH), 4.18 (q, 2 H, ³J = 7.1 Hz, 1'-CH₂), 2.45 (ddsept, 1 H, ³J = 6.8 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 4-CH), 1.28 (t, 3 H, ³J = 7.2 Hz, 2'-CH₃), 1.06 (d, 6 H, ³J = 6.8 Hz, 5-CH₃); **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ_C = 14.27 (2'-CH₃), 21.23 (5-CH₃), 30.92 (4-CH), 60.15 (1'-CH₂), 118.63 (2-CH), 155.44 (3-CH), 167.09 (1-C).

Diethyl-(S)-2-Hydroxysuccinat (**68**)



(S)-2-Hydroxybernsteinsäure (**67**) (15.0 g, 108.5 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 110 mL absolutierten EtOH bei RT gelöst. H₂SO₄ (98%, 360 µL, 90.0 mmol, 0.83 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben und die Lösung für 72 h unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel bei vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (EtOAc:PE = 1:5, 1:1) lieferte das gewünschte, literaturbekannte^[162] Produkt **68** als farbloses Öl (18.9 g, 99.3 mmol, 92%).

R_f (EtOAc:PE = 1:5): 0.2; **¹H-NMR** (400 MHz; CDCl₃): δ_H = 4.47 (dd, 1 H, ³J = 4.6 Hz, ³J = 6.0 Hz, 2'-CH), 4.27 (dq, 2 H, ³J = 7.2 Hz, ³J = 2.4 Hz, 2-CH₂), 4.17 (q, 2 H, ³J = 7.2 Hz, 2''-CH₂), 3.23 (bs, 1 H, OH), 2.81 (dd, 2 H, ³J = 10.9 Hz, ³J = 4.5 Hz, 3'-CH₂), 1.28 (dt, 6 H, ³J = 7.2 Hz, 14.3 Hz, 1-CH₃, 1''-CH₃); **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ_C = 173.5 (1'-C), 170.6 (4'-C), 67.5 (2'-CH), 62.2 (2-CH₂), 61.1 (2''-CH₂), 38.9 (3'-CH₂), 14.3 (1-CH₃, 1''-CH₃).

(S)-4-Hydroxydihydrofuran-2(3H)-on (69)

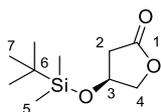
Vorschrift 1:

D-(+)-Maltose Monohydrat (19.96 g, 55.4 mmol, 1,00 Äq.) wurden in 0.16 M NaOH-Lösung gelöst und die Reaktion für 2 h bei 40 °C gerührt. Zu der gelben Lösung wurde Cumolhydroperoxid (80%, 13.6 mL, 73.2 mmol, 1.32 Äq.) gegeben und bei 70 °C für 15 h gerührt. Die Lösung wurde auf 0 °C gekühlt, mit konzentrierter H₂SO₄ auf pH 1 angesäuert und anschließend bei 50 °C (40 mbar) konzentriert. Zu dem entstandenen, zähflüssigen Öl wurden 100 g Eis hinzugeben, die Mischung mit NaHCO₃ neutralisiert und filtriert. Das Filtrat wurde viermal mit 100 mL EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 2.2 g Rohprodukt **69** als gelbes Öl erhalten und ohne weitere Reinigung für die OTBS-Schützung eingesetzt.

Vorschrift 2:

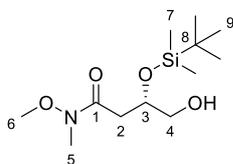
Succinat **68** (18.9 g, 99.3 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 200 mL trockenem THF gelöst. Boran-Dimethylsulfid-Komplex (94%, 10.3 mL, 102.25 mmol, 1.03 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde die Lösung für 40 min bei RT gerührt und anschließend auf 0 °C abgekühlt. Natriumborhydrid (98%, 191 mg, 4.96 mmol, 0.05 Äq.) wurde hinzugegeben und für 50 min bei RT gerührt. Nach Abkühlen auf 0 °C wurden 35 mL EtOH und danach *p*-Toluolsulfonsäure (Monohydrat, 1.4 g, 7.94 mmol, 0.08 Äq.) zugegeben. Das Gemisch wurde 40 min bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt (45 °C) und der Rückstand zweimal mit ca. 50 mL Toluol koevaporiert. Säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (EtOAc:PE = 18:1) lieferte das gewünschte, literaturbekannte^[130] Produkt **69** als schwach grünes Öl (6.3 g, 61.57 mmol, 62%).

R_f (EtOAc:PE 2:1): 0.2; **¹H-NMR** (200 MHz, CDCl₃): δ_H = 4.68 (bs, 1 H, 3-CH), 4.47 (dd, 1 H, ²J = 10.3 Hz, ³J = 4.4 Hz, 4-CH₂), 4.35 (ddd, 1 H, ²J = 10.3 Hz, ³J = 1.8 Hz, ⁴J = 0.8 Hz, 4-CH₂), 2.80 (dd, 1 H, ²J = 18.0 Hz, ³J = 6.0 Hz, 2-CH₂), 2.76 (bs, 1 H, OH), 2.57 (ddd, ²J = 18.0 Hz, ³J = 2.1 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 2-CH₂).

(S)-4-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)dihydrofuran-2(3H)-on (**70**)

Die Verbindung **69** (2.2 g, 21.50 mmol, 1.00 Äq.), Imidazol (3.11 g, 53.60 mmol, 2.5 Äq.) und TBSCl (3.88 g, 25.70 mmol, 1.20 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre bei 0 °C vorgelegt und in 4.77 mL trockenem DMF gelöst. Der Reaktionsansatz wurde für 27 h bei RT gerührt. Die organische Phase wurde nacheinander mit 5 mL H₂O und 5 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (EtOAc:PE = 1:6, 1:4) lieferte das gewünschte Produkt **70** als hellgelbe Kristalle (3.46 g, 16.0 mmol, 74%).

R_f (EtOAc:PE = 1:4): 0.5; $[\alpha]_D^{23} = -2.33$ ($c = 1.00$, CH₂Cl₂); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl₃): $\delta_H = 4.64 - 4.60$ (m, 1 H, 3-CH), 4.39 (dd, 1 H, $^3J = 9.7$ Hz, $^3J = 4.8$ Hz, 2-CH₂), 4.18 (dd, 1 H, $^3J = 9.8$ Hz, $^3J = 2.4$ Hz, 2-CH₂), 2.71 (dd, 1 H, $^3J = 17.5$ Hz, $^3J = 6.2$ Hz, 4-CH₂), 2.46 (dd, 1 H, $^3J = 17.6$ Hz, $^3J = 2.8$ Hz, 4-CH₂), 0.91 (s, 9 H, TBS), 0.11 (s, 6 H, TBS); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl₃): $\delta_C = 175.8$ (1-C), 76.2 (4-CH₂), 68.2 (3-CH), 38.3 (2-CH₂), 25.7 (7-CH₃), 18.1 (6-C), -4.7 (5-CH₃); **HRMS** (ESI): m/z : berechnet für C₁₀H₂₀NaO₃Si [M+Na]⁺ 239.1079, gefunden 239.1079 [M+Na]⁺.

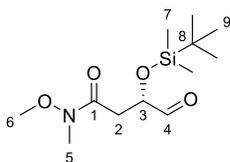
(S)-3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-4-hydroxy-*N*-methoxy-*N*-methylbutanamid (**71**)

N,O-Dimethylhydroxylamin Hydrochlorid (4.68 g, 48.00 mmol, 3.00 Äq.) wurden unter Ar-Atmosphäre in 71 mL trockenem CH₂Cl₂ suspendiert und auf 0 °C gekühlt. Zu der Suspension wurde AlMe₃ (24 mL, 2 M in Heptan, 48.0 mmol, 3.00 Äq.) über 3 h zugetropft. Die Verbindung **70** (3.46 g, 16.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 18 mL CH₂Cl₂ gelöst und über 1 h zu der Reaktionsmischung gegeben. Die resultierende Lösung wurde für 15 min bei RT gerührt und die Reaktion durch Zugabe von 1 M KHSO₄-Lösung beendet. Der gebildete Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat mit 50 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das

Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (EtOAc:PE = 1:2, 1:1) lieferte das Produkt **71** als farbloses Öl (3.24 g, 11.7 mmol, 73%). Von der Verbindung **71** konnte kein hochaufgelöstes Massenspektrum erhalten werden.

R_f (EtOAc:PE = 1:3): 0.1; $[\alpha]_D^{23} = -0.05$ ($c = 1.00$, CH_2Cl_2); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 4.33\text{-}4.28$ (m, 1 H, 3-CH), 3.71 (s, 3 H, OCH_3), 3.66-3.62 (m, 1 H, 4- CH_2), 3.59-3.54 (m, 1 H, 4- CH_2), 3.19 (s, 3 H, NCH_3), 2.78 (dd, 1 H, $^3J = 6.0$ Hz, $^3J = 15.3$ Hz, 2- CH_2), 2.63 (dd, 1 H, $^3J = 6.6$ Hz, $^3J = 15.3$ Hz, 2- CH_2), 2.29 (br s, 1 H, OH), 0.90 (s, 9 H, 9- CH_3), 0.11 (d, 6 H, $^3J = 11.0$ Hz, 7- CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{C}} = 172.2$ (1-C), 69.8 (3-CH), 66.7 (4- CH_2), 61.5 (6- CH_3), 36.6 (2- CH_2), 32.1 (5- CH_3), 25.9 (9- CH_3), 18.2 (8-C); **HRMS** (ESI): m/z : berechnet $\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{NaNO}_4\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 300.1606, gefunden 300.1607 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(S)-3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-N-methoxy-N-methyl-4-oxobutanamid (**72**)

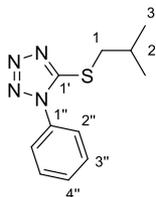


Unter Ar-Atmosphäre wurde Oxalylchlorid (1.89 mL, 21.62 mmol, 2.00 Äq.) in 36 mL trockenem CH_2Cl_2 gelöst und auf -78 °C gekühlt. Anschließend wurde DMSO (2.3 mL, 32.44 mmol, 3.0 Äq.) hinzugegeben. Nach 15 min bei -78 °C wurde Verbindung **71** (3.0 g, 10.81 mmol, 1.00 Äq.), gelöst in 18 mL CH_2Cl_2 , zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Nach 15 min wurde die Reaktion von -78 °C auf -45 °C erwärmt und für 1.5 h gerührt. Triethylamin (7.5 mL, 54.05 mmol, 5.0 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben und der Reaktionsansatz auf 0 °C erwärmt. Nach 60 min rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von 6 mL gesättigter NH_4Cl -Lösung beendet. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 30 mL CH_2Cl_2 extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 2.9 g des Rohprodukts **72** als gelbes Öl erhalten und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

R_f (EtOAc:PE = 1:3): 0.2; $[\alpha]_D^{23} = -2.29$ ($c = 1.00$, CH_2Cl_2); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 9.77$ (s, 1 H, 4-CH), 4.53 (t, 1 H, $^3J = 5.8$ Hz, 3-CH), 3.72 (s, 3 H, OCH_3), 3.22 (s, 3 H, NCH_3), 2.86 (d, 2 H, $^3J = 5.6$ Hz, 2- CH_2), 0.93 (s, 9 H, 9- CH_3), 0.13 (d, 6 H, $^3J = 19$ Hz, 7- CH_3);

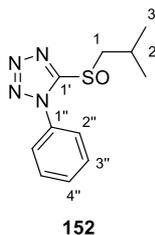
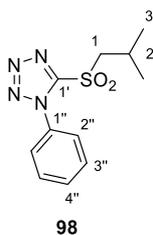
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{C}} = 203.3$ (4-C), 74.5 (3-CH), 61.5 (6- CH_3), 36.1 (5- CH_3), 32.3 (2- CH_2), 25.8 (9- CH_3), 18.3 (8-C), -4.9 (7- CH_3), -4.6 (7- CH_3); **HRMS** (ESI): m/z : berechnet $\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{NO}_4\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 276.1631, gefunden 276.1625 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5-(*iso*-Butylthio)-1-phenyl-1*H*-tetrazole (**97**)



NaH (0.67 g, 28.06 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 28.9 mL DMF gelöst und auf 0 °C gekühlt. 1-Phenyl-1*H*-tetrazol-5-thiol (5.00 g, 28.06 mmol, 1 Äq.), gelöst in 22,5 mL DMF gelöst, wurde tropfenweise dazugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 10 min bei RT gerührt und anschließend mit *iso*-Butylbromid (3.05 mL, 28.06 mmol, 1.00 Äq.), gelöst in 17,0 mL DMF, tropfenweise versetzt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 56 mL H_2O beendet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 50 mL Et_2O extrahiert und die vereinigten organischen Phasen nacheinander mit zweimal 30 mL gesättigter NaHCO_3 -Lösung und 30 mL gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 6.58 g des Rohprodukts **97** als gelber Feststoff erhalten.

R_f (EtOAc:PE = 1:9): 0.4; **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 7.63$ -7.56 (m, 5 H, 2''-CH, 3''-CH, 4''-CH), 3.34 (d, 2 H, $^3J = 6.8$ Hz, 1- CH_3), 2.12 (sept, 1 H, $^3J = 6.7$ Hz, 2-CH), 1.08 (d, 6 H, $^3J = 6.6$ Hz, 3- CH_3); **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{C}} = 154.9$ (1'-C), 133.9 (1''-C), 130.2 (4''-CH), 129.9 (3''-CH), 124.0 (2''-CH), 41.9 (1- CH_2), 28.5 (2-CH), 21.8 (3- CH_3); **HRMS** (ESI): m/z : berechnet $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 235.1017, gefunden 235.1021 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5-(*iso*-Butylsulfonyl)-1-phenyl-1*H*-tetrazol (**98**)

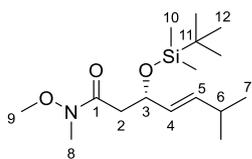
Tetrazol **97** (6.58 g, 28.06 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 93.5 mL CH₂Cl₂ gelöst. Es wurden nacheinander NaHCO₃ (11.79 g, 140.30 mmol, 5.00 Äq.) und *m*CPBA (8.05 g, 35.92 mmol, 1.28 Äq.) hinzugegeben und der Reaktionsansatz über Nacht gerührt. Der farblose Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat nacheinander zweimal mit 30 mL 1.5 M Na₂S₂O₃-Lösung und zweimal mit 30 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Das literaturbekannte^[163] Produkt **98** wurde nach säulenchromatographischer Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (EtOAc:PE = 1:9) als gelbe Flüssigkeit (3.81 g, 14.31 mmol, 51%) erhalten. Das Nebenprodukt 5-(*iso*-Butylsulfinyl)-1-phenyl-1*H*-tetrazol (**152**) (2.0 g, 7.99 mmol, 28%) wurde als gelber Feststoff erhalten.

Sulfon **98**:

R_f (EtOAc:PE = 1:9): 0.1; **¹H-NMR** (200 MHz, CDCl₃): δ_H = 7.72-7.59 (m, 5 H, 2''-CH, 3''-CH, 4''-CH), 3.69 (d, 2 H, ³J = 6.5 Hz, 1-CH₂), 1.17 (d, 6 H, ³J = 6.7 Hz, 3-CH₃); **HRMS** (ESI): *m/z*: berechnet C₁₁H₁₅N₄O₂S [M+H]⁺ 267.0919, gefunden 267.0916 [M+H]⁺.

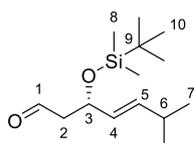
Sulfoxid **152**:

R_f (EtOAc:PE = 1:9): 0.05; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ_H = 7.73-7.70 (m, 2 H, 2''-CH), 7.65-7.61 (m, 3 H, 3''-CH, 4''-CH), 3.69 (dd, 1 H, ²J = 13.1 Hz, ³J = 5.4 Hz, 1-CH₃), 3.29 (dd, 1 H, ²J = 13.2 Hz, ³J = 8.9 Hz, 1-CH₃), 2.33-2.23 (m, 1 H, 2-CH), 1.14 (dd, 6 H, ³J = 5.0 Hz, ³J = 6.7 Hz, 3-CH₃); **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ_C = 156.5 (1'-C), 133.2 (1''-C), 131.4 (4''-CH), 130.1 (2''-CH), 125.1 (3''-CH), 61.7 (1-CH₂), 24.0 (2-CH), 22.7 (3-CH₃), 21.6 (3-CH₃).

(S,E)-3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-N-methoxy-N,6-dimethylhept-4-enamid (**73**)

Sulfon **98** (200 mg, 0.76 mmol, 1.00 Äq.) und 18-Krone-6 (396 mg, 1.50 mmol, 2.00 Äq.) wurden unter Ar-Atmosphäre zusammen mit Aldehyd **72** (229 mg, 0.84 mmol, 1.10 Äq.) in 7.5 mL trockenem Toluol gelöst und auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. KHMDS (1.8 mL, 0.5 M in Toluol, 0.90 mmol, 1.20 Äq.) wurde über 2 h hinzugegeben. Nach Erwärmen der Lösung auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mL gesättigter NH_4Cl -Lösung in 10 mL H_2O beendet. Die wässrige Phase wurde viermal mit 10 mL EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (EtOAc:PE = 1:8, 1:4) lieferte das Produkt **73** als farbloses Öl (110 mg, 0.40 mmol, 46%).

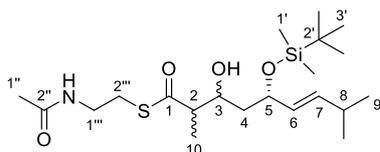
R_f (EtOAc:PE = 1:4): 0.6; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} = 5.63 (ddd, 1 H, $^3J = 15.4\text{ Hz}$, $^3J = 6.6\text{ Hz}$, $^4J = 0.6\text{ Hz}$, 4-CH), 5.43 (ddd, 1 H, $^3J = 15.5\text{ Hz}$, $^3J = 6.8\text{ Hz}$, $^4J = 1.2\text{ Hz}$, 5-CH), 4.66 (m, 1 H, 3-CH), 3.72 (s, 3 H, 9- CH_3), 3.19 (s, 3 H, 8- CH_3), 2.87-2.81 (m, 1 H, 2-CH), 2.42-2.37 (m, 1 H, 2-CH), 2.33-2.24 (m, 1 H, 6-CH), 0.99 (dd, 6 H, $^3J = 6.8\text{ Hz}$, $^4J = 2.9\text{ Hz}$, 7- CH_3), 0.88 (s, 9 H, 12- CH_3), 0.06 (d, 6 H, $^3J = 2.9\text{ Hz}$, 10- CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ_{C} = 172.1 (1-C), 138.2 (5-CH), 125.3 (4-CH), 71.1 (3-CH), 61.5 (9- CH_3), 30.7 (2- CH_2), 26.0 (12- CH_3), 22.4, 18.3, -4.1 (10- CH_3), -4.7 (10- CH_3); **HRMS** (ESI): m/z : berechnet $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{NaNO}_3\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 338.2127, gefunden 338.2127 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(S,E)-3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-6-methylhept-4-enal (**74**)

Das Weinreb-Amid **73** (95 mg, 0.30 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 3 mL trockenem THF auf $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Di-*isobutyl*aluminiumhydrid (360 μL , 1 M in Hexan, 0.36 mmol, 1.20 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben und für 1 h bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt. Nach Erwärmen auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden 3 Tropfen gesättigte Na,K-Tartratlösung zur Reaktion

gegeben. THF wurde unter verminderten Druck entfernt, der Rückstand in 5 mL CH₂Cl₂ aufgenommen und einmal mit H₂O gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Rohprodukt direkt für die Bildung von **76** eingesetzt.

S-(2-Acetamidoethyl)-(5*S,E*)-5-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-hydroxy-2,8-dimethylnon-6-enethioat (**76**)

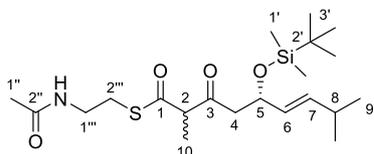


Titan(IV)chlorid (480 μ L, 1 M in CH₂Cl₂, 0.48 mmol, 2.40 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 220 μ L trockenem CH₂Cl₂ gelöst und auf -78 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurde frisch destilliertes Triethylamin (70 μ L, 0.50 mmol, 2.50 Äq.) tropfenweise zugegeben. Im Anschluss wurde Thioester **81** (52 mg, 0.30 mmol, 1.50 Äq.), gelöst in 400 μ L trockenem CH₂Cl₂, tropfenweise zugegeben. Die resultierende Lösung wurde 30 min bei -78 °C gerührt. Aldehyd **74** (51 mg, 0.20 mmol, 1.00 Äq.), gelöst in 700 μ L trockenem CH₂Cl₂, wurde zugegeben und die Lösung für 2 h bei -78 °C gerührt. Die rote Lösung wurde bei 0 °C mit 2 mL H₂O versetzt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Die wässrige Phase wurde mit 10 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (1:1 \rightarrow 2:1 EtOAc:PE) lieferte das gewünschte Produkt **76** als farbloses Öl (20 mg, 0.05 mmol, 23%).

R_f (EtOAc/PE 1:1): 0.3; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H = 5.86 (bs, 1 H, NH), 5.61-5.51 (m, 1 H, 7-CH), 5.44-5.29 (m, 1 H, 6-CH), 4.48-4.27 (m, 1 H, 5-CH), 4.20-4.05 (m, 1 H, 3-CH), 3.53-3.35 (m, 2 H, 1''-CH₂), 3.12-2.97 (m, 2 H, 2''-CH₂), 2.77-2.68 (m, 1 H, 2-CH), 2.33-2.23 (m, 1 H, 8-CH), 1.95 (s, 3 H, 1''-CH₃), 1.74-1.62 (m, 1 H, 4-CH_a), 1.54 (ddd, 1 H, ²J = 14.2 Hz, ³J = 6.0 Hz, ³J = 2.2 Hz, 4-CH_b), 1.23 (d, 3 H, ³J = 7.0 Hz, 10-CH₃), 0.98 (dd, 6 H, ³J = 6.7 Hz, ⁴J = 3.8 Hz, 9-CH₃), 0.88 (s, 9 H, 3'-CH₃), 0.06 (d, 6 H, ³J = 13.4 Hz, 1'-CH₃);
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ_C = 203.1 (1-C), 170.4 (2''-C), 138.8 (7-CH), 128.8 (6-CH), 72.3 (5-CH), 69.8 (3-CH), 54.4 (2-CH), 41.3 (4-CH₂), 39.8 (1''-CH₂), 30.8 (8-CH), 28.6 (2''-CH₂),

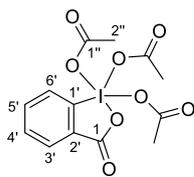
26.0 (3'-CH₃), 23.4 (1''-CH₃), 22.4 (9-CH₃), 12.5 (10-CH₃), -4.0 (1'-CH₃), -4.9 (1'-CH₃); **HRMS** (ESI): *m/z*: berechnet für C₂₁H₄₁O₄NSiNa [M+Na]⁺ 454.2423, gefunden 454.2425 [M+Na]⁺.

S-(2-Acetamidoethyl)-(5*S*,*E*)-5-((*tert*-butyldimethylsilyloxy)-2,8-dimethyl-3-oxonon-6-enethioat (**78**)

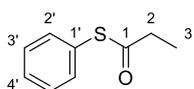


Alkohol **76** (20 mg, 0.05 mmol, 1.00 Äq.) wurde bei RT in 1.0 mL CH₂Cl₂ gelöst. NaHCO₃ (39 mg, 0.46 mmol, 10.00 Äq.) wurde zugegeben und die Mischung 10 min bei RT gerührt. DESS-MARTIN-Periodinan (**94**) (29 mg, 0.07 mmol, 1.5 Äq.) wurde zugegeben und die resultierende, farblose Suspension bei RT gerührt und der Umsatz per Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach 30 min wurden weitere 1.5 Äq. Periodinan **94** zugegeben. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 5 mL Et₂O aufgenommen und nacheinander zweimal mit 5 mL NaHCO₃, 5 mL Na₂S₂O₃ und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Das Produkt **78** wurde als farbloses Öl erhalten (20 mg, 0.05 mmol, >98%).

R_f(EtOAc/PE 1:1) 0.3; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ_H = 5.84 (bs, 1 H, NH), 5.61-5.54 (m, 1 H, 7-CH), 5.43-5.30 (m, 1 H, 6-CH), 4.60-4.42 (m, 1 H, 5-CH), 3.81 (dq, 1 H, ³J = 7.1 Hz, ⁴J = 2.1 Hz, 2-CH), 3.53-3.36 (m, 2 H, 1''''-CH₂), 3.14-2.97 (m, 2 H, 2''''-CH₂), 2.85-2.68 (m, 1 H, 4-CH_a), 2.60-2.46 (m, 1 H, 4-CH_b), 2.30-2.19 (m, 1 H, 8-CH), 1.97 (d, 3 H, ⁴J = 0.8 Hz, 1''-CH₃), 1.36 (d, 3 H, ³J = 7.1 Hz, ³J = 4.5 Hz, 10-CH₃), 1.00-0.95 (m, 6 H, 9-CH₃), 0.85 (s, 9 H, 3'-CH₃), 0.09-0.03 (m, 6 H, 1'-CH₃); **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ_C = 203.3 (1-C), 196.9 (3-C), 170.5 (2''-C), 138.9 (7-CH), 129.1 (6-CH), 72.3 (5-CH), 70.3 (2-CH), 54.4 (4-CH), 39.6 (1''''-CH₂), 30.5 (8-CH), 29.0 (2''''-CH₂), 26.0 (3'-CH₃), 22.3 (1''-CH₃), 18.2 (9-CH₃), 12.5 (10-CH₃), -4.0 (1'-CH₃), -4.7 (1'-CH₃).

1,1,1-Triacetoxy-1,1-dihydro-1,2-benziodoxol-3(1H)-on (94)

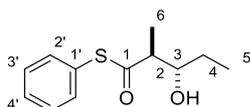
Oxone[®] (KHSO₅ · 0.5 KHSO₄ · 0.5 K₂SO₄, 47%, 102.7 g, 78.62 mmol, 1.30 Äq.) wurde in 135 mL H₂O bei RT gelöst. 2-Iodbenzoesäure (15 g, 60.48 mmol, 1.00 Äq.) wurden portionsweise zugegeben. Die resultierende, zähflüssige Mischung wurde 4 h bei 72 °C erhitzt. Die Mischung wurde anschließend für 3 h bei 0 °C gerührt. Der entstandene, farblose Niederschlag wurde mithilfe einer Glasfritte abfiltriert und nacheinander mit H₂O und Aceton gewaschen. Der farblose Feststoff (38.6 g) wurde unter Lichtausschluss im Hochvakuum getrocknet. Der getrocknete Feststoff wurde in 155 mL Acetanhydrid aufgenommen und bei RT mit *p*-Toluolsulfonsäure (Monohydrat, 150 mg, 871 mmol, 14.40 Äq.) versetzt. Das Gemisch wurde für 3 h bei 80 °C gerührt und anschließend auf 0 °C abgekühlt. Der erhaltene, farblose Niederschlag wurde mithilfe einer Glasfritte abfiltriert und mit Et₂O gewaschen. Anschließend wurde der Niederschlag mit reichlich CH₂Cl₂ gewaschen und das Filtrat unter verminderten Druck eingeeengt. Das literaturbekannte^[134] Produkt **94** wurde als farbloser Feststoff (8.2 g, 19.33 mmol, 32%) unter Lichtausschluss bei -20 °C gelagert.

S-Phenylpropanthioat (86)

Thiophenol (**85**) (5.1 mL, 51 mmol, 1.02 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 50 mL trockenem CH₂Cl₂ gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Zu der Lösung wurde trockenes Pyridin (4.1 mL, 50 mmol, 1.00 Äq.) schnell zugegeben. Anschließend wurde Propionylchlorid (4.3 mL, 50 mmol, 1.00 Äq.) über 5 min zugegeben. Die resultierende, farblose Suspension wurde für 5 min bei 0 °C und danach für 45 min bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 mL H₂O beendet. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 25 mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 mL H₂O gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Es wurden 8.30 g des literaturbekannten^[164] Produkts **86** als farblose Flüssigkeit erhalten.

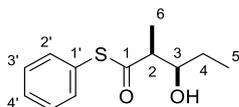
R_f (EtOAc:PE = 1:8): 0.6; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz; CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 7.41$ (s, 5 H, 2'-CH, 3'-CH, 4'-CH), 2.69 (q, 2 H, $^3J = 7.5$ Hz, 2-CH₂), 1.23 (t, 3 H, $^3J = 7.4$ Hz, 3-CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{C}} = 198.4$ (1-C), 134.7 (2'-CH), 129.4 (3'-CH), 129.3 (3'-CH), 128.0 (4'-CH), 37.3 (2-CH₂), 9.8 (3-CH₃).

(anti)-S-Phenyl-3-hydroxy-2-methylpentanthioat (anti-87)



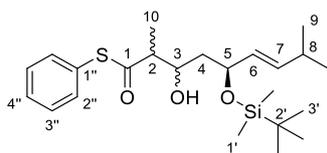
Dicyclohexylborchlorid (3.0 mL, 1 M in Hexan, 3.00 mmol, 1.50 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 10 mL trockenem Et₂O gelöst und auf -78 °C abgekühlt. Zu der Lösung wurde S-Phenylpropanthioat (**86**) (332 mg, 2.00 mmol, 1.00 Äq.), gelöst in 10 mL trockenem Et₂O, tropfenweise zugegeben. Anschließend wurde Diethylmethylamin (390 µL, 3.60 mmol, 1.80 Äq.) tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei 0 °C gerührt und danach auf -78 °C abgekühlt. Zu der farblosen Suspension wurde Propionaldehyd (146 µL, 2.00 mmol, 1.00 Äq.) zugegeben und für 2 h bei -78 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf 0 °C erwärmt und mit einer Lösung aus 4 mL MeOH/Natriumphosphatpuffer pH 7.0 (1:1) versetzt. Im Anschluss wurden 2 mL H₂O₂ (35% wt in H₂O) zugegeben. Die resultierende, klare Lösung wurde für 1 h bei RT gerührt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 10 mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit 20 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (EtOAc:PE = 1:8, 1:6) lieferte das gewünschte Produkt *anti*-**87** als farblose Kristalle (320 mg, 1.40 mmol, 71%, dr > 20:1).

R_f (EtOAc:PE = 1:8): 0.3; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 7.42$ (s, 5 H, 2'-CH, 3'-CH, 4'-CH), 3.67 (m, 1 H, 3-CH), 2.88 (dq, 1 H, $^3J = 7.1$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz, 2-CH), 2.28 (bs, 1 H, OH), 1.70-1.60 (m, 1 H, 4-CH), 1.56-1.45 (m, 1 H, 4-CH), 1.33 (d, 3 H, $^3J = 7.1$ Hz, 6-CH₃), 1.02 (t, 3 H, $^3J = 7.4$ Hz, 5-CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{C}} = 202.4$ (1-C), 134.6 (2'-CH), 129.7 (1'-C), 129.4 (3'-CH), 129.4 (3'-CH), 127.38 (4'-CH), 75.25 (3-CH), 53.10 (2-CH), 27.84 (4-CH₂), 15.33 (6-CH₃), 9.94 (5-CH₃); **HRMS** (ESI): m/z : berechnet für C₁₂H₁₆NaO₂S [M+Na]⁺ 247.0769, gefunden 247.0768 [M+Na]⁺.

(syn)-S-Phenyl-3-hydroxy-2-methylpentanthioat (syn-87)

Titan(IV)chlorid (1.4 mL, 1 M in CH₂Cl₂, 1.44 mmol, 2.40 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 730 µL trockenem CH₂Cl₂ gelöst und auf -78 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurde frisch destilliertes Triethylamin (240 µL, 1.68 mmol, 2.80 Äq.) tropfenweise zugegeben (Lösung I). In einem zweiten Schlenkkolben wurde Propionat **86** (100 mg, 0.60 mmol, 1.00 Äq.) in 1.2 mL trockenem CH₂Cl₂ gelöst und auf -78 °C abgekühlt (Lösung II). Die violette Lösung I wurde mithilfe einer Teflontransferkanüle in die Lösung II gegeben und die resultierende Lösung für 30 min bei -78 °C gerührt. Im Anschluss wurde Propionaldehyd (50 µL, 0.72 mmol, 1.20 Äq.) hinzugegeben und für 2 h bei -78 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 mL H₂O bei 0 °C beendet. Die wässrige Phase wurde fünfmal mit 5 mL Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden fünfmal mit 10 mL H₂O_{dd} gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt **86** wurde als Diastereomeregemisch (1 : 3 = *anti* : *syn*) erhalten. Die Synthese diente ausschließlich zur spektroskopischen Ermittlung der relativen Stereochemie von Verbindung **87**.

R_f (EtOAc/PE 1:8): 0.3; **¹H-NMR** (400 MHz; CDCl₃): δ_H = 7.42 (s, 5 H, 2'-CH, 3'-CH, 4'-CH), 3.92 (m, 1 H, 3-CH), 2.86 (dq, 1 H, ³J = 3.6 Hz, ³J = 7.1 Hz, 2-CH), 2.33 (d, 1 H, ³J = 3.7 Hz, OH), 1.70-1.43 (m, 2 H, 4-CH₂), 1.30 (d, 3 H, ³J = 7.1 Hz, 6-CH₃), 1.00 (t, 3 H, ³J = 7.5 Hz, 5-CH₃).

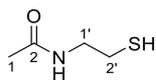
S-Phenyl-(5S,E)-5-((tert-butylidimethylsilyl)oxy)-3-hydroxy-2,8-dimethylnon-6-enthioat (152)

Weinrebamid **73** (476 mg, 1.5 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 15 mL trockenem CH₂Cl₂ gelöst und auf -78 °C gekühlt. Zu dieser Lösung wurde Diisobutylaluminiumhydrid (2.3 mL, 1 M in Hexan, 2.25 mmol, 1.50 Äq.) tropfenweise zugegeben und danach 1.5 h bei -78 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von

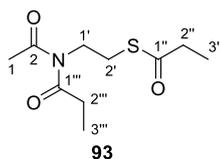
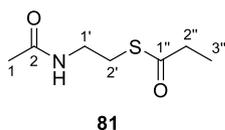
4 mL Na,K-Tartratlösung/Natriumphosphatpuffer pH 7.0 (1:1) bei 0 °C beendet. Das Gemisch wurde für 1 h bei RT gerührt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 5 mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander mit 10% AcOH-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt und der Aldehyd **74** in 5 mL Et₂O aufgenommen.

Dicyclohexylborchlorid (4.5 mL, 1 M in Hexan, 4.50 mmol, 3.00 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 15 mL trockenem Et₂O gelöst und auf -78 °C abgekühlt. Zu der Lösung wurde S-Phenylpropanthioat (**86**) (500 mg, 3.00 mmol, 2.00 Äq.), gelöst in 5 mL trockenem Et₂O, tropfenweise zugegeben. Anschließend wurde Diethylmethylamin (590 µL, 5.40 mmol, 3.60 Äq.) tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei 0 °C gerührt und danach auf -78 °C abgekühlt. Zu der farblosen Suspension wurde Aldehyd **74** in 5 mL Et₂O zugegeben und für 1 h bei -78 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde auf 0 °C erwärmt und mit einer Lösung aus 4 mL 1:1 MeOH/Na-Phosphatpuffer pH 7.0 (v/v) versetzt. Im Anschluss wurden 2 mL H₂O₂ (35% wt in H₂O) zugegeben. Die resultierende, klare Lösung wurde für 72 h bei RT gerührt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 20 mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit 20 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (1:10 EtOAc:PE) lieferte das gewünschte Produkt **152** als gelbes Öl (64 mg, 0.15 mmol, 10%).

R_f (EtOAc/PE 1:10): 0.6; **¹H-NMR** (400 MHz; CDCl₃): δ_H = 7.43-7.39 (m, 5 H, 2''-CH, 3''-CH, 4''-CH), 5.56 (dd, 1 H, ³J = 15.6 Hz, ³J = 5.8 Hz, 7-CH), 5.38 (ddd, 1 H, ³J = 15.6 Hz, ³J = 6.6 Hz, ³J = 1.2 Hz, 6-CH), 4.45 (q, 0.5 H, ³J = 5.0 Hz, 5-CH), 4.33 (q, 0.5 H, ³J = 7.0 Hz, 5-CH), 4.17-4.11 (m, 0.5 H, 3-CH), 4.06-4.01 (m, 0.5 H, 3-CH), 2.95-2.84 (m, 1 H, 2-CH), 2.27 (sept., 1 H, ³J = 6.8 Hz, 8-CH), 1.67 (t, 2 H, ³J = 4.8 Hz, 4-CH₂), 1.26 (t, 3 H, ³J = 7.2 Hz, 10-CH₃), 1.00-0.97 (m, 6 H, 9-CH₃), 0.90 (s, 9 H, 3'-CH₃), 0.09-0.05 (m, 6 H, 1'-CH₃); **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ_C = -4.6 (1'-CH₃), 14.3, 22.4, 26.0 (3'-CH₃), 30.8, 41.6, 53.8, 54.2, 70.6 (3-CH), 72.4 (5-CH), 74.9, 129.3, 134.6, 138.6, 138.9; **HRMS** (ESI): *m/z*: berechnet für C₂₃H₃₈O₃SSiNa [M+Na]⁺ 445.2209, gefunden 445.2207 [M+Na]⁺.

N-Acetylcysteamin (79)

Cysteamin-Hydrochlorid (**75**) (5.00 g, 42.69 mmol, 1.00 Äq.) und NaHCO₃ (10.76 g, 128.07 mmol, 3.00 Äq.) wurden in 200 mL H₂O bei RT gelöst. KOH (2.39 g, 42.69 mmol, 1.00 Äq.) wurde hinzugegeben. Im Anschluss wurde Acetanhydrid (4.08 mL, 42.69 mmol, 1.00 Äq.) tropfenweise hinzugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde die Lösung für 10 min bei RT gerührt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 150 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Das literaturbekannte^[165] Produkt **79** wurde als farblose Flüssigkeit (2.85 g, 23.91 mmol, 56%) bei -20 °C gelagert.

S-(2-Acetamidoethyl)propanethioat (81)

Thiol **79** (500 mg, 4.20 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 30 mL trockenem Et₂O gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Triethylamin (870 µL, 6.30 mmol, 1.50 Äq.) wurde tropfenweisen zugegeben. Im Anschluss wurde Propionylchlorid (550 µL, 6.30 mmol, 1.50 Äq.) tropfenweise zugegeben, wobei ein farbloser Niederschlag gebildet wurde. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT gerührt und die Reaktion durch Zugabe von 40 mL gesättigter NH₄Cl-Lösung beendet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 30 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (EtOAc:PE = 1:4) lieferte das gewünschte, literaturbekannte^[166] Produkt **81** als farbloses Öl (300 mg, 1.71 mmol, 41%) und das zweifach propionierte Nebenprodukt **93** als farbloses Öl (290 mg, 1.26 mmol, 30%).

Verbindung **81**:

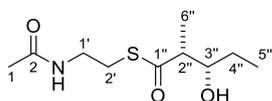
R_f (EtOAc:PE = 2:1): 0.2; ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ_H = 5.90 (bs, 1 H, NH), 3.42 (q, 2 H, ³J = 6.5 Hz, 1'-CH₂), 3.01 (t, 2 H, ³J = 6.6 Hz, 2'-CH₃), 2.59 (q, 2 H, ³J = 7.5 Hz, 2''-CH₂), 1.96 (s,

3 H, 1-CH₃), 1.18 (t, 3 H, ³J = 7.5 Hz, 3''-CH₃); **HRMS** (ESI): *m/z*: berechnet für C₇H₁₃O₂NSNa [M+Na]⁺ 198.0565, gefunden 198.0563 [M+Na]⁺.

Verbindung **93**:

R_f (EtOAc/PE 1:4): 0.5; **¹H-NMR** (200 MHz, CDCl₃): δ_H = 3.82-3.74 (m, 2 H, 1'-CH₂), 3.04-2.97 (m, 2 H, 2'-CH₂), 2.80 (q, 2 H, ³J = 7.2 Hz, 2'''-CH₂), 2.60 (q, 2 H, ³J = 7.5 Hz, 2''-CH₂), 2.47 (s, 3 H, 1-CH₃), 1.19 (t, 3 H, ³J = 7.5 Hz, 3''-CH₃), 1.17 (t, 3 H, ³J = 7.2 Hz, 3'''-CH₃); **HRMS** (ESI): *m/z*: berechnet für C₁₀H₁₇O₃NSNa [M+Na]⁺ 254.0827, gefunden 254.0823 [M+Na]⁺.

(*syn*)-S-(2-Acetamidoethyl)-3-hydroxy-2-methylpentanethioat (**83**)

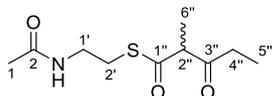


Titan(IV)chlorid (690 µL, 1 M in CH₂Cl₂, 0.69 mmol, 2.40 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 300 µL trockenem CH₂Cl₂ gelöst und auf -78 °C abgekühlt. Zu dieser Lösung wurde frisch destilliertes Triethylamin (111 µL, 0.80 mmol, 2.80 Äq.) tropfenweise zugegeben. Im Anschluss wurde Thioester **81** (50 mg, 0.29 mmol, 1.00 Äq.), gelöst in 600 µL trockenem CH₂Cl₂, tropfenweise zugegeben. Die resultierende Lösung wurde 30 min bei -78 °C gerührt. Propionaldehyd (30 µL, 0.35 mmol, 1.20 Äq.) wurde zugegeben und die Lösung für 2 h bei -78 °C gerührt. Die gelbe Reaktionsmischung wurde bei 0 °C mit 0.5 mL H₂O versetzt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Die wässrige Phase wurde mit 10 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (1:4 → 4:1 EtOAc:PE) lieferte das gewünschte Produkt **83** als farbloses Öl (29 mg, 0.12 mmol, 44%) mit geringem Distereomerenüberschuss (1 : 3 = *anti* : *syn*).

R_f (EtOAc/PE 1:1): 0.1; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ_H = 5.92 (br, 1 H, NH), 3.84-3.65 (m, 1 H, 3''-CH), 3.45-3.39 (m, 2 H, 1'-CH₂), 3.08-3.00 (m, 2 H, 2'-CH₂), 2.79-2.70 (m, 1 H, 2''-CH), 2.50-2.41 (m, 1 H, OH), 1.96 (s, 3 H, 1-CH₃), 1.63-1.37 (m, 2 H, 4''-CH₂), 1.21 (d, 3 H, ³J = 7.0 Hz, 6''-CH₃), 0.96 (t, 3 H, ³J = 7.4 Hz, 5''-CH₃); **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ_C = 9.85, 10.53 (5''-CH₃), 11.22 (6''-CH₃), 15.20, 23.32 (1-CH₃), 27.24 (4''-CH₂), 27.76, 28.70 (2'-CH₂),

39.51 (1'-CH₂), 53.10 (2''-CH), 53.92, 73.76 (3''-CH), 75.23, 170.60 (2-C), 204.32 (1''-C);
HRMS (ESI): *m/z*: berechnet für C₁₀H₁₉O₃NSNa [M+Na]⁺ 256.0983, gefunden 256.0981
[M+Na]⁺.

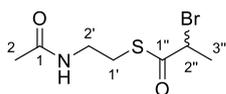
S-(2-Acetamidoethyl)-2-methyl-3-oxopentanethioat (84)



Alkohol **83** (10 mg, 0.04 mmol, 1.00 Äq.) wurde bei RT in 0.5 mL CDCl₃ gelöst. NaHCO₃ (36 mg, 0.43 mmol, 10.00 Äq.) wurde zugegeben und die Mischung 10 min bei RT gerührt. DESS-MARTIN Periodinan (**94**) (25 mg, 0.06 mmol, 1.39 Äq.) wurde zugegeben und die resultierende, farblose Suspension für 1 h bei RT gerührt. Die Suspension wurde über Watte filtriert und das Filtrat spektroskopisch analysiert.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H = 5.99 (bs, 1 H, NH), 3.79 (q, 1 H, ³J = 7.1 Hz, 2''-CH), 3.52-3.35 (m, 2 H, 1'-CH₂), 3.13-3.00 (m, 2 H, 2'-CH₂), 2.65-2.47 (m, 2 H, 4''-CH₂), 1.97 (s, 3 H, 1-CH₃), 1.38 (d, 3 H, ³J = 7.1 Hz, 6''-CH₃), 1.06 (t, 3 H, ³J = 7.2 Hz, 5''-CH₃); **LCMS** (EI): *m/z*: berechnet für C₁₀H₁₈O₃NS [M+H]⁺ 232.1, gefunden 232.1 [M+H]⁺.

S-(2-Acetamidoethyl)-2-bromopropanthioat (90)



Vorschrift 1:

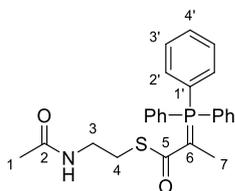
D/L-2-Brompropionylbromid (860 µL, 7.99 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in eine Lösung aus *N*-Acetylcysteamin (1.00 g, 8.39 mmol, 1.05 Äq.) in 8 mL trockenem CH₂Cl₂ tropfenweise zugegeben. Die Lösung wurde auf 0 °C abgekühlt. Frisch destilliertes Triethylamin (1.7 mL, 11.99 mmol, 1.50 Äq.) wurde tropfenweise zugegeben und die resultierende, farblose Suspension für 1 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mL 2 N HCl-Lösung beendet. Die organische Phase wurde nacheinander jeweils einmal mit 20 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung, H₂O und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **90** wurde als farbloses Öl (794 mg, 3.12 mmol, 37%) erhalten und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Vorschrift 2:

D/L-2-Brompropionsäure (**89**) (760 μL , 8.30 mmol, 1.1 Äq.), *N*-Acetylcysteamin (900 mg, 7.60 mmol, 1.0 Äq.) und 4-*N,N*-Dimethylaminopyridin (92 mg, 0.80 mmol, 0.1 Äq.) wurden in 20 mL trockenem CH_2Cl_2 gelöst. Bei 0 °C wurde EDC-Hydrochlorid (1.7 g, 8.30 mmol, 1.10 Äq.) portionsweise zugegeben. Die Lösung wurde für 1 h bei 0 °C und danach über Nacht bei RT gerührt. Die organische Phase wurde nacheinander jeweils einmal mit 20 mL gesättigter NaHCO_3 -Lösung, H_2O und gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Es wurden 1.64 g des Rohprodukts **90** als schwach gelbes Öl erhalten und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

R_f (EtOAc/PE 1:2): 0.3; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz; CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 5.80$ (bs, 1 H, NH), 4.53 (q, 1 H, $^3J = 6.9$ Hz, 2''-CH), 3.47 (q, 2 H, 2'-CH₂), 3.13-3.02 (m, 2 H, 1'-CH₂), 1.97 (s, 3 H, 2-CH₃), 1.84 (d, 3 H, 3''-CH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{C}} = 197.0$ (1''-C), 170.4 (1-C), 47.9 (2''-CH), 39.3 (2'-CH₂), 29.5 (1'-CH₂), 23.4 (2-CH₃), 22.1 (3''-CH₃); **HRMS** (ESI): m/z : berechnet für $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{BrNOS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 253.9850, gefunden 253.9852 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

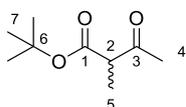
S-(2-Acetamidoethyl)-2-(triphenyl- λ^5 -phosphanyliden)propanthioat (**91**)



Bromid **90** (1.64 g, 6.45 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 32 mL trockenem Toluol gelöst. Triphenylphosphin (1.86 g, 7.10 mmol, 1.10 Äq.) wurde hinzugegeben und das Gemisch für 16 h bei 80 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf 4 °C wurde das Gemisch über einen Büchnertrichter filtriert. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck bis zu einem klebrigen Schaum eingengt, mit 35 mL H_2O versetzt und anschließend mit 1 M NaOH -Lösung auf pH 10 gebracht. Der erhaltene, farblose Niederschlag wurde abfiltriert, mit H_2O gewaschen und danach für 3 h im Hochvakuum getrocknet. Das Produkt **91** wurde nach Umkristallisation aus 10 mL Toluol als farblose Kristalle erhalten (437 mg, 1.00 mmol, 16%).

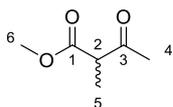
¹H-NMR (400 MHz; CDCl₃): δ_H = 7.60-7.46 (m, 15 H, 2'-CH, 3'-CH, 4'-CH), 3.35-3.31 (m, 2 H, 3-CH₂), 3.02-3.00 (m, 2 H, 4-CH₂), 1.68(d, 3 H, ³J = 15 Hz, 7-CH₃), 1.52 (s, 3 H, 1-CH₃); **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃): δ_C = 180.5 (d, ²J = 9.6 Hz, 5-C), 170.6 (2-C), 133.6 (d, ²J = 9.7 Hz, 2'-CH), 132.3 (d, ⁴J = 2.9 Hz, 4'-CH), 129.1 (d, ³J = 12.2, 3'-CH), 126.0 (d, ¹J = 90.3 Hz, 1'-C), 53.1 (d, ¹J = 107.1 Hz, 6-C), 43.4 (3-CH₂), 26.9 (4-CH₂), 23.2 (1-CH₃), 13.2 (d, ²J = 12.4 Hz, 7-CH₃); **HRMS** (ESI): *m/z*: berechnet für C₂₅H₂₇NO₂SP [M]⁺ 436.1500, gefunden 436.1501 [M]⁺.

(*R/S*)-*tert*-Butyl-2-methyl-3-oxobutanoat (**154**)



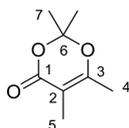
NaH (60%, 5.0 g, 120.0 mmol, 1.0 Äq.) wurde in THF bei 0 °C vorgelegt. *tert*-Butylacetoacetat (20.0 mL, 120.0 mmol, 1.0 Äq.) wurde tropfenweise bei 0 °C zugegeben. Der Reaktionslösung wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Methyljodid (15.0 mL, 240 mmol, 2.0 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben, wobei es zu starker Gasentwicklung kam und farbloses Natriumiodid ausfiel. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt und anschließend mit 50 mL H₂O gequenchet. Die Phasen wurden getrennt und die organische Phase nacheinander mit 50 mL H₂O, dreimal 50 mL gesättigter NaCl-Lösung und 50 mL gesättigter NH₄SO₄-Lösung gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden dreimal mit 50 mL Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 20.4 g des Rohprodukts **154**^[152] als gelbes Öl erhalten. Von der racemischen Verbindung **154** konnte kein hochaufgelöstes Massenspektrum erhalten werden.

R_f (EtOAc/PE 1:9): 0.6; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃): δ_H = 3.40 (q, 1 H, ³J = 7.2 Hz, 2-CH), 2.22 (s, 3 H, 4-CH₃), 1.46 (s, 9 H, 2'-CH₃), 1.29 (d, 3 H, ³J = 7.1 Hz, 5-CH₃). **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 204.2 (1-C), 169.9 (3-C), 81.9 (6-C), 54.8 (2-CH), 28.5 (4-CH₃), 28.0 (7-CH₃), 12.8 (5-CH₃).

(R/S)-Methyl 2-methyl-3-oxobutanoat (136)

Methylacetoacetat (**135**) (5.0 mL, 46.3 mmol, 1.0 Äq.) wurde in Methyljodid (2.9 mL, 46.3 mmol, 1.0 Äq.) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. K₂CO₃ (9.6 g, 69.5 mmol, 1.5 Äq.) wurde portionsweise zur Reaktionsmischung hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei 0 °C und anschließend über Nacht bei RT gerührt. Danach wurden 50 mL Et₂O hinzugegeben und die Reaktionsmischung für 1 h bei RT gerührt. Der Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat zweimal mit je 50 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden 4.4 g des Rohprodukts der literaturbekannten Verbindung^[167] **136** als farblose Flüssigkeit erhalten.

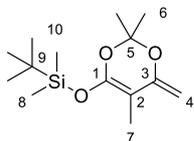
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H = 3.74 (s, 3 H, 6-CH₃), 3.52 (q, 1 H, ³J = 7.2 Hz, 2-CH), 2.24 (s, 3 H, 4-CH₃), 1.35 (d, 3 H, ³J = 7.2 Hz, 5-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 203.7 (3-C), 171.1 (1-C), 53.6 (2-CH), 52.6 (6-CH₃), 28.6 (4-CH₃), 12.9 (5-CH₃).

2,2,5,6-Tetramethyl-4H-1,3-dioxin-4-on (130)

3-Oxo-Ketoester **154** (10.3 g, 60.00 mmol, 1.00 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 22.7 mL Acetanhydrid und 120 mL wasserfreien Aceton gelöst und auf 0 °C abgekühlt. H₂SO₄ (98%, 1 mL) wurde tropfenweise zugegeben. Die gelbe Lösung wurde 72 h bei RT gerührt. Die braune Lösung wurde mit 30 mL H₂O versetzt und für 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 50 mL CH₂Cl₂ aufgenommen. Die wässrige Phase wurde viermal mit 20 mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit NaHCO₃ gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde bei vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (1:10 EtOAc:PE) lieferte das gewünschte Produkt **130** als schwach gelbe Flüssigkeit (4.6 g, 29.5 mmol, 49%). Es konnte Startmaterial **154** reisoliert werden (1.9 g, 11.0 mmol, 18%). Von der Verbindung **130** konnte kein hochaufgelöstes Massenspektrum erhalten werden.

R_f (EtOAc/PE 1:10) 0.3; $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ_{H} = 1.91 (d, 3 H, J = 0.7 Hz, 5- CH_3), 1.75 (d, 3 H, J = 0.8 Hz, 4- CH_3), 1.58 (s, 6 H, 7- CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 170.5 (1-C), 162.8 (3-C), 104.7 (6-C), 100.3 (2-C), 25.1 (7- CH_3), 17.5 (5- CH_3), 10.3 (4- CH_3).

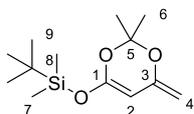
tert-Butyl((2,2-dimethyl-4-methylen-4*H*-1,3-dioxin-6-yl)oxy)dimethylsilan (**132**)



DIPA (2.0 mL, 15.6 mmol, 1.1 Äq.) wurde in THF (28 mL) bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gelöst. *n*-BuLi (9.8 mL, 15.6 mmol, 1.1 Äq., 1.6 M in Hexan) wurde tropfenweise hinzugegeben und 30 min bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ gerührt. Anschließend wurde bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ DMPU (2.1 mL, 17.1 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben und 30 min gerührt. Das in 5 mL THF gelöste Acetal **130** (2.2 g, 14.2 mmol, 1.0 Äq.) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung wurde gerührt bis eine klare Lösung entstand. Nach Zugabe von TBSCl (2.4 g, 15.6 mmol, 1.1 Äq.) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Es wurden 250 mL *n*-Pentan hinzugegeben und die dabei ausgefallenen Salze abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Eiswasser (3 x 50 mL) gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das Produkt **132** als klare, gelbe Flüssigkeit in 82% Ausbeute (3.14 g, 11.62 mmol) erhalten. Das Produkt ist bei Lagerung unter Argon bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ für einige Tage stabil. Von der Verbindung **132** konnte kein hochaufgelöstes Massenspektrum erhalten werden.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 4.11 (d, 1 H, 2J = 1.0 Hz, 4- CH_2), 3.92 (d, 1 H, 2J = 1.0 Hz, 4- CH_2), 1.67 (s, 3 H, 7- CH_3), 1.51 (s, 6 H, 6- CH_3), 0.95 (s, 9 H, 10- CH_3), 0.19 (s, 6 H, 8- CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 154.5 (3-C), 149.7 (1-C), 101.5 (5-C), 83.8 (4- CH_2), 81.7 (2-C), 25.7 (10- CH_3), 24.7 (6- CH_3), 18.1 (9-C), 9.5 (7- CH_3), -3.9 (8- CH_3).

tert-Butyl((2,2-dimethyl-4-methylene-4*H*-1,3-dioxin-6-yl)oxy)dimethylsilan (**131**)

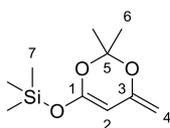


DIPA (3.3 mL, 23.8 mmol, 1.1 Äq.) wurde in THF (44 mL) bei $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gelöst. *n*-BuLi (9.5 mL, 23.8 mmol, 1.1 Äq., 2.5 M in Hexan) wurde tropfenweise hinzugegeben und 30 min bei

0 °C gerührt. Anschließend wurde bei -78 °C DMPU (3.1 mL, 26.0 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben und 30 min gerührt. Acetal **129** (2.8 mL, 21.7 mmol, 1.0 Äq.) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung wurde für 45 min bei -78 °C gerührt bis eine klare, braune Lösung entstand. Nach Zugabe von TBSCl (3.6 g, 23.8 mmol, 1.1 Äq.) in 5 ml THF wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und über 2 h gerührt. Es wurden 120 mL *n*-Pentan hinzugegeben und die dabei ausgefallenen Salze abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Eiswasser (3x 50 mL) gewaschen und über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck (40 °C, 30 mbar) entfernt und das Rohprodukt fraktioniert destilliert. Das Produkt **131** (Sdp. 75 °C, 5·10⁻² mbar) wurde als farblose Flüssigkeit in 12% Ausbeute (0.64 g, 2.5 mmol) erhalten. Das Produkt ist bei Lagerung unter Argon bei -20 °C für einige Tage stabil. Von der literaturbekanntem^[168] Verbindung **132** konnte kein hochaufgelöstes Massenspektrum erhalten werden.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 4.66 (s, 1 H, 2-CH), 4.06 (s, 1 H, 4-CH₂), 3.87 (s, 1 H, 4-CH₂), 1.54 (s, 6 H, 6-CH₃), 0.94 (s, 9 H, 9-CH₃), 0.21 (s, 6 H, 7-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 153.7 (1-C), 152.1 (3-C), 102.6 (5-C), 84.8 (4-CH₂), 76.8 (2-CH), 25.7 (9-CH₃), 24.7 (6-CH₃), 18.2 (8-CH₃), -4.1 (7-CH₃).

((2,2-dimethyl-4-methylen-4H-1,3-dioxin-6-yl)oxy)trimethylsilan (**108**)

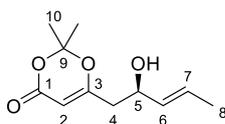


DIPA (6.6 mL, 47.7 mmol, 1.1 Äq.) wurde in THF (87 mL) bei -78 °C gelöst. *n*-BuLi (19.0 mL, 47.7 mmol, 1.1 Äq., 2.5 M in Hexan) wurde tropfenweise hinzugegeben und 30 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde bei -78 °C DMPU (6.2 mL, 52.0 mmol, 1.2 Äq.) zugegeben und 30 min gerührt. Acetal **129** (5.6 mL, 43.3 mmol, 1.0 Äq.) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei -78 °C gerührt bis eine klare, braune Lösung entstand. Nach Zugabe von TMSCl (6.0 mL, 47.7 mmol, 1.1 Äq.) wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und über 2 h gerührt. Es wurden 100 mL *n*-Pentan hinzugegeben und die dabei ausgefallenen Salze unter Argon abfiltriert. Der Rückstand wurde mit *n*-Pentan (2 x 10 mL) gewaschen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck (40 °C, 300 mbar) entfernt. Das Rohprodukt wurde fraktioniert

destilliert und es konnten 1.00 g (4.70 mmol, 11%) der literaturbekannten^[142] Verbindung **108** (55°C, 0.5 mbar) als farblose Flüssigkeit erhalten werden.

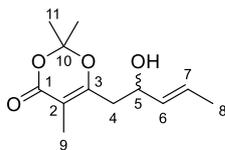
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 4.65 (s, 1 H, 2-CH), 4.07 (d, 1 H, ⁴J = 0.9 Hz, 4-CH₂), 3.88 (d, 1 H, ⁴J = 0.9 Hz, 4-CH₂), 1.55 (s, 6 H, 6-CH₃), 0.27 (s, 9 H, 7-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 168.8 (1-C), 161.4 (3-C), 106.5 (5-C), 94.0 (2-CH), 85.1 (4-CH₂), 24.6 (6-CH₃), 0.4 (7-CH₃).

(R),(E)-6-(2-hydroxypent-3-en-1-yl)-2,2-dimethyl-4H-1,3-dioxin-4-on (**110a**)



(S)-Tol-BINAP (17 mg, 0.03 mmol, 5.4 mol%) und Cu(II)-Triflat (10 mg, 0.03 mmol, 5.6 mol%) wurden in THF (2.0 mL) gelöst und für 15 min bei RT gerührt. Zu dieser Lösung wurde TBAT (25 mg, 0.05 mmol, 9.1 mol%), gelöst in THF (0.8 mL), hinzugegeben. Die intensiv gelbe Reaktionsmischung wurde auf -78 °C gekühlt. Acetal **108** (0.16 g, 0.75 mmol, 1.5 Äq.) wurde zur Reaktionsmischung hinzugegeben, gefolgt von (E)-Crotonaldehyd (40 µL, 0.50 mmol, 1.0 Äq.). Das Reaktionsgemisch wurde für 5 h bei -78 °C gerührt und anschließend mit TFA (0.2 mL) versetzt. Nachdem das Reaktionsgemisch für 1 h bei RT gerührt wurde, erfolgte die Zugabe von Et₂O (5 mL) und gesättigter, wässriger NaHCO₃-Lösung (3 mL). Die organische Phase wurde mit gesättigter, wässriger NaCl-Lösung gewaschen (3 x 10 mL) und über Na₂SO₄ getrocknet. Die Lösungsmittel wurden unter verminderten Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes an Kieselgel (EtOAc/Petrolether: 1/9 → 2/1) lieferte das gewünschte Produkt **110a** in 53% Ausbeute und mit 87% ee (60 mg, 0.26 mmol).

R_f = 0.3 (Petrolether/EtOAc 2:1); [α]_D²³ = +1.0 (c = 1.00, CH₂Cl₂), t_R = 16.2 min, 18.5 min (OD-H, n-Hexan : iPrOH = 95:5, 1.2 mL/min); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H: 5.82-5.68 (m, 1 H, 7-CH), 5.56-5.45 (m, 1 H, 6-CH), 5.31 (s, 1 H, 2-CH), 4.36 (q, 1 H, ³J = 6.8 Hz, 5-CH), 2.53-2.34 (m, 2 H, 4-CH₂), 1.75-1.70 (m, 3 H, 8-CH₃), 1.68 (s, 6 H, 10-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ_C: 168.7 (3-C), 161.2 (1-C), 132.5 (6-CH), 128.2 (7-CH), 106.8 (9-C), 95.4 (2-C), 70.0 (5-CH), 41.3 (4-CH₂), 25.5 (10-CH₃), 25.0 (10-CH₃), 17.8 (8-CH₃); HRMS (ESI): m/z: berechnet für C₁₁H₁₆O₄Na [M+Na]⁺ 235.0946, gefunden 235.0949 [M+Na]⁺.

(R/S)-(E)-6-(2-hydroxypent-3-en-1-yl)-2,2,5-trimethyl-4H-1,3-dioxin-4-on (*rac*-**133**)

Vorschrift 1:

(*E*)-Crotonaldehyd (72 μL , 0.75 mmol, 3.0 Äq.) wurde in 800 μL trockenem CH_2Cl_2 gelöst und auf -78°C gekühlt. TiCl_4 (1 M in CH_2Cl_2 , 800 μL , 0.80 mmol, 3.2 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben und für 15 min bei -78°C gerührt. Zu der entstandenen, farblosen Suspension wurde Silyldienoether **132** (68 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äq.) in 500 μL CH_2Cl_2 zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 2 h bei -78°C gerührt und anschließend bei 0°C mit gesättigter NH_4Cl -Lösung (2 mL) versetzt. Nach 1 h Rühren bei RT wurden die Phasen getrennt und die organische Phase mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen (1 x 5 mL). Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes an Kieselgel (Et_2O /Petrolether: 1/4 \rightarrow 1/1 \rightarrow Et_2O) lieferte das gewünschte Produkt *rac*-**133** in 88% Ausbeute (50 mg, 0.22 mmol).

Vorschrift 2:

(*E*)-Crotonaldehyd (100 μL , 1.21 mmol, 1.0 Äq.) und Silyldienoether **132** (1.0 g, 3.73 mmol, 3.0 Äq.) wurden in 6 mL trockenem CH_2Cl_2 auf -78°C gekühlt. Zu der gelben Suspension wurde $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ (48%, 150 μL , 1.21 mmol, 1.0 Äq.) tropfenweise hinzugegeben. Nach 3 h Rühren bei -78°C wurde die rote Lösung bei 0°C mit Phosphatpuffer (pH 7) versetzt. Nach Erwärmen auf RT wurden die Phasen getrennt und die organische Phase mit EtOAc (3 x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet. Säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes an Kieselgel (Et_2O /Petrolether: 1/4 \rightarrow 1/1 \rightarrow Et_2O) lieferte das gewünschte Produkt *rac*-**133** in 91% Ausbeute (250 mg, 1.10 mmol).

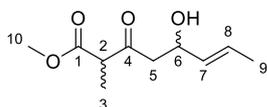
Vorschrift 3:

In einem 10 ml Schlenkgefäß mit aktiviertem Molsieb (3A) wurde $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ (24 μL , 0.08 mmol, 0.3 Äq.) und (*R*)-BINOL (23 mg, 0.08 mmol, 0.3 Äq.) in 1 mL trockenem THF für 1 h bei RT gerührt. Die orangefarbende Suspension wurde auf -78°C gekühlt, anschließend mit (*E*)-Crotonaldehyd (21 μL , 0.25 mmol, 1.0 Äq.) versetzt und für 20 min bei -78°C gerührt. Silyldienoether **132** (135 mg, 0.50 mmol, 2.0 Äq.), gelöst in 250 μL

THF, wurde zur Reaktionslösung hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 48 h bei RT gerührt und danach mit gesättigter NH_4Cl -Lösung (2 mL) versetzt. Nach 1 h Rühren bei RT wurden die Phasen getrennt und die organische Phase mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen (1 x 5 mL). Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Säulenchromatographische Reinigung des Rohproduktes an Kieselgel (Et_2O /Petrolether: 1/4 \rightarrow 1/1 \rightarrow Et_2O) lieferte das gewünschte Produkt **133** in 53% Ausbeute (30 mg, 13.3 mmol) mit einem $ee = 38\%$.

$R_f = 0.2$ (Petrolether/ Et_2O 1:1); $t_R = 11.6$ min, 12.3 min (OD-H, n -Hexan : i PrOH = 95:5, 1.2 mL/min); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_H : 5.78-5.69 (m, 1 H, 7-CH), 5.55-5.49 (m, 1 H, 6-CH), 4.37 (dt, 1 H, $^3J = 7.0$ Hz, 6.2 Hz, 5-CH), 2.59 (dd, 1 H, $^2J = 14.0$ Hz, $^3J = 7.8$ Hz, 4- CH_2), 2.44 (dd, 1 H, $^2J = 14.0$ Hz, $^3J = 5.5$ Hz, 4- CH_2), 1.84 (s, 3 H, 9- CH_3), 1.71 (dd, 3 H, $^3J = 6.5$ Hz, $^3J = 1.2$ Hz, 8- CH_3), 1.66 (s, 3 H, 11- CH_3), 1.65 (s, 3 H, 11- CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_C : 162.4 (3-C), 104.9 (10-C), 102.3 (2-C), 132.6 (6-CH), 128.2 (7-CH), 70.5 (5-CH), 38.7 (4- CH_2), 24.9 (11- CH_3), 17.6 (8- CH_3), 10.4 (9- CH_3).

(*R/S*)-Methyl-(*E*)-5-hydroxy-2-methyl-3-oxooct-6-enoat (**138**)

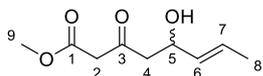


Diisopropylamin (1,9 mL, 13.5 mmol, 2.50 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 20 mL THF gelöst und auf -78 °C abgekühlt. n -BuLi (5,4 mL, 13.5 mmol, 2.5 M in Hexan, 2.50 Äq.) wurde tropfenweise zugegeben. Die Lösung wurde über 30 min in einem Eisbad gerührt und anschließend auf -78 °C gekühlt. DMPU (670 μL , 5.4 mmol, 1.00 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben und die Lösung für 30 min gerührt. Oxoester **xx** (702 mg, 5.4 mmol, 1.00 Äq.), gelöst in 5 mL THF, wurde tropfenweise zugegeben und die Lösung für 50 min gerührt. (*E*)-Crotonaldehyd (490 μL , 5.9 mmol, 1.10 Äq.) wurde tropfenweise zugegeben und die Lösung für 2 h bei -78 °C gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 mL 2 M HCl -Lösung bei -78 °C beendet und die resultierende Suspension für 30 min bei RT gerührt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 50 mL Et_2O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Es konnten 1,06 g

des Rohprodukts **138** als gelbes Öl erhalten werden, welches ohne weitere Reinigung für die Bildung von Lacton (**101a**) eingesetzt wurde.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 5.77\text{-}5.68$ (m, 1 H, 8-CH), 5.52-5.45 (m, 1 H, 7-CH), 4.57-4.50 (m, 1 H, 6-CH), 3.73 (s, 3 H, 10- CH_3), 3.55 (q, 1 H, $^3J = 7.1$ Hz, 2-CH), 2.83-2.72 (m, 2 H, 5- CH_2), 2.70-2.68 (m, 1 H, OH), 1.70-1.68 (m, 3 H, 9- CH_3), 1.35 (dd, 3 H, $^3J = 7.1$ Hz, $^5J = 2.4$ Hz, 3- CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{C}} = 206.2, 206.1$ (4-C), 170.8, 170.7 (1-C), 131.9, 131.9 (8-CH), 127.6, 127.6 (7-CH), 68.7, 68.6 (6-CH), 53.5, 53.4 (10- CH_3), 52.7, 52.7 (2-CH), 48.3, 48.1 (5- CH_2), 17.8 (9- CH_3), 12.7, 12.7 (3- CH_3). **HRMS** (ESI): m/z : berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 223.0945, gefunden 223.0946 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(*R/S*)-Methyl-(*E*)-5-hydroxy-3-oxooct-6-enoat (**137**)

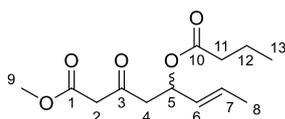


Unter N_2 -Atmosphäre wurde Natriumhydrid (900 mg, 22.46 mmol, 1.20 Äq.) in 40 mL THF vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Zu der resultierenden Suspension wurde Methylacetoacetat (**135**) (2.0 mL, 18.72 mmol, 1.00 Äq.) tropfenweise zugegeben. Nachdem keine Gasentwicklung mehr beobachtet werden konnte, wurde das Gemisch auf -78 °C gekühlt. *n*-BuLi (8.3 mL, 20.60 mmol, 1.10 Äq., 2.5 M in Hexan) wurde tropfenweise hinzugegeben. Im Anschluss wurde das Kältebad für 30 min entfernt und danach die Reaktionslösung wieder auf -78 °C gekühlt. (*E*)-Crotonaldehyd (1.7 mL, 20.60 mmol, 1.10 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben und die Reaktionslösung für 5 min bei -78 °C und danach für 30 min bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mL gesättigter NH_4Cl -Lösung/ H_2O (1:1) bei 0 °C beendet. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 50 mL EtOAc extrahiert und die vereinigte organische Phase wurde zweimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt (2.4 g) wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (EtOAc:PE = 1:4, 1:2, 1:1). Es konnten 34% (1.2 g, 6.36 mmol) der Verbindung **137** als gelbe Flüssigkeit erhalten werden.

R_f (EtOAc:PE 1:4): 0.2; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta_{\text{H}} = 5.78\text{-}5.69$ (m, 1 H, 7-CH), 5.52-5.45 (m, 1 H, 6-CH), 4.54 (m, 1 H, 5-CH), 3.74 (s, 3 H, 9- CH_3), 3.50 (s, 2 H, 2- CH_2), 2.76 (d, 1 H,

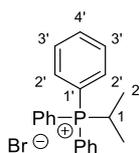
$^3J = 1.7$ Hz, 4- CH_2), 2.74 (s, 1 H, OH), 2.59 (m, 1 H, 4- CH_2), 1.69 (m, 3 H, 8- CH_3). ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta_C = 17.78$ (8- CH_3), 49.78 (4- CH_2), 49.88 (4- CH_2), 52.58 (9- CH_3), 68.64 (5-CH), 127.75 (7-CH), 131.80 (6-CH), 167.45 (1-C), 202.92 (3-C); HRMS (ESI): m/z : berechnet für $C_9H_{14}NaO_4$ $[M+Na]^+$ 186.0892, gefunden 186.0893 $[M+Na]^+$.

(R/S)-Methyl-(E)-5-(butyryloxy)-3-oxooct-6-enoat (155)



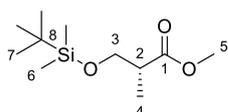
Unter N_2 -Atmosphäre wurde DCC (248 mg, 1.20 mmol, 1.20 Äq.) in 8 mL CH_2Cl_2 bei RT gelöst. Zu dieser Lösung wurden nacheinander Buttersäure (110 μ L, 1.20 mmol, 1.20 Äq.), Alkohol **137** (186 mg, 1.00 mmol, 1.00 Äq.) und DMAP (5 mg, 0.04 mmol, 0.04 Äq.) zugegeben und die resultierende Reaktionsmischung 7 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurden 10 mL Et_2O zugegeben und der entstandene Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeeengt und das Rohprodukt anschließend säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt ($EtOAc:PE = 1:6, 1:4, 1:1$). Es konnten 84% (215 mg, 1.01 mmol) der Titelverbindung **155** als farblose Kristalle erhalten werden.

R_f ($EtOAc:PE 1:2$): 0.4; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): $\delta_H = 5.83$ -5.74 (m, 1 H, 7-CH), 5.74-5.60 (m, 1 H, 5-CH), 5.47-5.40 (m, 1 H, 6-CH), 3.74 (s, 3 H, 9- CH_3), 3.46 (d, 2 H, $^3J = 1.1$ Hz, 2- CH_2), 2.92 (dd, 1 H, $^2J = 16.5$ Hz, $^3J = 7.8$ Hz, 4- CH_a), 2.79 (dd, 1 H, $^2J = 11.2$ Hz, $^3J = 5.3$ Hz, 4- CH_b), 2.24 (t, 2 H, $^3J = 7.4$ Hz, 11- CH_2), 1.70-1.67 (m, 3 H, 8- CH_3), 1.62 (sext, 2 H, $^3J = 7.5$ Hz, 12- CH_2), 0.92 (t, 3 H, $^3J = 7.4$ Hz, 13- CH_3); ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): $\delta_C = 13.74$ (13- CH_3), 17.86 (8- CH_3), 18.51 (12- CH_2), 36.44 (11- CH_2), 47.62 (4- CH_2), 49.57 (2- CH_2), 52.55 (9- CH_3), 70.03 (5-CH), 128.15 (6-CH), 130.22 (7-CH), 167.42 (1-C), 172.71 (10-C), 199.24 (3-C); HRMS (ESI): m/z : berechnet für $C_9H_{14}NaO_4$ $[M+Na]^+$ 279.1208, gefunden 279.1206 $[M+Na]^+$.

Isopropyltriphenylphosphoniumbromid (122)

Isopropylbromid (4.8 mL, 51.2 mmol, 1.1 Äq.) wurde in einem druckbeständigen Reaktionsgefäß vorgelegt und 5 min lang mit Argon gespült. Anschließend wurde Triphenylphosphin (12.2 g, 46.5 mmol, 1.0 Äq.) zugegeben und der Ansatz 48 h bei 150 °C erhitzt. Der entstandene, weiße Feststoff wurde jeweils zweimal mit 20 mL THF und Et₂O gewaschen. Die Lösungsmittel wurden unter vermindertem Druck entfernt. Das Produkt **122** wurde als weißer Feststoff in 55% Ausbeute (10.35 g, 26.86 mmol) erhalten.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 7.95-7.90 (m, 6 H, 2'-CH), 7.72-7.65 (m, 9 H, 3'-CH, 4'-CH), 5.41-5.32 (m, 1 H, 1-CH), 1.30 (dd, 6 H, ³J = 6.6 Hz, 18.9 Hz, 2-CH₃); **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 134.8 (d, ⁴J = 3.0 Hz, 4'-CH), 133.9 (d, ²J = 9.2 Hz, 2'-CH), 130.5 (d, ³J = 12.1 Hz, 3'-CH), 117.7 (d, ¹J = 82.6 Hz, 1'-CH), 21.4 (d, ¹J = 46.3 Hz, 1-CH), 16.4 (d, ²J = 2.1 Hz, 2-CH₃); **HRMS** (ESI): *m/z*: berechnet für C₂₁H₂₂P [M+H]⁺ 305.1459, gefunden 305.1461 [M+H]⁺.

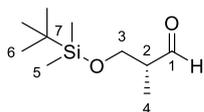
Methyl-(R)-3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-Methylpropanoat (119)

(R)-Rocheester (10.0 mL, 90.0 mmol, 1.0 Äq.), DMAP (110 mg, 0.9 mmol, 0.01 Äq.) und Imidazol (9.9 g, 144.0 mmol, 1.6 Äq.) wurden in 100 mL CH₂Cl₂ gelöst. TBSCl wurde in 20 mL CH₂Cl₂ gelöst und tropfenweise bei 0 °C zugegeben, sodass eine weiße Suspension entstand. Die Reaktionsmischung wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde H₂O (150 mL) zugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ (3x 50 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 120 mL H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und es konnten 20.1 g des Rohprodukts **119** als gelbes Öl in erhalten werden.

R_f = 0.9 (Petrolether/Et₂O 10:1); $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ = -0.1 (c = 0.86, CH₂Cl₂); **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 3.78 (dd, 1 H, ²J = 9.7 Hz, ³J = 6.9 Hz, 3-CH), 3.67 (s, 3 H, 5-CH₃), 3.64 (dd, 1 H,

$^2J = 9.8$ Hz, $^3J = 6.0$ Hz, 3-CH), 2.65 (sext, 1 H, $^3J = 6.8$ Hz, 2-CH), 1.13 (d, 3 H, $^3J = 6.8$ Hz, 4-CH₃), 0.87 (s, 9 H, 7-CH₃), 0.03 (d, 6 H, $^3J = 1.4$ Hz, 6-CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 175.6 (1-C), 65.4 (3-CH₂), 51.6 (5-CH₃), 42.7 (2-CH), 25.9 (7-CH₃), 18.3 (8-C), 13.6 (4-CH₃), -5.4 (6-CH₃).

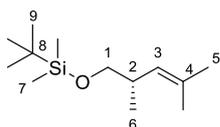
(R)-3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-2-methylpropanal (**121**)



Methylester **119** (1.0 g, 4.3 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 20 mL CH₂Cl₂ vorgelegt und auf -78 °C gekühlt. Tropfenweise wurde DIBAL-H (4.5 mL, 4.5 mmol, 1.05 Äq., 1 M in Hexan) zugegeben und die Reaktionslösung 1 h bei -78 °C gerührt. Danach wurde die Reaktionsmischung über 20 min auf -40 °C erwärmt und 20 ml gesättigte Na,K-Tartratlösung zugegeben. Nach Erwärmung auf Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung für 3 h gerührt und anschließend die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 50 mL CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 50 mL H₂O gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und es konnten 0.9 g des Rohprodukts **121** als farbloses Öl erhalten werden. Von dem Aldehyd **121** konnte kein hochaufgelöstes Massenspektrum erhalten werden.

$[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -0.1$ (c = 0.68, CH₂Cl₂); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl₃) δ_{H} : 9.74 (d, 1 H, $^3J = 1.6$ Hz, 1-CH), 3.83 (m, 2 H, 3-CH₂), 2.61-2.44 (m, 1 H, 2-CH), 1.09 (d, 3 H, $^3J = 7.0$ Hz, 4-CH₃), 0.87 (s, 9 H, 6-CH₃), 0.05 (s, 6 H, 5-CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl₃) δ_{C} : 204.9 (1-CH), 65.0 (3-CH₂), 42.0 (2-CH), 25.9 (6-CH₃), 18.3 (7-C), 13.2 (4-CH₃), -5.4 (5-CH₃).

(S)-tert-Butyl-((2,4-Dimethylpent-3-en-1-yl)oxy)dimethylsilan (**123**)

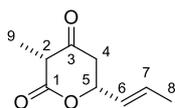


Phosphoniumbromid **122** (5.96 g, 15.5 mmol, 1.20 Äq.) wurde in 25 mL Et₂O gelöst und auf 0 °C gekühlt. Tropfenweise wurde *n*-BuLi (8.87 mL, 14.19 mmol, 1.10 Äq., 1.6 M) zugegeben und die rote Lösung 1 h bei 0 °C gerührt. Der Aldehyd **121** (2.6 g, 12.8 mmol, 1.00 Äq.) wurde in 25 mL Et₂O gelöst und der Reaktionsmischung bei 0 °C zugeführt. Die Reaktionsmischung wurde für 3 d bei Raumtemperatur gerührt. Im Anschluss wurde der

Feststoff aus der Reaktionsmischung abfiltriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (PE) gereinigt. Das Produkt **123** wurde als klare Flüssigkeit in 55% Ausbeute (1.61 g, 7.05 mmol) erhalten.

$R_f = 0.5$ (Petrolether); $[\alpha]_D^{23} = +0.1$ ($c = 0.8$, CH_2Cl_2); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 4.88-4.85 (m, 1 H, 3-CH), 3.43 (dd, 1 H, $^2J = 9.7$ Hz, $^3J = 6.0$ Hz, 1- CH_2), 3.31 (dd, 1 H, $^2J = 9.8$ Hz, $^3J = 7.6$ Hz, 1- CH_2), 2.57-2.46 (m, 1 H, 2-CH), 1.68 (d, 3 H, $^4J = 1.2$ Hz, 5- CH_3), 1.63 (d, 3 H, $^4J = 1.2$ Hz, 5- CH_3), 0.92 (d, 3 H, $^3J = 6.6$ Hz, 6- CH_3), 0.89 (s, 9 H, 9- CH_3), 0.03 (s, 6 H, 7- CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 132.0 (4-C), 127.8 (3-CH), 68.3 (1- CH_2), 35.7 (2-CH), 26.1 (9- CH_3), 18.5 (8-C), 18.2 (5- CH_3), 17.6 (6- CH_3), -5.1 (7- CH_3).

(E)-3-Methyl-6-(prop-1-en-1-yl)dihydro-2H-pyran-2,4(3H)-dion (**101a**)



Vorschrift 1:

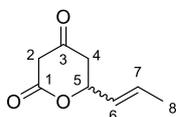
Aldolprodukt *rac*-**133** (200 mg, 0.9 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 4.0 mL MeOH gelöst. $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (56.0 mg, 0.4 mmol, 0.4 Äq.) und K_2CO_3 (120.0 mg, 0.9 mmol, 1.0 Äq.) wurden hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 72 h bei 50 °C gerührt und im Anschluss mit 20 mL CH_2Cl_2 und bei 0 °C mit 10 mL 0.5 M HCl-Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde mit CH_2Cl_2 extrahiert (3 x 10 mL). Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Reinigung des Rohproduktes mittels präparativer HPLC lieferten das gewünschte Produkt **101a** mit 17% Ausbeute (25 mg, 14.8 mmol). Die Verbindung wurde als Diastereomerenmischung (*syn* : *anti* = 5 : 1) erhalten.

Vorschrift 2:

Methylester *rac*-**138** (414 mg, 2.1 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 20 mL 1 M wässriger KOH-Lösung gelöst und für 7 h bei RT gerührt. Anschließend wurde auf 0 °C abgekühlt und die Lösung mit 6 M HCl-Lösung angesäuert (pH 1). Der dabei ausgefallene Feststoff wurde über eine Glasfritte abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet. Es konnten 70% (263 mg, 1.5 mmol) der Verbindung **101a** als gelber Feststoff isoliert werden. Die Verbindung wurde als Diastereomerenmischung (*syn* : *anti* = 5 : 1) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 5.98-5.89 (m, 1 H, 7-CH), 5.60-5.54 (m, 1 H, 6-CH), 5.16-5.11 (m, 1 H, 5-CH), 3.58 (q, 1 H, $^3J = 6.6$ Hz, 2-CH), 2.76 (dd, 1 H, $^2J = 19.0$ Hz, $^3J = 3$ Hz, 4-CH), 2.55 (dd, 1 H, $^2J = 19.0$ Hz, $^3J = 11.6$ Hz, 4-CH), 1.78 (dd, 3 H, $^3J = 6.5$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 8- CH_3), 1.37 (d, 3 H, $^3J = 6.5$ Hz, 9- CH_3); **$^{13}\text{C-NMR}$** (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 201.4 (3-C), 169.7 (1-C), 132.2 (7-CH), 126.6 (6-CH), 74.8 (5-CH), 51.9 (2-CH), 43.5 (4- CH_2), 17.9 (8- CH_3), 8.0 (9- CH_3); **HRMS** (ESI): m/z : berechnet für $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{NaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 191.0684, gefunden 191.0685 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

(*R/S*)-(E)-6-(Prop-1-en-1-yl)dihydro-2*H*-pyran-2,4(3*H*)-dion (111)

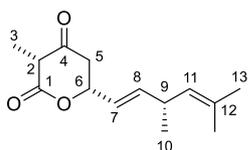


Unter N_2 -Atmosphäre wurde Natriumhydrid (900 mg, 22.46 mmol, 1.20 Äq.) in 40 mL THF vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Zu der resultierenden Suspension wurde Methylacetoacetat (**135**) (2.0 mL, 18.72 mmol, 1.00 Äq.) tropfenweise zugegeben. Nachdem keine Gasentwicklung mehr beobachtet werden konnte, wurde das Gemisch auf -78 °C gekühlt. *n*-BuLi (8.3 mL, 20.60 mmol, 1.10 Äq., 2.5 M in Hexan) wurde tropfenweise hinzugegeben. Im Anschluss wurde das Kältebad für 30 min entfernt und danach die Reaktionslösung wieder auf -78 °C gekühlt. (*E*)-Crotonaldehyd (1.7 mL, 20.60 mmol, 1.10 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben und die Reaktionslösung für 5 min bei -78 °C und danach für 30 min bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 mL $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{aq}}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) bei 0 °C beendet. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 50 mL EtOAc gewaschen und anschließend mit konzentrierter HCl-Lösung auf pH 1 angesäuert, woraufhin sich ein Niederschlag bildete. Der Niederschlag wurde durch Zugabe von 20 mL EtOAc aufgelöst und die wässrige Phase wurde zweimal mit 20 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Es konnten 20% (588 mg, 4.5 mmol) der Verbindung **111** als schwachgelber Feststoff isoliert werden.

R_f (EtOAc:PE 1:4): 0.1; **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CDCl_3): δ_{H} = 5.95-5.86 (m, 1 H, 7-CH), 5.61-5.55 (m, 1 H, 6-CH), 5.13-5.08 (m, 1 H, 5-CH), 3.54 (d, 1 H, $^2J = 19.2$ Hz, 2- CH_2), 3.44 (d, 1 H, $^2J = 19.1$ Hz, 2- CH_2), 2.76 (dd, 1 H, $^2J = 18.2$ Hz, $^3J = 3.6$ Hz, 4- CH_2), 2.62 (dd, 1 H, $^2J = 18.1$

Hz, $^3J = 9.5$ Hz, 4-CH₂), 1.77 (m, 3 H, 8-CH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl₃): $\delta_{\text{C}} = 17.92$ (8-CH₃), 43.57 (4-CH₂), 47.12 (2-CH₂), 75.64 (5-CH), 126.67 (6-CH), 132.03 (7-CH), 167.14 (1-C), 199.96 (3-C); **HRMS** (ESI): m/z : berechnet für C₈H₁₀NaO₃ [M+Na]⁺ 177.0528, gefunden 177.0529 [M+Na]⁺.

((R,E)-3,5-Dimethylhexa-1,4-dien-1-yl)-3-methyldihydro-2H-pyran-2,4(3H)-dion (156)

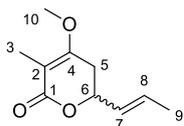


Diisopropylamin (52 μL , 0.37 mmol, 2.50 Äq.) wurde unter Ar-Atmosphäre in 500 μL THF gelöst und auf -78 °C abgekühlt. *n*-BuLi (150 μL , 0.37 mmol, 2.5 M in Hexan, 2.50 Äq.) wurde tropfenweise zugegeben. Die Lösung wurde über 30 min in einem Eisbad gerührt und anschließend auf -78 °C gekühlt. DMPU (19 μL , 0.15 mmol, 1.00 Äq.) wurde tropfenweise hinzugegeben und die Lösung für 30 min gerührt. Oxoester **136** (19.4 mg, 0.15 mmol, 1.00 Äq.), gelöst in 250 μL THF, wurde tropfenweise zugegeben und die Lösung für 60 min gerührt. Aldehyd **109b** (21 mg, 0.15 mmol, 1.00 Äq.), gelöst in 250 μL THF, wurde tropfenweise zugegeben und die Lösung für 2 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mL 3 M HCl-Lösung bei -78 °C beendet und die resultierende Suspension für 1 h bei RT gerührt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 10 mL Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde ohne weitere Reinigung in 4 mL 1 M KOH-Lösung aufgenommen und für 7 h bei RT gerührt. Danach wurde die Lösung auf 0 °C gekühlt und mit 6 M HCl-Lösung angesäuert (pH 1). Säulenchromatographische Reinigung des Rohprodukts an Kieselgel (EtOAc:PE = 1:10) lieferte 40% (16 mg, 0.15 mmol) des gewünschte Produktes **156** als schwach gelbes Öl.

R_f (EtOAc:PE = 1:10): 0.3, $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl₃): $\delta_{\text{H}} = 5.83$ (ddd, 1 H, $^3J = 9.3$ Hz, $^3J = 6.2$ Hz, $^4J = 0.9$ Hz, 8-CH), 5.49 (ddt, 1 H, $^3J = 15.5$ Hz, $^3J = 6.8$ Hz, $^4J = 1.6$ Hz, 7-CH), 5.17-5.12 (m, 1 H, 6-CH), 4.93 (d, 1 H, $^3J = 9.0$ Hz, 11-CH), 3.57 (q, 1 H, $^3J = 6.6$ Hz, 2-CH), 3.11 (ddt, 1 H, $^3J = 7.0$ Hz, $^3J = 1.7$ Hz, 9-CH), 2.77 (dd, 1 H, $^2J = 19.0$ Hz, $^3J = 2.7$ Hz, 5-CH₂), 2.56 (dd, 1 H, $^2J = 19.0$ Hz, $^3J = 11.7$ Hz, 5-CH₂), 1.70 (d, 3 H, $^3J = 1.1$ Hz, 13-CH₃), 1.62 (s, 3

H, 13-CH₃), 1.37 (d, 3 H, ³J = 6.7 Hz, 3-CH₃), 1.06 (dd, 3 H, ³J = 6.9 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 10-CH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ_C = 201.3 (4-C), 169.8 (1-C), 141.3 (8-CH), 132.4 (12-C), 127.3 (11-CH), 122.9 (7-CH), 74.9 (6-CH), 51.9 (2-CH), 43.6 (5-CH₂), 35.3 (9-CH), 25.9 (13-CH₃), 20.7 (10-CH₃), 18.9 (13-CH₃), 8.0 (3-CH₃). HRMS (ESI): m/z: berechnet für C₁₄H₂₀NaO₃ [M+Na]⁺ 259.1310, gefunden 259.1312 [M+Na]⁺.

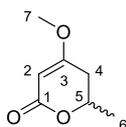
(R/S)-(E)-4-Methoxy-3-methyl-6-(prop-1-en-1-yl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-on (157)



Lacton **(101a)** (50 mg, 0.30 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 3 mL THF gelöst und auf 0 °C gekühlt. Im Anschluss wurde Natriumhydrid (13.9 mg, 0.35 mmol, 1.2 Äq.) zur Reaktionslösung hinzugegeben und das resultierende Gemisch 30 min bei 0 °C gerührt. Danach wurde Methyljodid (22 µL, 0.36 mmol, 1.2 Äq.) hinzugegeben und die Reaktionslösung für 1 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 mL H₂O beendet. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 10 mL EtOAc extrahiert, die vereinigten organischen Phasen zweimal mit gesättigter gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und danach über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt (50 mg) wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (EtOAc:PE = 1:4, 1:2, 1:1). Es konnten 30 mg (55%) der Titelverbindung als gelbes Öl erhalten werden.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ_H = 5.96-5.71 (m, 1 H, 8-CH), 5.68-5.54 (m, 1 H, 7-CH), 4.80-4.68 (m, 1 H, 6-CH), 3.78 (s, 3 H, 10-CH₃), 2.62-2.53 (m, 2 H, 5-CH₂), 1.79-1.77 (m, 3 H, 3-CH₃), 1.76-1.72 (m, 3 H, 9-CH₃).

4-Methoxy-6-methyl-5,6-dihydro-2H-pyran-2-on (158)



Lacton **158** (50 mg, 0.40 mmol, 1.0 Äq.) wurde in 1.0 mL DMF gelöst und die Lösung auf 0 °C gekühlt. K₂CO₃ (83 mg, 0.60 mmol, 1.5 Äq.) wurde zu der Reaktionslösung zugegeben. Zu dieser Suspension wurde Methyljod (25 µL, 0.40 mmol, 1.0 Äq.) hinzugegeben. Im

Anschluss wurde die Reaktionsmischung für 2 h bei 0 °C und danach über Nacht bei RT gerührt. Zur Reaktionsmischung wurden 20 mL Et₂O dazugegeben und der Feststoff abfiltriert. Die organische Phase wurde zweimal mit gesättigter gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, danach über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (EtOAc:PE = 1:4, 1:2, 1:1). Es konnten 35% (20 mg, 0.14 mmol) der Verbindung **158** als gelbes Öl erhalten werden.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H = 5.14 (d, 1 H, *J* = 1.5 Hz, 2-CH), 4.57-4.48 (m, 1 H, 5-CH), 3.74 (s, 3 H, 7-CH₃), 2.46 (ddd, 1 H, *J* = 17.2 Hz, 11.6 Hz, 1.7 Hz, 4-CH₂), 2.34 (dd, 1 H, *J* = 17.0 Hz, *J* = 4.1 Hz, 4-CH₂), 1.44 (d, 3 H, *J* = 6.1 Hz, 6-CH₃). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ_C = 172.9 (3-C), 167.5 (1-C), 90.4 (2-CH), 72.4 (5-CH), 56.1 (7-CH₃), 34.7 (4-CH₂), 20.7 (6-CH₃).

6 Literaturverzeichnis

- (1) Fleming, A. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226–236.
- (2) Nicolaou, K. C.; Sorensen, E. J. *Classics in Total Synthesis: Targets, Strategies, Methods*; 1st Ed.; WILEY-VCH: Weinheim, 1996.
- (3) Daemmrich, A. *Hist. Technol.* **2009**, *25*, 237–256.
- (4) Kardos, N.; Demain, A. L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92*, 677–687.
- (5) Champney, S.; Burdine, R. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 2141–2144.
- (6) Waxman, D. J.; Strominger, J. L. *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 825–869.
- (7) Ruzin, A.; Singh, G.; Severin, A.; Yang, Y.; Dushin, R. G.; Sutherland, A. G.; Minnick, A.; Greenstein, M.; May, M. K.; Shlaes, D. M.; Bradford, P. a. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 728–738.
- (8) Dushin, R. G.; Wang, T. Z.; Sum, P. E.; He, H.; Sutherland, A. G.; Ashcroft, J. S.; Graziani, E. I.; Koehn, F. E.; Bradford, P. a.; Petersen, P. J.; Wheless, K. L.; How, D.; Torres, N.; Lenoy, E. B.; Weiss, W. J.; Lang, S. a.; Projan, S. J.; Shlaes, D. M.; Mansour, T. S. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3487–3490.
- (9) Fuse, S.; Koinuma, H.; Kimbara, A.; Izumikawa, M.; Mifune, Y.; He, H.; Shin-Ya, K.; Takahashi, T.; Doi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12011–12017.
- (10) Crowfoot, D.; Bunn, C. W.; Rogers-Low, B. W.; Turner-Jones, A. *The Chemistry of Penicillin*; Clarke, H. T.; Johnson, J. R.; Robinson, R., Eds.; Princeton University Press: Princeton, New Jersey, 1949.
- (11) Sheehan, J. C.; Logan, K. R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 5838–5839.
- (12) Batchelor, F. R.; Doyle, F. P.; Naylor, J. H.; Rolinson, G. N. *Nature* **1959**, *183*, 257–258.
- (13) Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311–335.
- (14) Cragg, G. M.; Newman, D. J. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2013**, *1830*, 3670–3695.
- (15) He, H.; Williamson, R. T.; Shen, B.; Graziani, E. I.; Yang, H. Y.; Sakya, S. M.; Petersen, P. J.; Carter, G. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9729–9736.
- (16) Held, J.; Gebru, T.; Kalesse, M.; Jansen, R.; Gerth, K.; Muller, R.; Mordmuller, B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 6378–6384.
- (17) WHO. *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014*; Genf, 2014.

- (18) Kumarasamy, K. K.; Toleman, M. a.; Walsh, T. R.; Bagaria, J.; Butt, F.; Balakrishnan, R.; Chaudhary, U.; Doumith, M.; Giske, C. G.; Irfan, S.; Krishnan, P.; Kumar, A. V.; Maharjan, S.; Mushtaq, S.; Noorie, T.; Paterson, D. L.; Pearson, A.; Perry, C.; Pike, R.; Rao, B.; Ray, U.; Sarma, J. B.; Sharma, M.; Sheridan, E.; Thirunarayan, M. a.; Turton, J.; Upadhyay, S.; Warner, M.; Welfare, W.; Livermore, D. M.; Woodford, N. *Lancet Infect. Dis.* **2010**, *10*, 597–602.
- (19) Walsh, C. *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, *1*, 65–70.
- (20) Wright, P. M.; Seiple, I. B.; Myers, A. G. *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 8984–9014.
- (21) Müller, R.; Wink, J. *Int. J. Med. Microbiol.* **2014**, *304*, 3–13.
- (22) Silver, L. L. *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, *24*, 71–109.
- (23) Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Benjamin, D. K.; Bradley, J.; Guidos, R. J.; Jones, R. N.; Murray, B. E.; Bonomo, R. a; Gilbert, D. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *56*, 1685–1694.
- (24) Koehn, F. E.; Carter, G. T. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 206–220.
- (25) Kingston, D. G. I.; Kingston, D. G. I. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 507–515.
- (26) Lewis, K. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 371–387.
- (27) Ling, L. L.; Schneider, T.; Peoples, A. J.; Spoering, A. L.; Engels, I.; Conlon, B. P.; Mueller, A.; Schäberle, T. F.; Hughes, D. E.; Epstein, S.; Jones, M.; Lazarides, L.; Steadman, V. a; Cohen, D. R.; Felix, C. R.; Fetterman, K. A.; Millett, W. P.; Nitti, A. G.; Zullo, A. M.; Chen, C.; Lewis, K. *Nature* **2015**, *517*, 455–459.
- (28) Baltz, R. H. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *33*, 507–513.
- (29) Subramani, R.; Aalbersberg, W. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 9291–9321.
- (30) Nichols, D.; Cahoon, N.; Trakhtenberg, E. M.; Pham, L.; Mehta, A.; Belanger, A.; Kanigan, T.; Lewis, K.; Epstein, S. S. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 2445–2450.
- (31) Bode, H. B.; Bethe, B.; Höfs, R.; Zeeck, A. *ChemBioChem* **2002**, *3*, 619.
- (32) Emmerson, A. M. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 13–20.
- (33) Bax, B. D.; Chan, P. F.; Eggleston, D. S.; Fosberry, A.; Gentry, D. R.; Gorrec, F.; Giordano, I.; Hann, M. M.; Hennessy, A.; Hibbs, M.; Huang, J.; Jones, E.; Jones, J.; Brown, K. K.; Lewis, C. J.; May, E. W.; Saunders, M. R.; Singh, O.; Spitzfaden, C. E.; Shen, C.; Shillings, A.; Theobald, A. J.; Wohlkonig, A.; Pearson, N. D.; Gwynn, M. N. *Nature* **2010**, *466*, 935–940.

- (34) Baumann, S.; Herrmann, J.; Raju, R.; Steinmetz, H.; Mohr, K. I.; Hüttel, S.; Harmrolfs, K.; Stadler, M.; Müller, R. *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 14835–14839.
- (35) Birch, R. G.; Patil, S. S. *J. Gen. Microbiol.* **1985**, *131*, 1069–1075.
- (36) Moreno, M.; Elgaher, W.; Herrmann, J.; Schläger, N.; Hamed, M.; Baumann, S.; Müller, R.; Hartmann, R.; Kirschning, A. *Synlett* **2015**, *26*, 1175–1178.
- (37) Kretz, J.; Kerwat, D.; Schubert, V.; Grätz, S.; Pesic, A.; Semsary, S.; Cociancich, S.; Royer, M.; Süßmuth, R. D. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2015**, *54*, 1969–1973.
- (38) Maxwell, a. *Mol. Microbiol.* **1993**, *9*, 681–686.
- (39) Birch, A. J.; Gager, F.; Mo, L.; Pelter, A.; Wright, J. J. *Aust. J. Chem.* **1969**, *22*, 2429.
- (40) Malpartida, F.; Hopwood, D. A. *Nature* **1984**, *309*, 462–464.
- (41) Fleischmann, R.; Adams, M.; White, O.; Clayton, R.; Kirkness, E.; Kerlavage, A.; Bult, C.; Tomb, J.; Dougherty, B.; Merrick, J.; Al., E. *Science* **1995**, *269*, 496–512.
- (42) Schuster, S. C. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 16–18.
- (43) Venter, J. C.; Adams, M. D.; Myers, E. W.; Li, P. W.; Mural, R. J.; Sutton, G. G.; Smith, H. O.; Yandell, M.; Evans, C. A; Holt, R. A *et al. Science* **2001**, *291*, 1304–1351.
- (44) Bentley, S. D.; Chater, K. F.; Cerdeño-Tárraga, A-M.; Challis, G. L.; Thomson, N. R.; James, K. D.; Harris, D. E.; Quail, M. A; Kieser, H.; Harper, D. *et al. Nature* **2002**, *417*, 141–147.
- (45) National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/> (aufgerufen am 23.09.2015).
- (46) Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410.
- (47) Fischbach, M. a; Walsh, C. T. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3468–3496.
- (48) Staunton, J.; Weissman, K. J. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380–416.
- (49) Cortes, J.; Haydock, S. F.; Roberts, G. a; Bevitt, D. J.; Leadlay, P. F. *Nature* **1990**, *348*, 176–178.
- (50) Donadio, S.; Staver, M.; McAlpine, J.; Swanson, S.; Katz, L. *Science* **1991**, *252*, 675–679.
- (51) Yu, T. W.; Shen, Y.; Doi-Katayama, Y.; Tang, L.; Park, C.; Moore, B. S.; Richard Hutchinson, C.; Floss, H. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 9051–9056.

- (52) Weissman, K. J.; Leadlay, P. F. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 925–936.
- (53) Gaisser, S.; Kellenberger, L.; Kaja, A. L.; Weston, A. J.; Lill, R. E.; Wirtz, G.; Kendrew, S. G.; Low, L.; Sheridan, R. M.; Wilkinson, B.; Galloway, I. S.; Stutzman-Engwall, K.; McArthur, H. a; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2840–2847.
- (54) Cane, D. E.; Walsh, C. T.; Khosla, C. *Science* **1998**, *282*, 63–68.
- (55) Martin, C. J.; Timoney, M. C.; Sheridan, R. M.; Kendrew, S. G.; Wilkinson, B.; Staunton, J. C.; Leadlay, P. F. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 4144–4147.
- (56) Rowe, C. J.; Böhm, I. U.; Thomas, I. P.; Wilkinson, B.; Rudd, B. a M.; Foster, G.; Blackaby, A. P.; Sidebottom, P. J.; Roddis, Y.; Buss, A. D.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 475–485.
- (57) Long, P. F.; Wilkinson, C. J.; Bisang, C. P.; Cortés, J.; Dunster, N.; Oliynyk, M.; McCormick, E.; McArthur, H.; Mendez, C.; Salas, J. a.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *Mol. Microbiol.* **2002**, *43*, 1215–1225.
- (58) Del Vecchio, F.; Petkovic, H.; Kendrew, S. G.; Low, L.; Wilkinson, B.; Lill, R.; Cortés, J.; Rudd, B. a M.; Staunton, J.; Leadlay, P. F. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *30*, 489–494.
- (59) Rodriguez, E.; McDaniel, R. *Curr. Opin. Microbiol.* **2001**, *4*, 526–534.
- (60) McDaniel, R.; Thamchaipenet, A.; Gustafsson, C.; Fu, H.; Betlach, M.; Ashley, G. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 1846–1851.
- (61) Ruan, X.; Pereda, A.; Stassi, D. L.; Zeidner, D.; Summers, R. G.; Jackson, M.; Shivakumar, A.; Kakavas, S.; Staver, M. J.; Donadio, S.; Katz, L. J. *Bacteriol.* **1997**, *179*, 6416–6425.
- (62) Reeves, C. D.; Murli, S.; Ashley, G. W.; Piagentini, M.; Hutchinson, C. R.; McDaniel, R. *Biochemistry* **2001**, *40*, 15464–15470.
- (63) Weist, S.; Süßmuth, R. D. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68*, 141–150.
- (64) Kirschning, A.; Taft, F.; Knobloch, T. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3245–3259.
- (65) Gregory, M. a.; Petkovic, H.; Lill, R. E.; Moss, S. J.; Wilkinson, B.; Gaisser, S.; Leadlay, P. F.; Sheridan, R. M. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2005**, *44*, 4757–4760.
- (66) Yu, T.-W.; Bai, L.; Clade, D.; Hoffmann, D.; Toelzer, S.; Trinh, K. Q.; Xu, J.; Moss, S. J.; Leistner, E.; Floss, H. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 7968–7973.
- (67) Taft, F.; Brünjes, M.; Floss, H. G.; Czempinski, N.; Grond, S.; Sasse, F.; Kirschning, A. *ChemBiochem* **2008**, *9*, 1057–1060.
- (68) Kirschning, A.; Hahn, F. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4086–4096.

- (69) Taft, F.; Harmrolfs, K.; Nickeleit, I.; Heutling, A.; Kiene, M.; Malek, N.; Sasse, F.; Kirschning, A. *Chem.-Eur. J.* **2012**, *18*, 880–886.
- (70) Low, P. S.; Antony, A. C. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1055–1058.
- (71) Challis, G. L. *Microbiology* **2008**, *154*, 1555–1569.
- (72) Weber, T.; Blin, K.; Duddela, S.; Krug, D.; Kim, H. U.; Bruccoleri, R.; Lee, S. Y.; Fischbach, M. a.; Müller, R.; Wohlleben, W.; Breitling, R.; Takano, E.; Medema, M. H. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 237–243.
- (73) Goldman, B. S.; Nierman, W. C.; Kaiser, D.; Slater, S. C.; Durkin, a S.; Eisen, J. a; Ronning, C. M.; Barbazuk, W. B.; Blanchard, M.; Field, C.; Halling, C.; Hinkle, G.; Iartchuk, O.; Kim, H. S.; Mackenzie, C.; Madupu, R.; Miller, N.; Shvartsbeyn, a; Sullivan, S. a; Vaudin, M.; Wiegand, R.; Kaplan, H. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 15200–15205.
- (74) Wenzel, S. C.; Meiser, P.; Binz, T. M.; Mahmud, T.; Müller, R. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2006**, *45*, 2296–2301.
- (75) Wenzel, S. C.; Kunze, B.; Höfle, G.; Silakowski, B.; Scharfe, M.; Blöcker, H.; Müller, R. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 375–385.
- (76) Silakowski, B.; Kunze, B.; Müller, R. *Gene* **2001**, *275*, 233–240.
- (77) Corre, C.; Challis, G. L. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 7–9.
- (78) Simunovic, V.; Zapp, J.; Rachid, S.; Krug, D.; Meiser, P.; Müller, R. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1206–1220.
- (79) Xiao, Y.; Gerth, K.; Muller, R.; Wall, D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 2014–2021.
- (80) Bode, H. B.; Meiser, P.; Klefisch, T.; Cortina, N. S. D. J.; Krug, D.; Göhring, A.; Schwär, G.; Mahmud, T.; Elnakady, Y. a.; Müller, R. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2139–2144.
- (81) Gaitatzis, N.; Kunze, B.; Müller, R. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 365–374.
- (82) Miyanaga, S.; Obata, T.; Onaka, H.; Fujita, T.; Saito, N.; Sakurai, H.; Saiki, I.; Furumai, T.; Igarashi, Y. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2006**, *59*, 698–703.
- (83) Friedrich, S.; Hahn, F. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1473–1508.
- (84) Mortison, J. D.; Sherman, D. H. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7041–7051.

- (85) Fischer, T.; Pietruszka, J. *Top. Curr. Chem.* **2010**, *297*, 1–43.
- (86) Sydor, P. K.; Barry, S. M.; Odulate, O. M.; Barona-Gomez, F.; Haynes, S. W.; Corre, C.; Song, L.; Challis, G. L. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 388–392.
- (87) Cheng, Q.; Xiang, L.; Izumikawa, M.; Meluzzi, D.; Moore, B. S. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 557–558.
- (88) Kalaitzis, J. a; Cheng, Q.; Thomas, P. M.; Kelleher, N. L.; Moore, B. S. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 469–472.
- (89) Kohli, R. M.; Walsh, C. T. *Chem. Commun.* **2003**, 297–307.
- (90) Horsman, M. E.; Hari, T. P. a; Boddy, C. N. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *00*, 1–20.
- (91) Pinto, A.; Wang, M.; Horsman, M.; Boddy, C. N. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2278–2281.
- (92) Korman, T. P.; Crawford, J. M.; Labonte, J. W.; Newman, a. G.; Wong, J.; Townsend, C. a.; Tsai, S.-C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 6246–6251.
- (93) Beck, Z. Q.; Aldrich, C. C.; Magarvey, N. a.; Georg, G. I.; Sherman, D. H. *Biochemistry* **2005**, *44*, 13457–13466.
- (94) Magarvey, N. a; Beck, Z. Q.; Golakoti, T.; Ding, Y.; Huber, U.; Hemscheidt, T. K.; Abelson, D.; Moore, R. E.; Sherman, D. H. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 766–779.
- (95) Ding, Y.; Seufert, W. H.; Beck, Z. Q.; Sherman, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5492–5498.
- (96) Hari, T. P. a.; Labana, P.; Boileau, M.; Boddy, C. N. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2656–2661.
- (97) Parveen, N.; Cornell, K. A. *Mol. Microbiol.* **2011**, *79*, 7–20.
- (98) Schmidberger, J. W.; James, A. B.; Edwards, R.; Naismith, J. H.; O'Hagan, D. *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3728–3730.
- (99) Struck, A. W.; Thompson, M. L.; Wong, L. S.; Micklefield, J. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2642–2655.
- (100) Schubert, H. L.; Blumenthal, R. M.; Cheng, X. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 329–335.
- (101) He, J.; Hertweck, C. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 1225–1232.
- (102) Miyairi, N.; Sakai, H.-I.; Konomi, T.; Hiroshi, I. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1976**, *29*, 227–235.
- (103) Werneburg, M.; Busch, B.; He, J.; Richter, M. E. a; Xiang, L.; Moore, B. S.; Roth, M.; Dahse, H. M.; Hertweck, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 10407–10413.

- (104) Martin, J. L.; McMillan, F. M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 783–793.
- (105) Gerth, K.; Washausen, P.; Hofle, G.; Irschik, H.; Reichenbach, H. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1996**, *49*, 71–75.
- (106) Vetcher, L.; Menzella, H. G.; Kudo, T.; Motoyama, T.; Katz, L. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 3734–3736.
- (107) Arima, K.; Imanaka, H.; Kousaka, M.; Fukuda, A.; Tamura, G. *Agric. Biol. Chem* **1964**, *28*, 575–576.
- (108) Julien, B.; Tian, Z.-Q.; Reid, R.; Reeves, C. D. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1277–1286.
- (109) Höfle, G.; Reichenbach, H. In *Sekundärmetabolismus bei Mikroorganismen*; Kuhn, W.; Fiedler, H.-P., Eds.; Attempto Verlag: Tübingen, 1995; pp. 61–78.
- (110) Berkhan, G.; Hahn, F. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 14240–14244.
- (111) Helmann, J. D.; Chamberlin, M. J. *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 839–872.
- (112) Rosenberg, A. H.; Lade, B. N.; Dao-shan, C.; Lin, S.-W.; Dunn, J. J.; Studier, F. W. *Gene* **1987**, *56*, 125–135.
- (113) Studier, F. W.; Moffatt, B. a. *J. Mol. Biol.* **1986**, *189*, 113–130.
- (114) Mitta, M.; Fang, L.; Inouye, M. *Mol. Microbiol.* **1997**, *26*, 321–335.
- (115) Xia, B.; Ke, H.; Jiang, W.; Inouye, M. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 6005–6011.
- (116) Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. a. *Science* **1988**, *239*, 487–491.
- (117) Breslauer, K. J.; Frank, R.; Blocker, H.; Marky, L. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, *83*, 3746–3750.
- (118) Schildkraut, C. *Biopolymers* **1965**, *3*, 195–208.
- (119) Marchler-Bauer, a.; Derbyshire, M. K.; Gonzales, N. R.; Lu, S.; Chitsaz, F.; Geer, L. Y.; Geer, R. C.; He, J.; Gwadz, M.; Hurwitz, D. I.; Lanczycki, C. J.; Lu, F.; Marchler, G. H.; Song, J. S.; Thanki, N.; Wang, Z.; Yamashita, R. a.; Zhang, D.; Zheng, C.; Bryant, S. H. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *43*, D222–D226.
- (120) Müller, M.; He, J.; Hertweck, C. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 37–39.
- (121) Piel, J.; Hertweck, C.; Shipley, P. R.; Hunt, D. M.; Newman, M. S.; Moore, B. S. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 943–955.
- (122) Hjelmeland, L. M. *Methods Enzymol.* **1990**, *182*, 253–264.

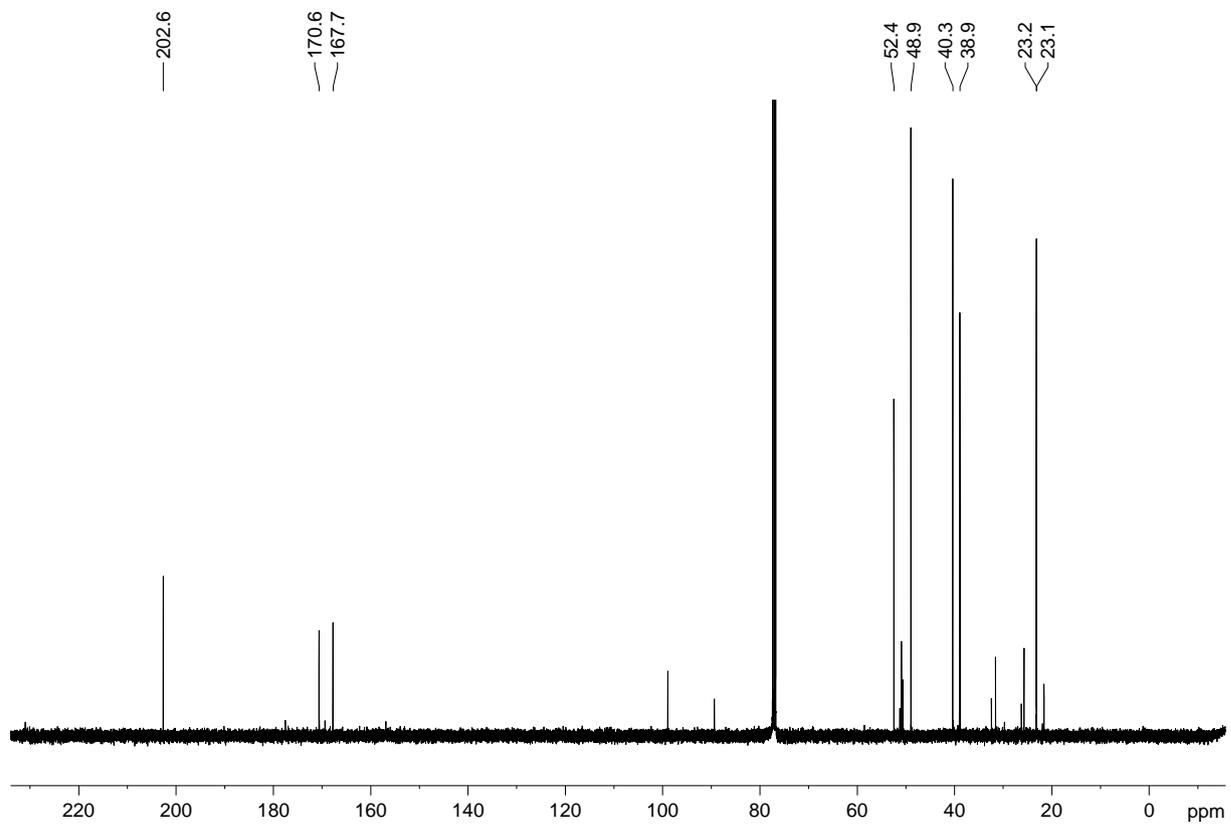
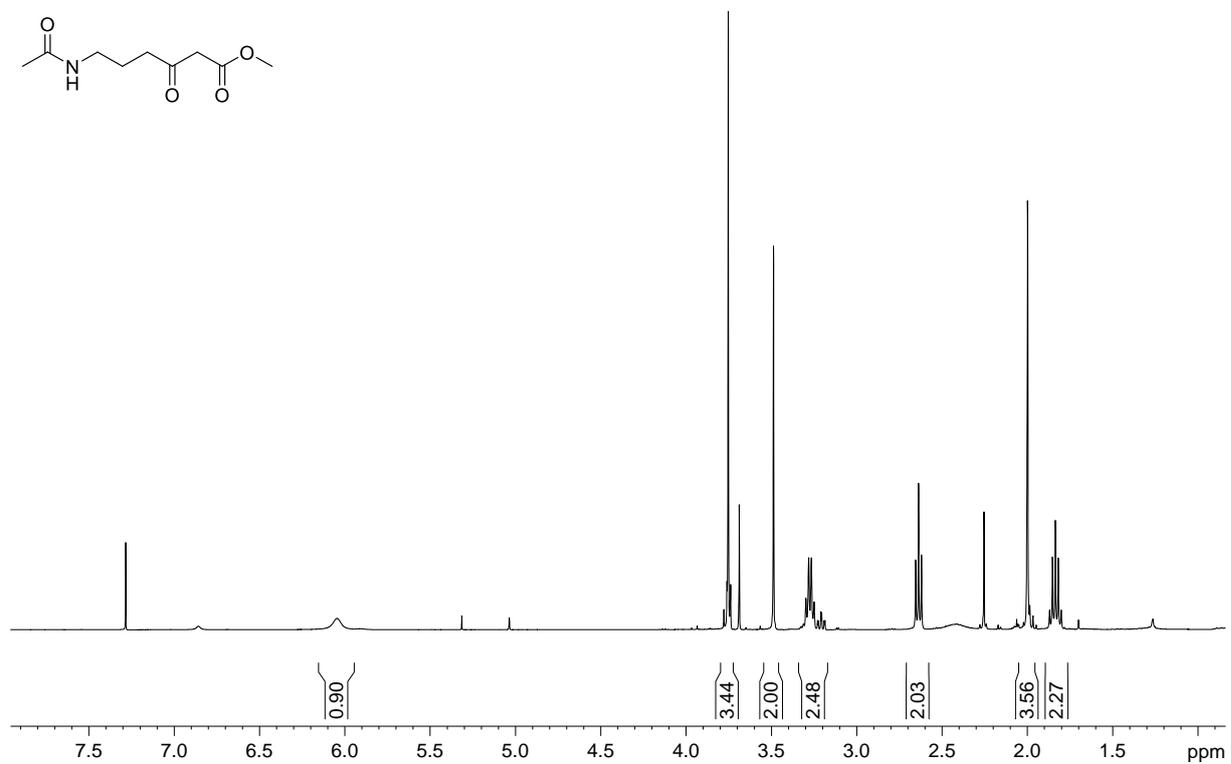
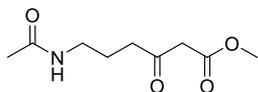
- (123) Luche, S.; Santoni, V.; Rabilloud, T. *Proteomics* **2003**, *3*, 249–253.
- (124) Murphy, J. A.; Commeureuc, A. G. J.; Snaddon, T. N.; McGuire, T. M.; Khan, T. A.; Hisler, K.; Dewis, M. L.; Carling, R. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1427–1429.
- (125) Fanjul, S.; Hulme, A. N.; White, J. W. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4219–4222.
- (126) Paterson, I. *Synthesis (Stuttg.)*. **1998**, *1998*, 639–652.
- (127) Paterson, I.; Goodman, J. M.; Isaka, M. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 7121–7124.
- (128) Brown, H. C.; Dhar, R. K.; Bakshi, R. K.; Pandiarajan, P. K.; Singaram, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3441–3442.
- (129) Zimmerman, H. E.; Traxler, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 1920–1923.
- (130) Bode, M. L.; Gates, P. J.; Gebretnsae, S. Y.; Vleggaar, R. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 2026–2036.
- (131) Blakemore, P. R.; Cole, W. J.; Kocieński, P. J.; Morley, A. *Synlett* **1998**, *1998*, 26–28.
- (132) Pospíšil, J. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2348–2352.
- (133) Dess, D. B.; Martin, J. C. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155–4156.
- (134) Frigerio, M.; Santagostino, M.; Sputore, S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537–4538.
- (135) Hanessian, S.; Focken, T.; Oza, R. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3172–3175.
- (136) Pospíšil, J.; Markó, I. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3516–3517.
- (137) Pagenkopf, B. L.; Krüger, J.; Carreira, E. M. *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3312–3314.
- (138) Krüger, J.; Carreira, E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 837–838.
- (139) Bacardit, R.; Moreno-Mañas, M. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 551–554.
- (140) Bacardit, R.; Moreno-Mañas, M. *J. Chem. Ecol.* **1983**, *9*, 703–714.
- (141) Lindner, F. *Masterarbeit: Synthese von potentiellen Intermediaten der Jerangolid-Biosynthese*, Leibniz Universität Hannover, **2014**.
- (142) Rentsch, A.; Kalesse, M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 11381–11384.

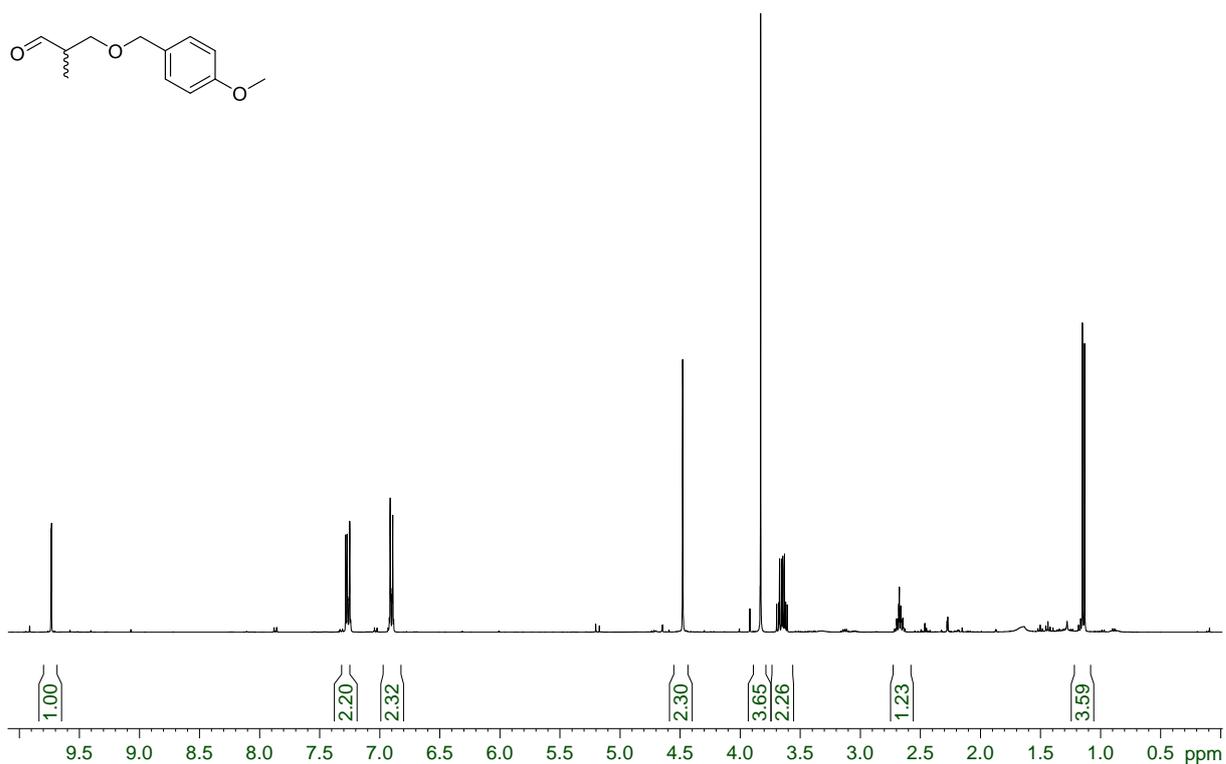
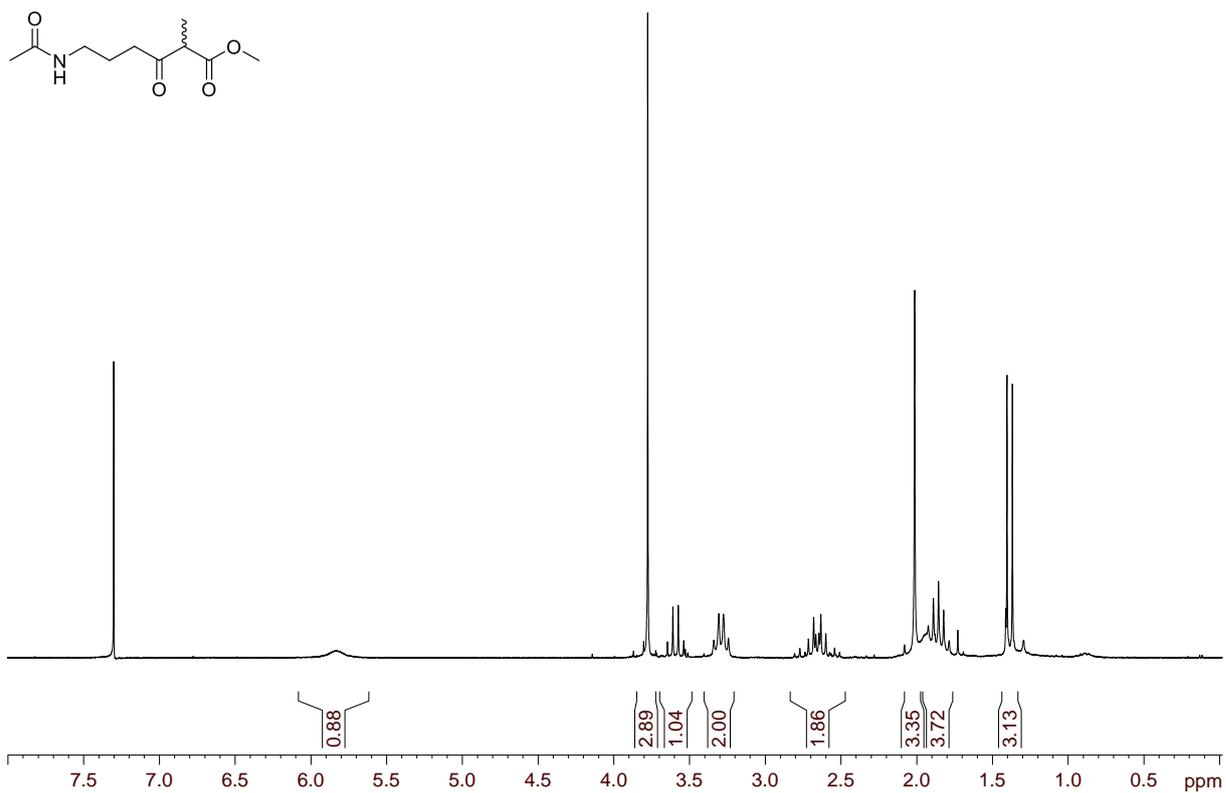
- (143) Hoffmann, T. *Bachelorarbeit: Synthese geeigneter Vorläufer für die Untersuchung von Enzymen der Jerangolid A Biosynthese*, Leibniz Universität Hannover, **2014**.
- (144) De Rosa, M.; Acocella, M. R.; Villano, R.; Soriente, A.; Scettri, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2499–2502.
- (145) De Rosa, M.; Acocella, M. R.; Rega, M. F.; Scettri, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3029–3033.
- (146) Singer, R. a; Carreira, E. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12360–12361.
- (147) Clemens, R. J.; Hyatt, J. a. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2431–2435.
- (148) Huckin, S. N.; Weiler, L. *Tetrahedron Lett.* **1971**, *12*, 4835–4838.
- (149) Weiler, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6702–6704.
- (150) Clarke, P. a; Martin, W. H. C.; Hargreaves, J. M.; Wilson, C.; Blake, A. J. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3551–3563.
- (151) Nawrat, C. C.; Lewis, W.; Moody, C. J. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7872–7881.
- (152) Prantz, K.; Mulzer, J. *Chem.--Eur. J.* **2010**, *16*, 485–506.
- (153) Lokot', I. P.; Pashkovskii, F. S.; Lakhvich, F. A. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2001**, *37*, 768–775.
- (154) Singh, S.; Nandurkar, N. S.; Thorson, J. S. *Chembiochem* **2014**, *15*, 1418–1421.
- (155) Li, S.; Anzai, Y.; Kinoshita, K.; Kato, F.; Sherman, D. H. *Chembiochem* **2009**, *10*, 1297–1301.
- (156) Julien, B.; Shah, S.; Ziermann, R.; Goldman, R.; Katz, L.; Khosla, C. *Gene* **2000**, *249*, 153–160.
- (157) Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (158) Tosin, M.; Betancor, L.; Stephens, E.; Li, W. M. A.; Spencer, J. B.; Leadlay, P. F. *Chembiochem* **2010**, *11*, 539–546.
- (159) Paterson, I.; Donghi, M.; Gerlach, K. *Angew. Chem.* **2000**, *39*, 3315–3319.
- (160) Smith, N. D.; Kocienski, P. J.; Street, S. D. A. *Synthesis (Stuttg).* **1996**, *1996*, 652–666.
- (161) Angle, S. R.; Choi, I.; Tham, F. S. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6268–6278.

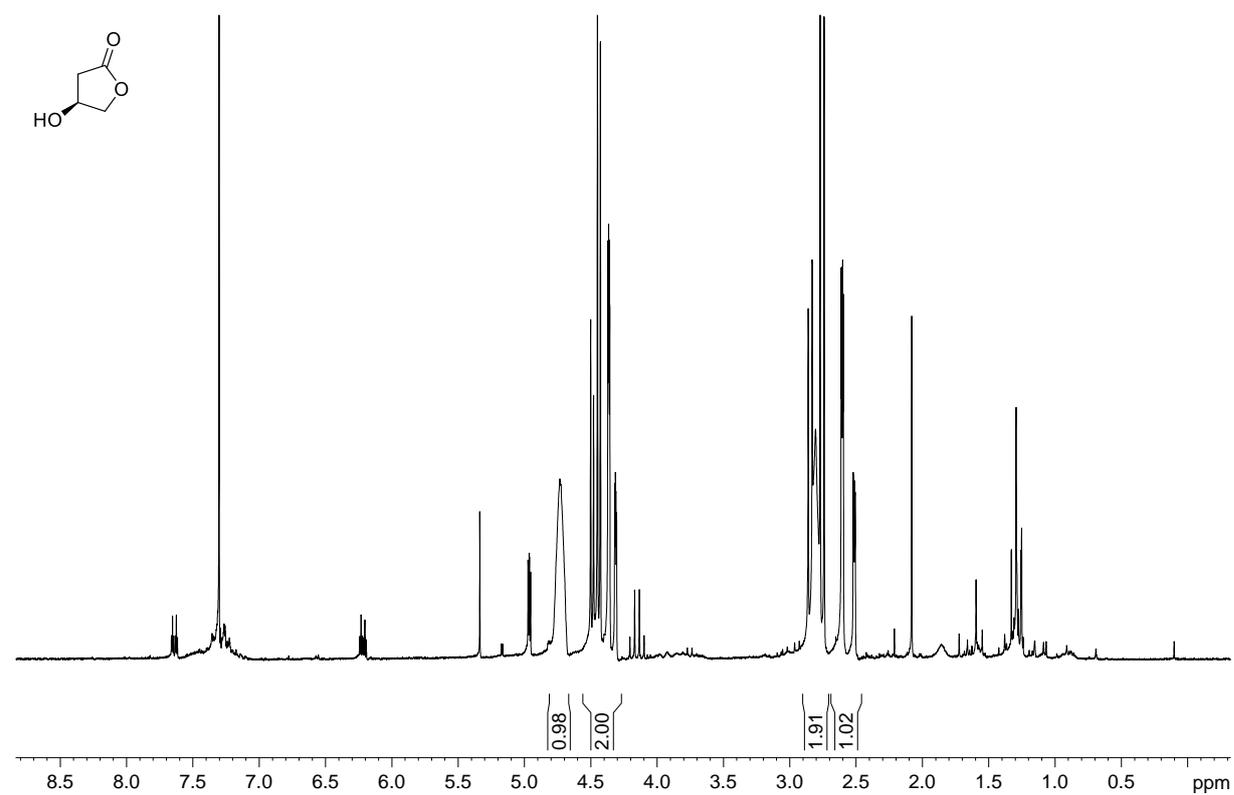
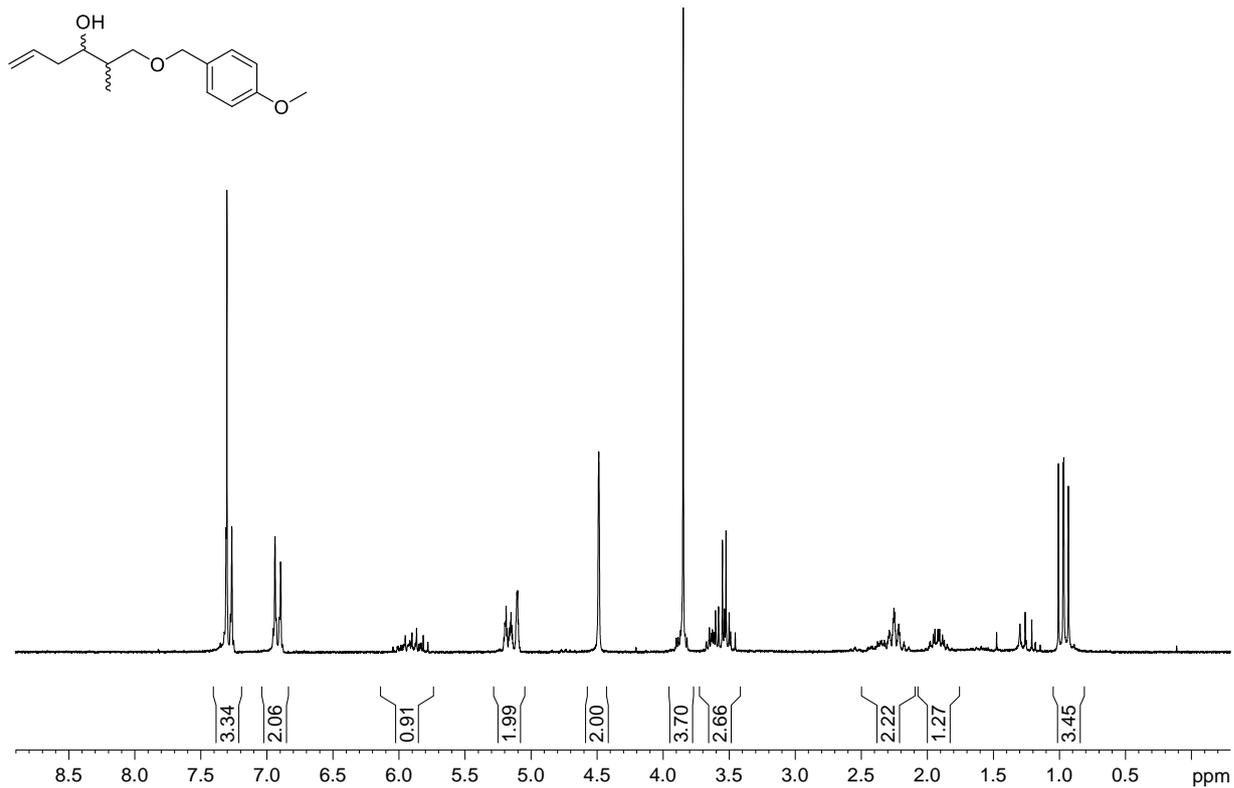
- (162) Zhu, H.; Cui, K.; Wang, L.; Gou, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4936–4943.
- (163) DiBlasi, C. M.; Macks, D. E.; Tan, D. S. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1777–1780.
- (164) Danheiser, R. L.; Nowick, J. S. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1176–1185.
- (165) Hughes, A. J.; Keatinge-Clay, A. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 165–176.
- (166) Prasad, G.; Amoroso, J. W.; Borketey, L. S.; Schnarr, N. A. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 1992.
- (167) Lee, M.; Kim, D. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 913–922.
- (168) Ratjen, L.; García-García, P.; Lay, F.; Beck, M. E.; List, B. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, *50*, 754–758.

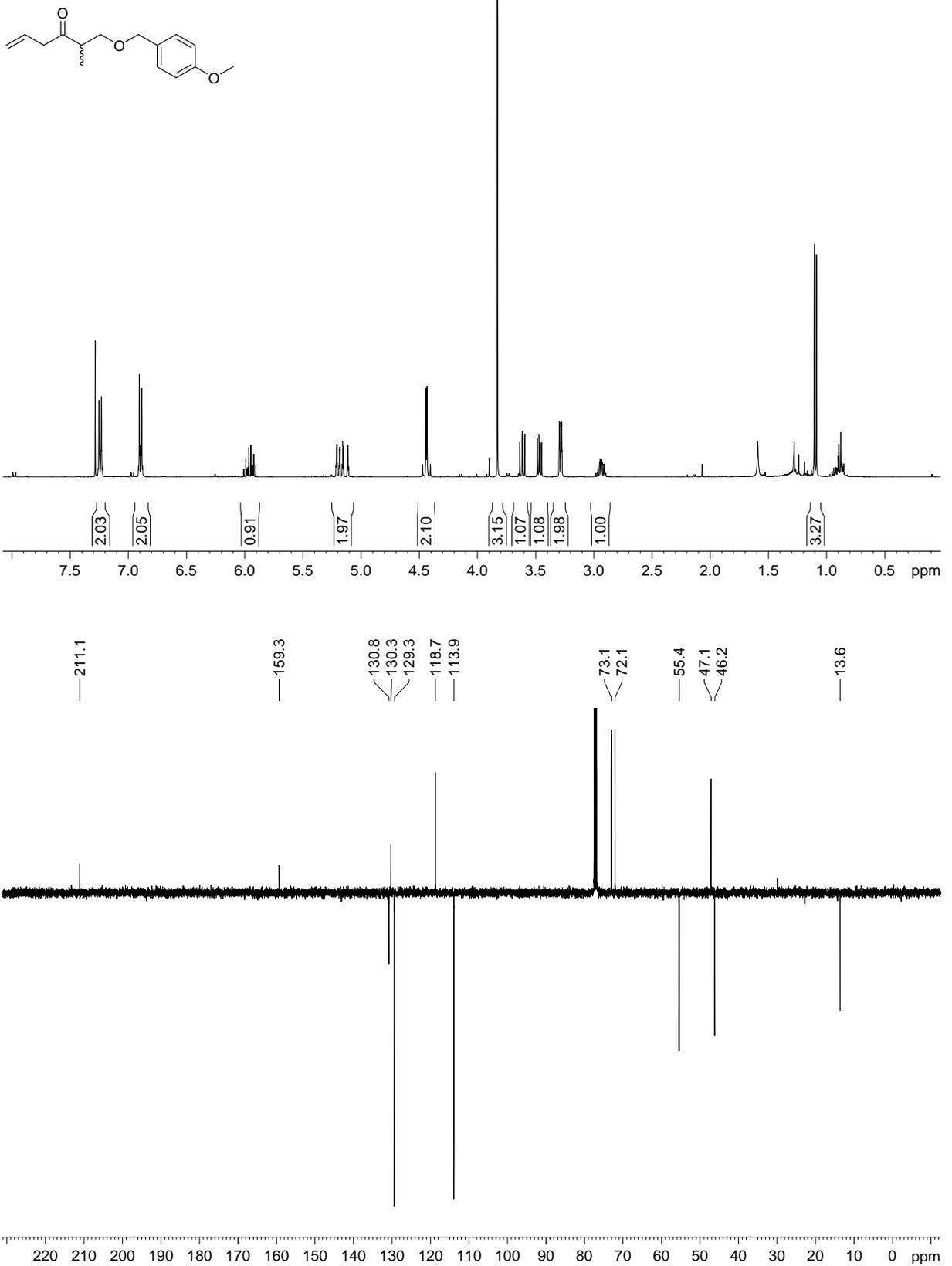
7. Anhang

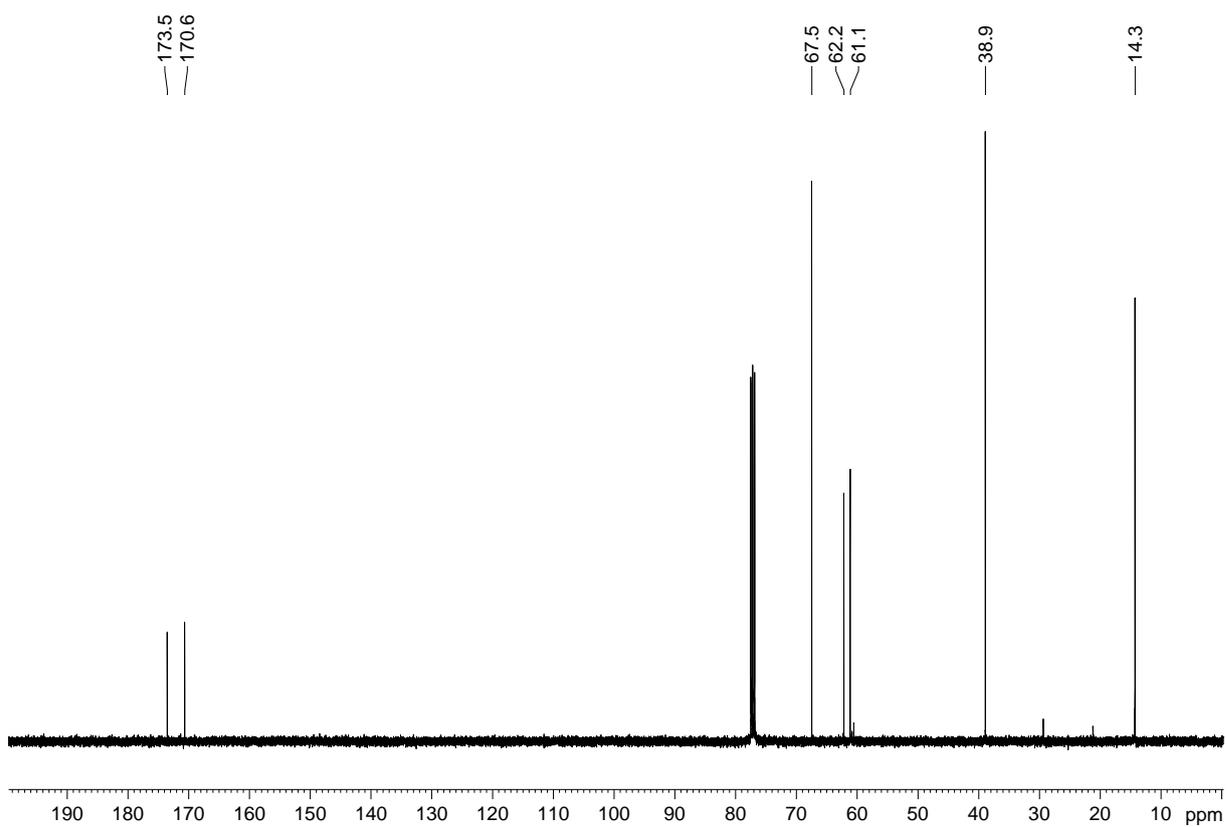
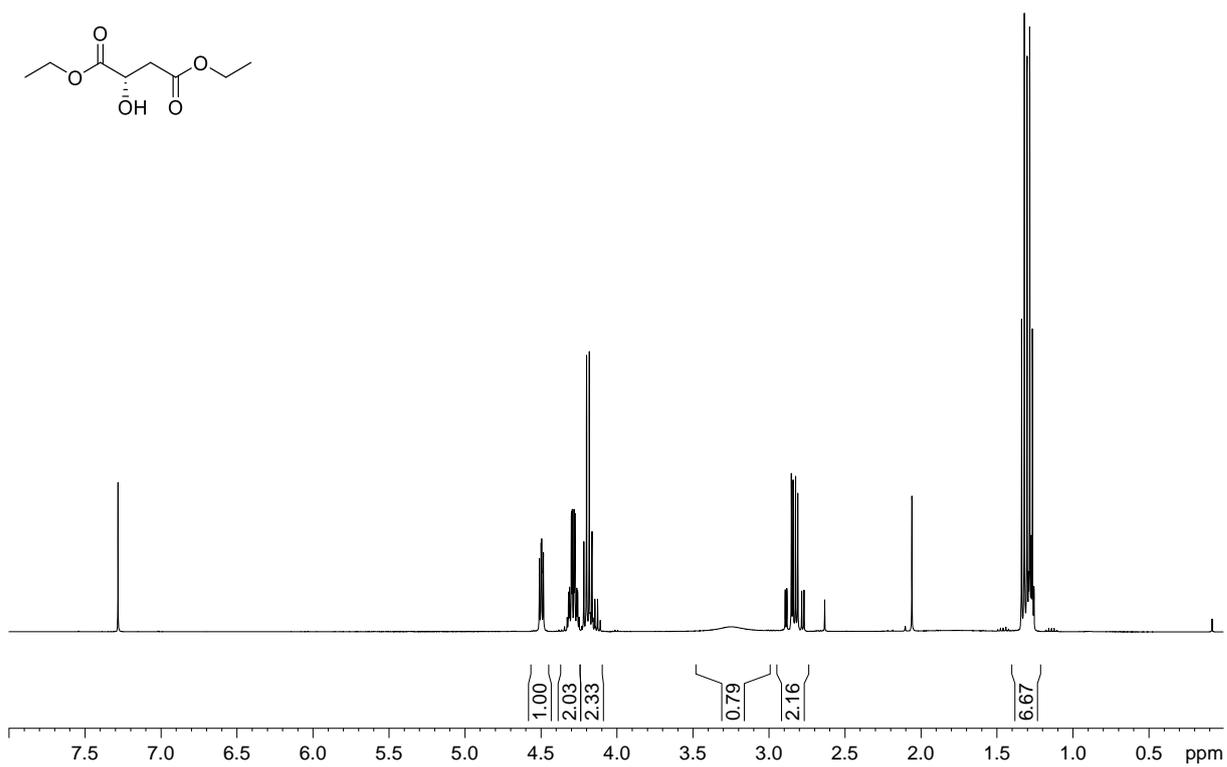
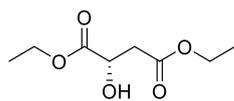
7.1 Spektrenanhang

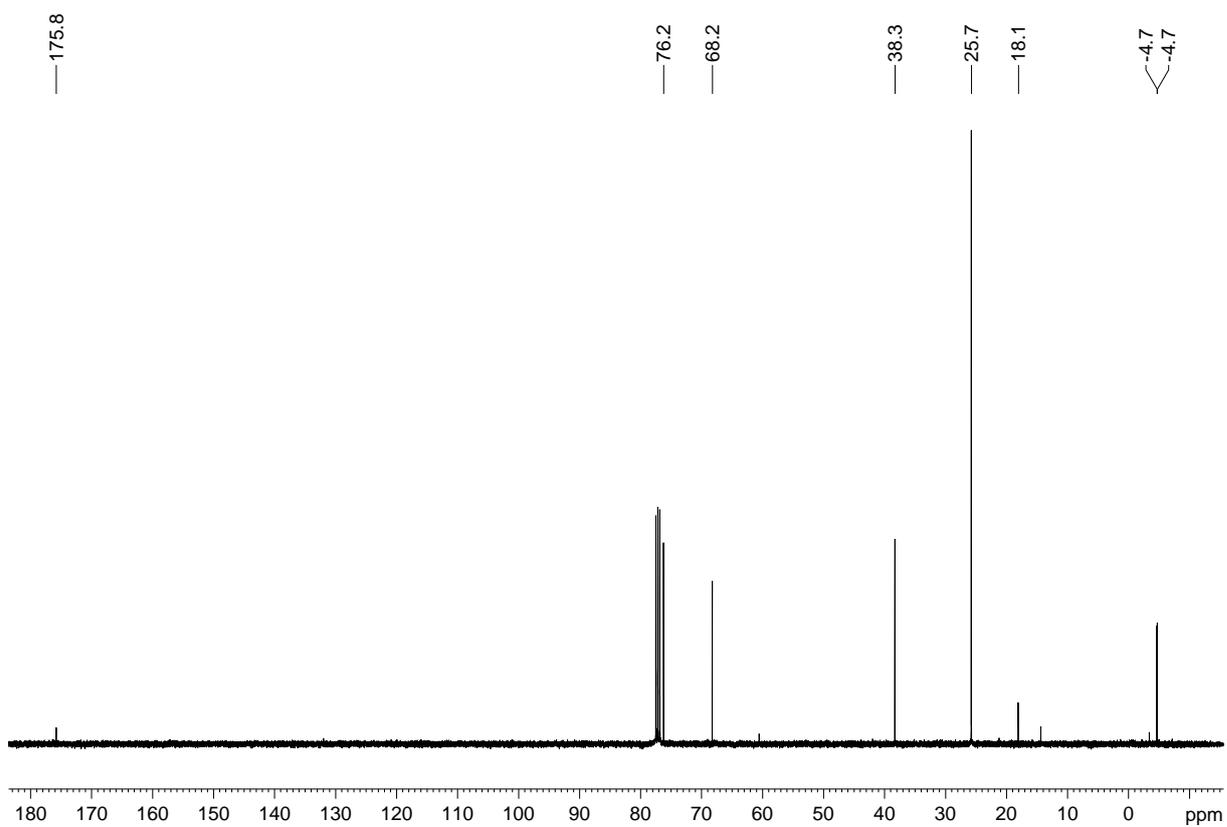
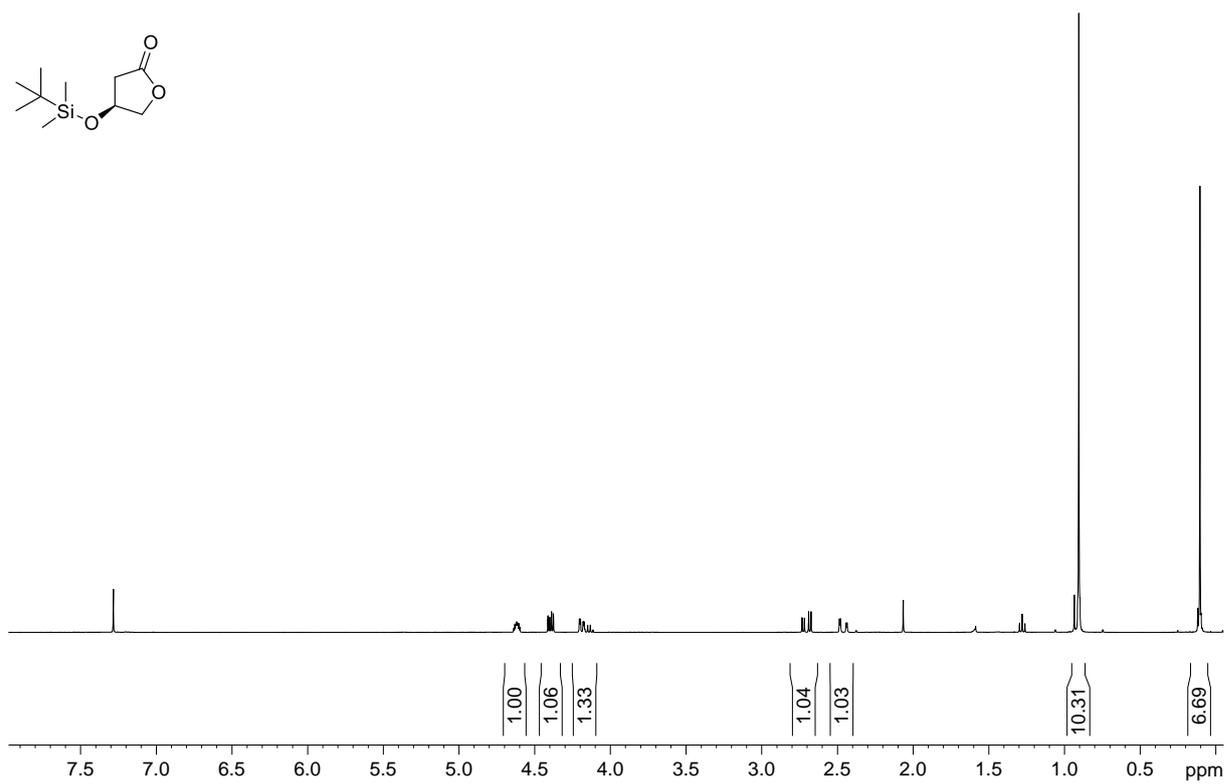
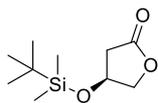


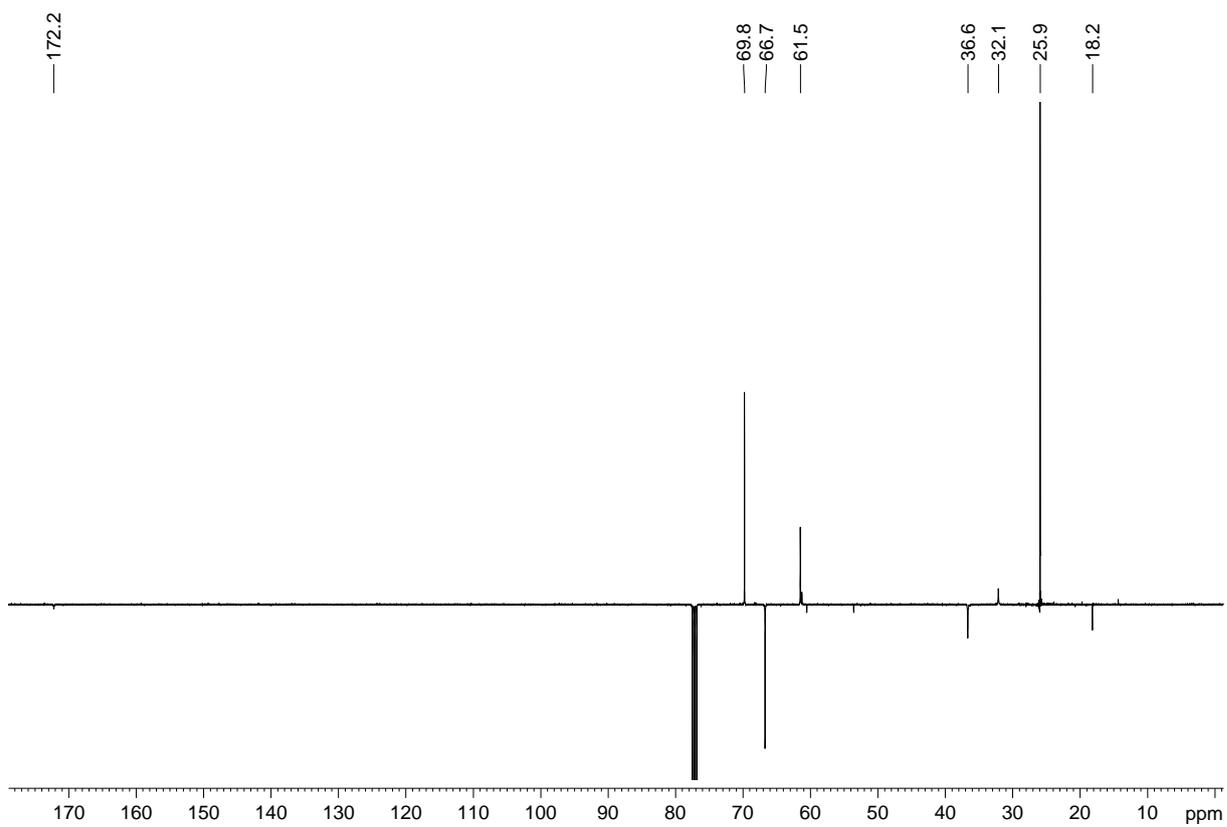
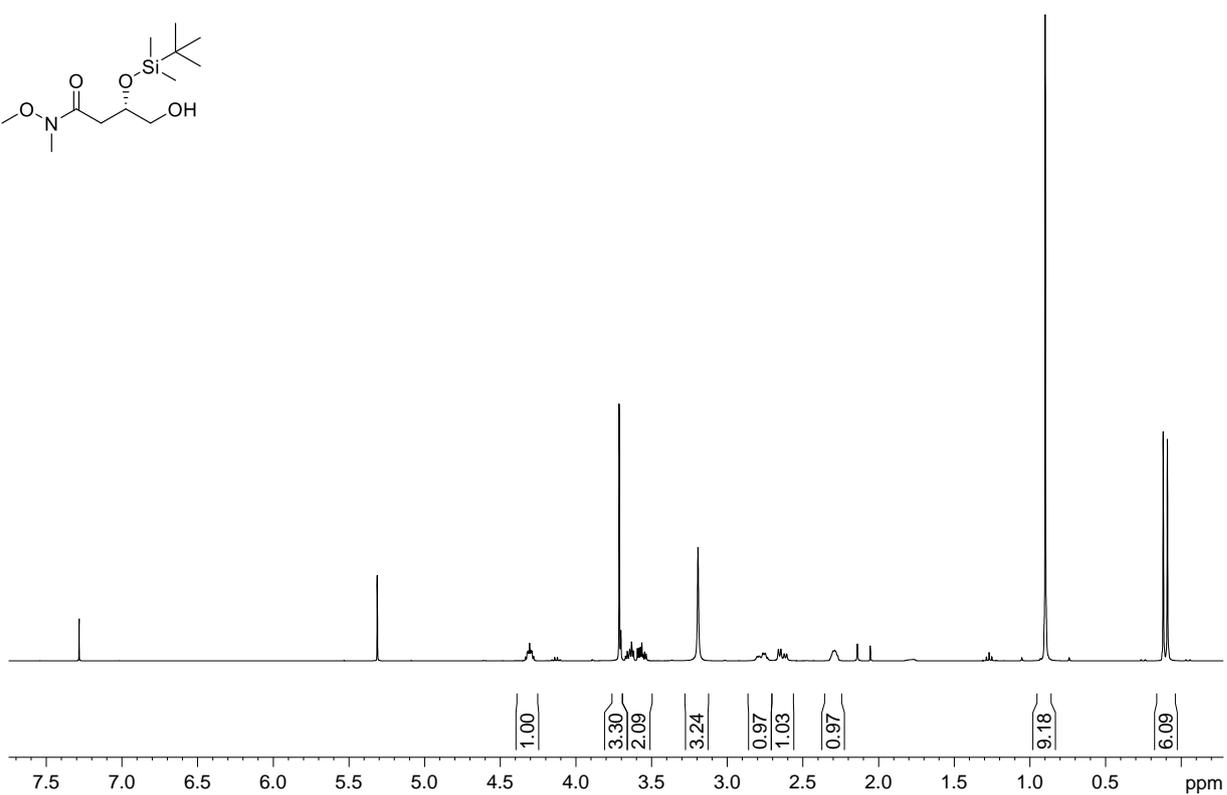
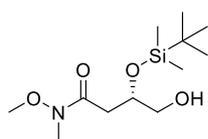


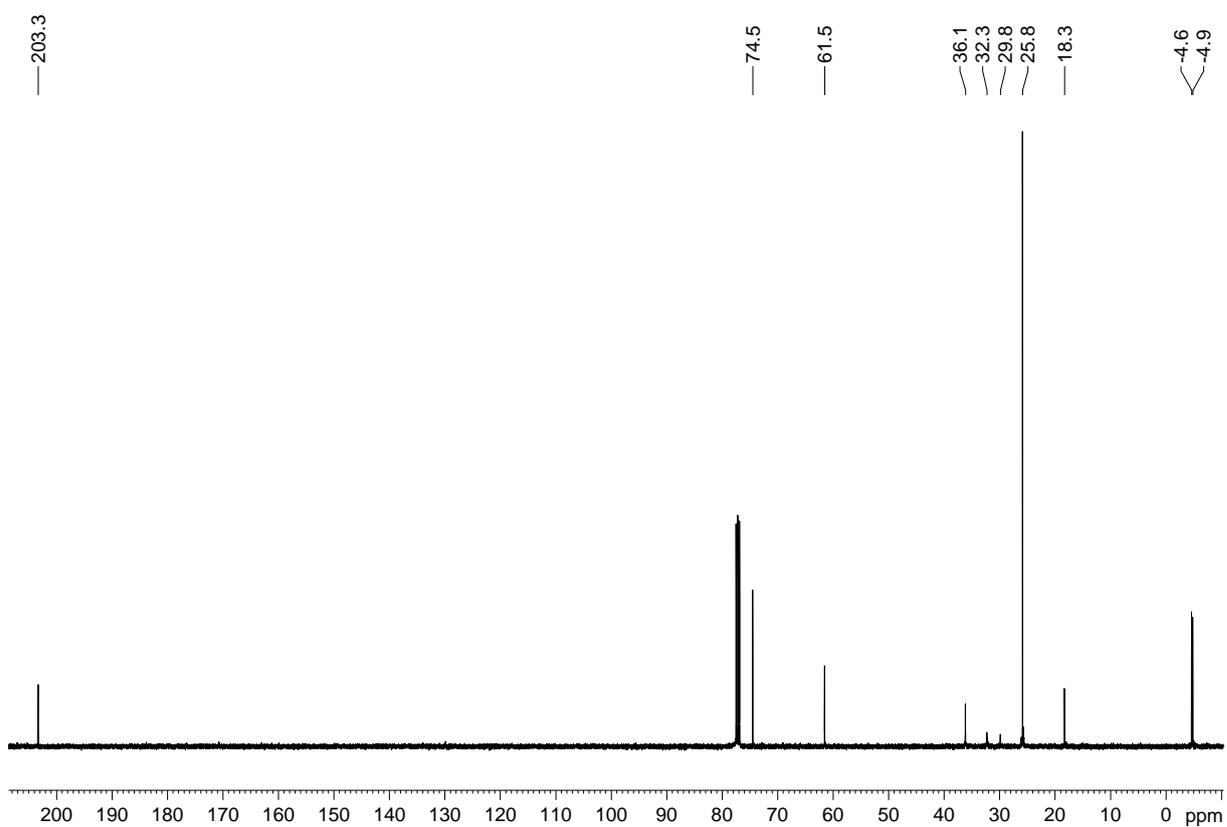
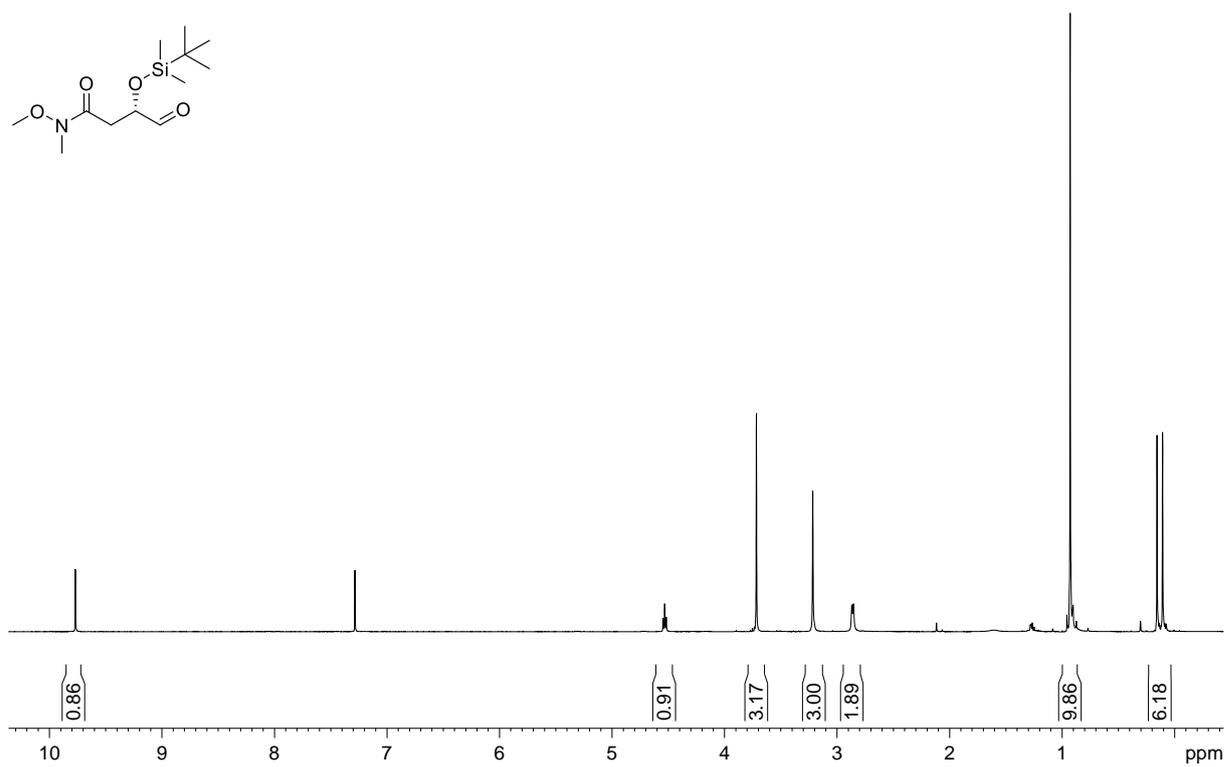
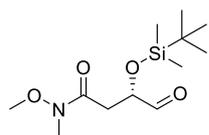


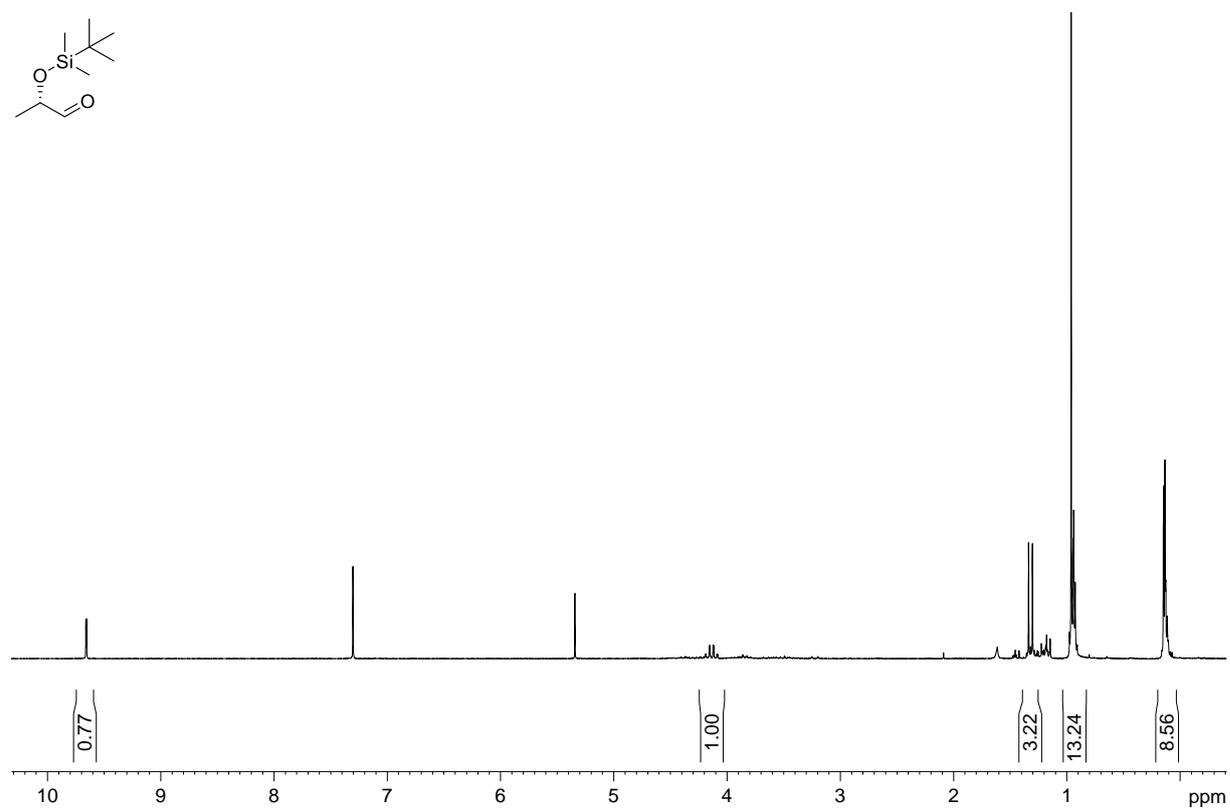
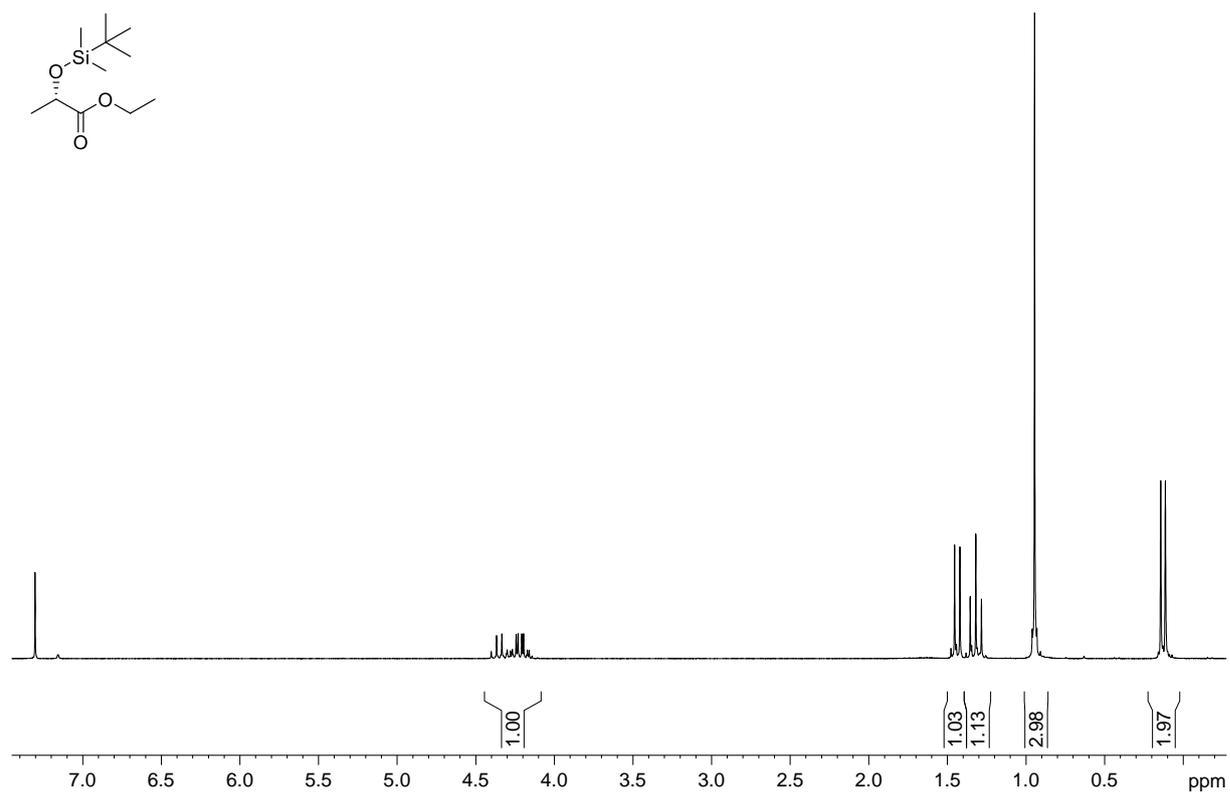


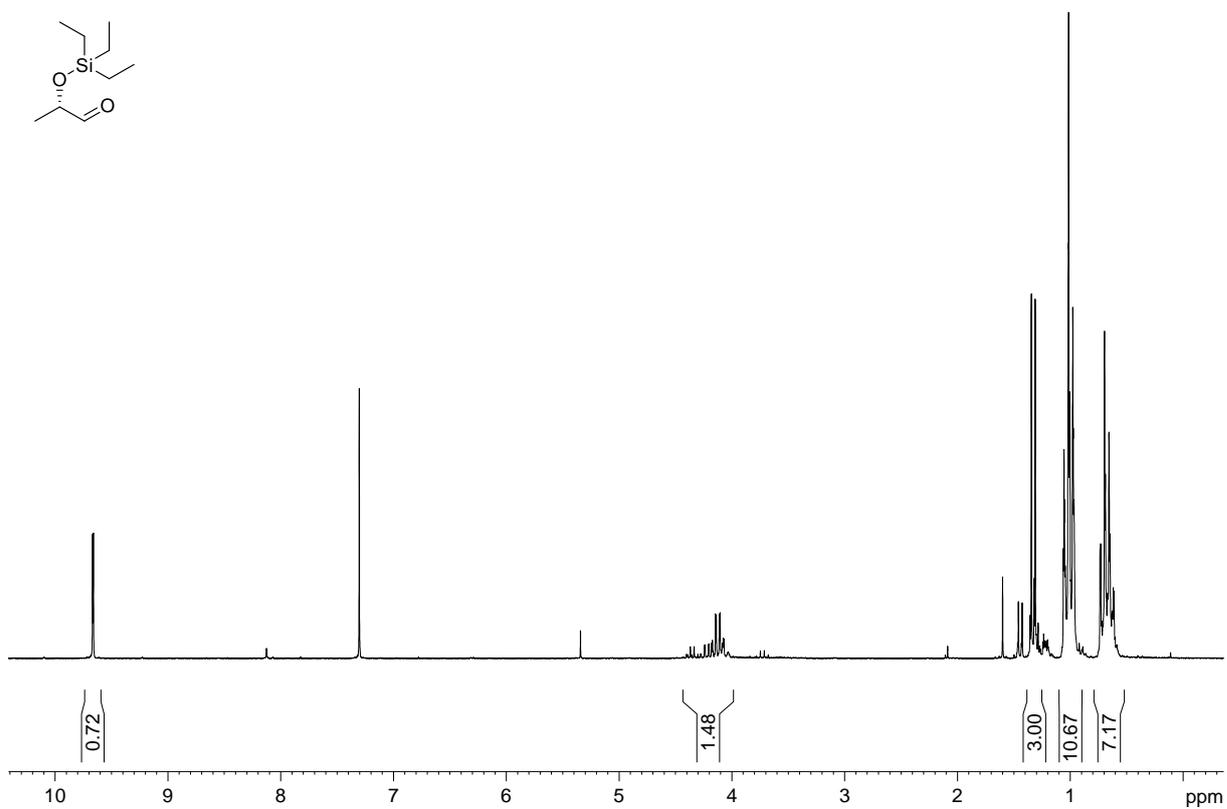
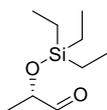
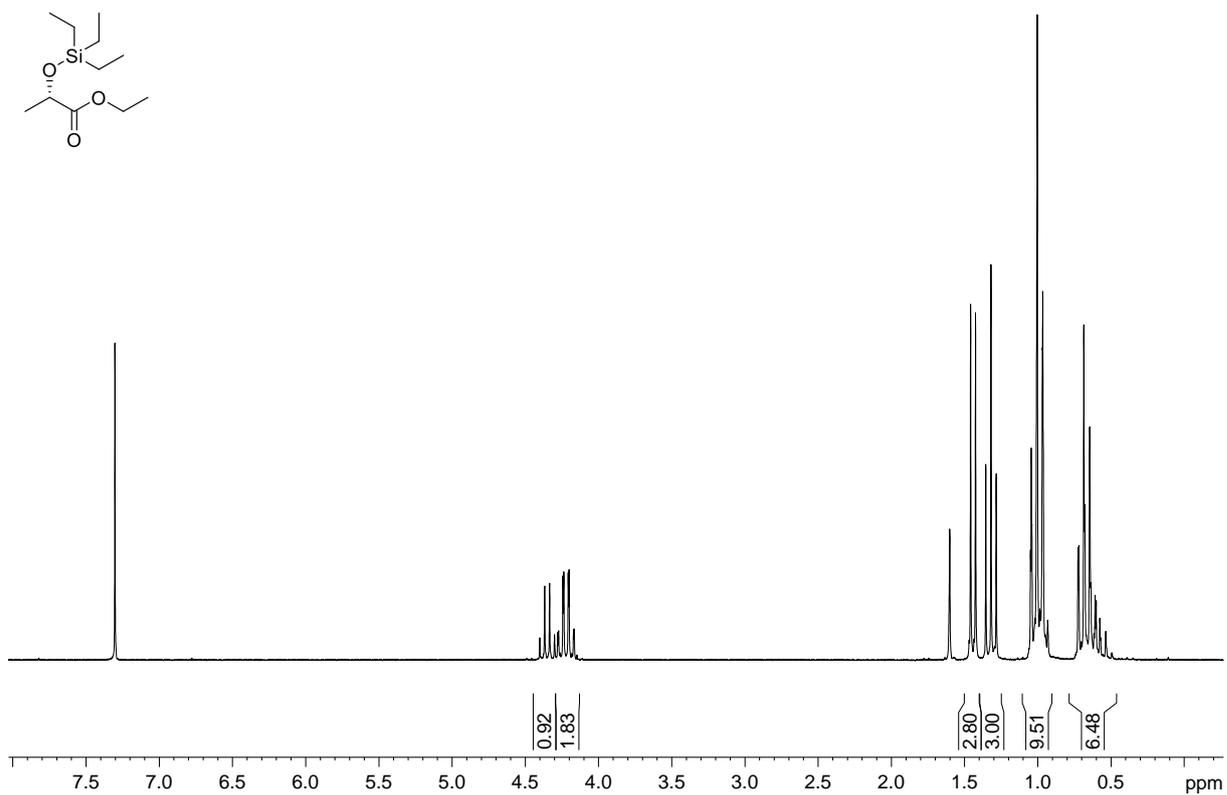
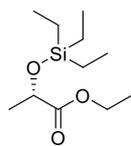


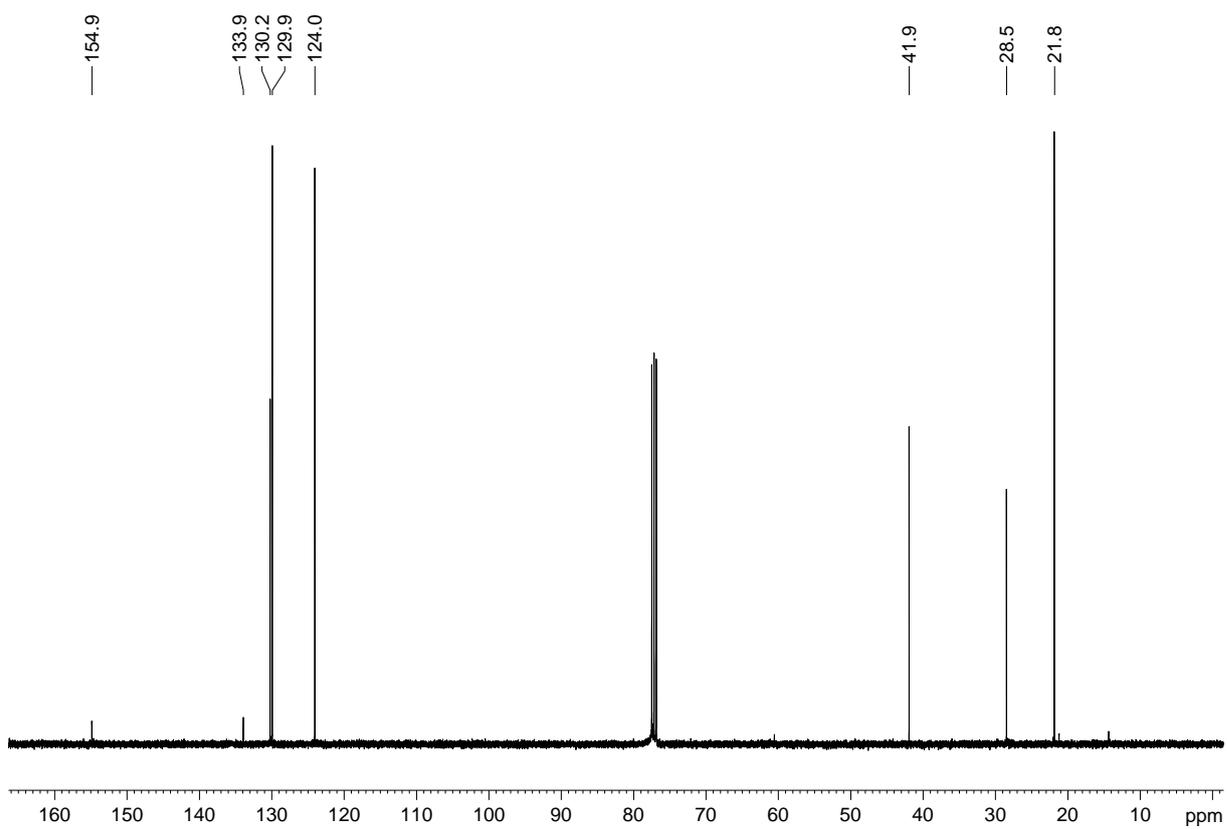
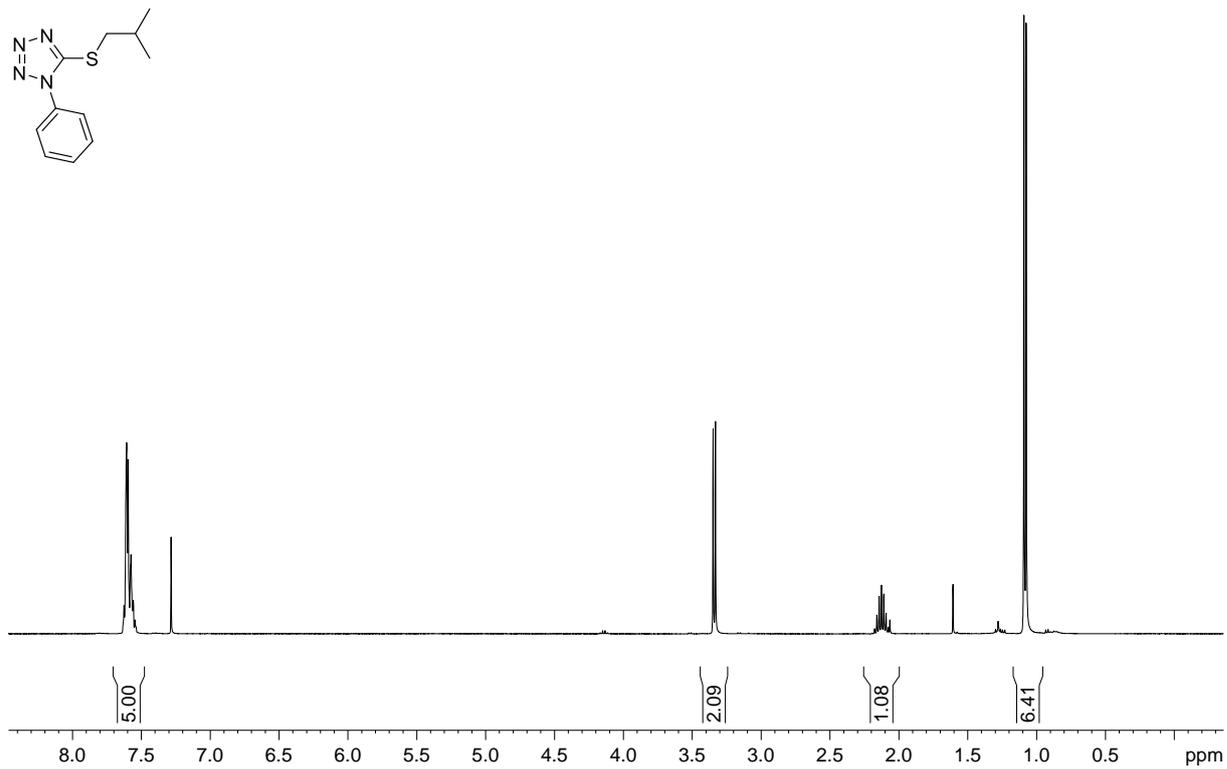
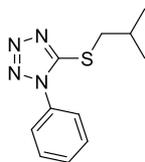


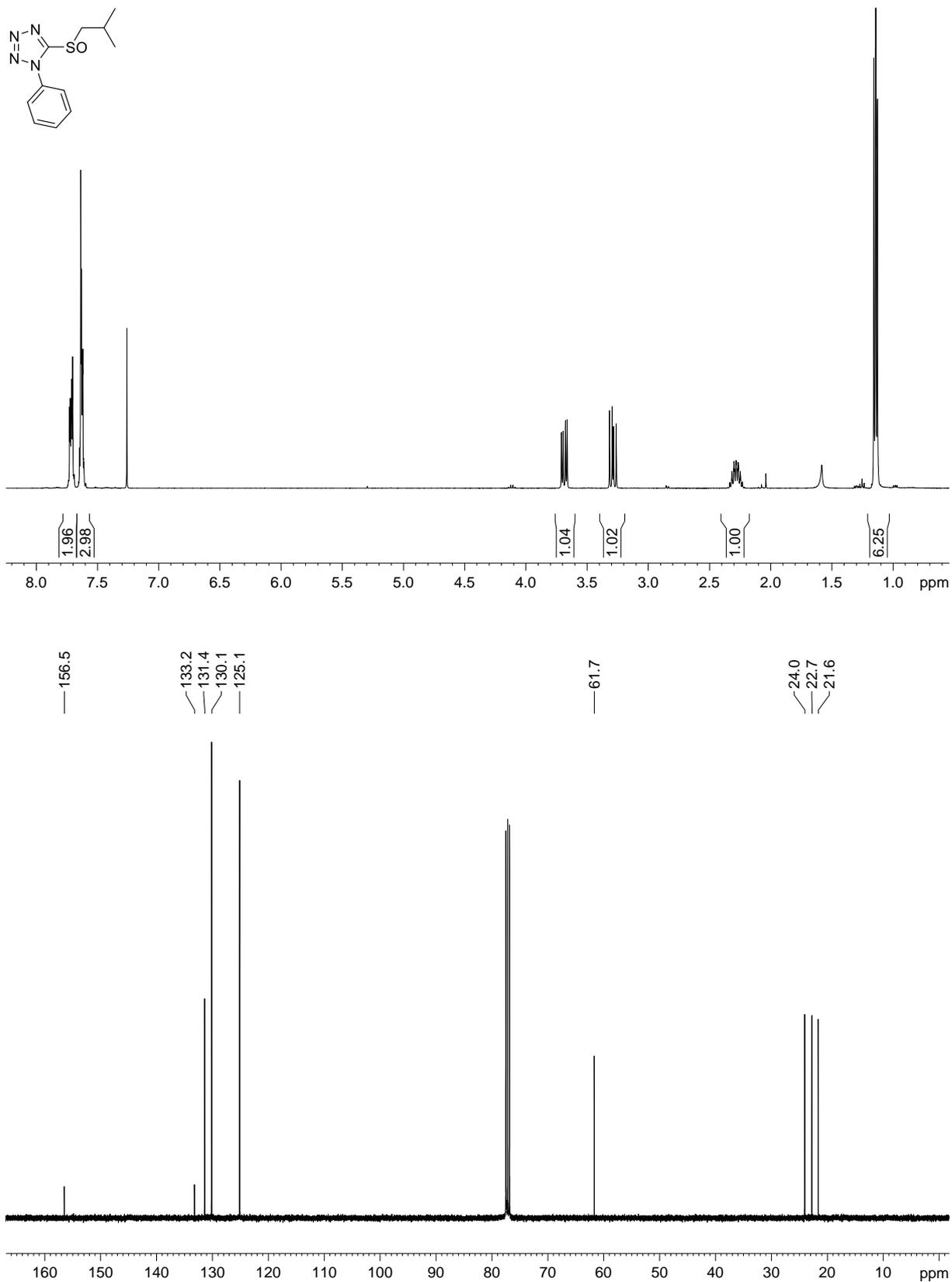


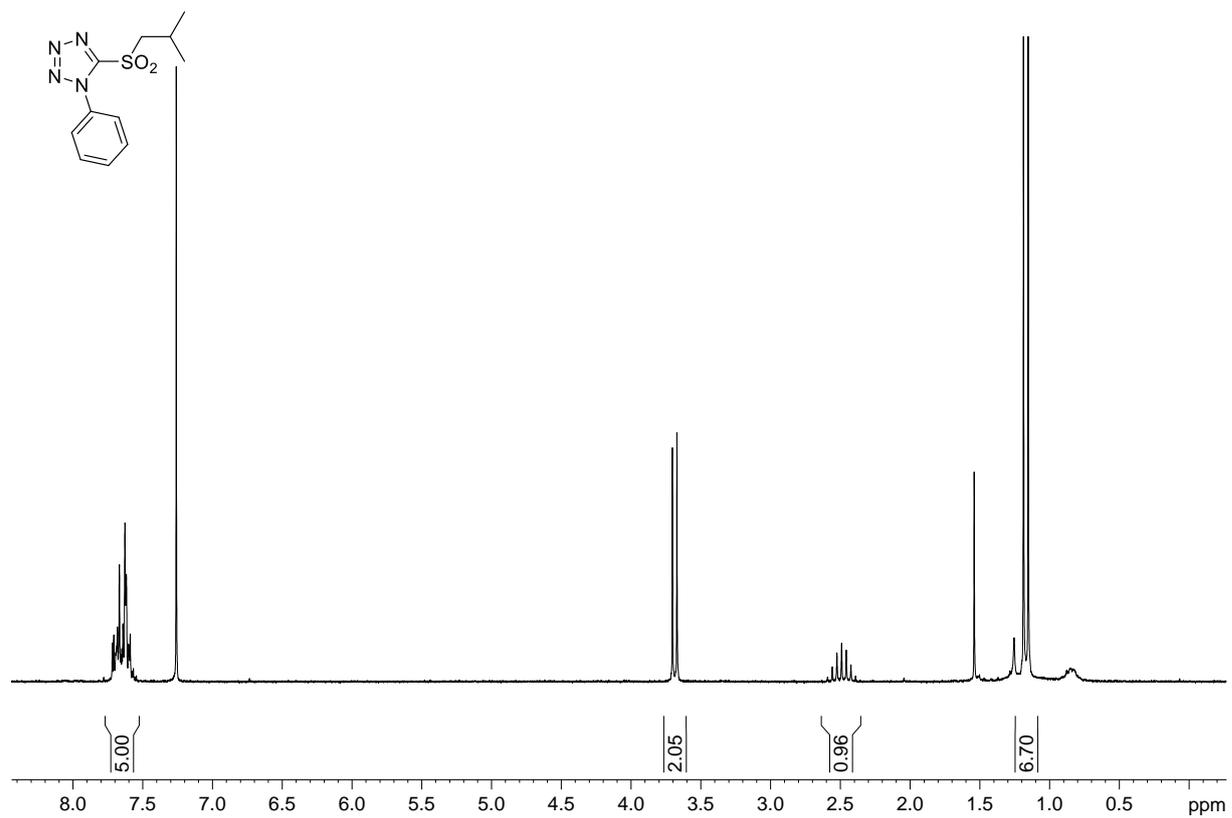


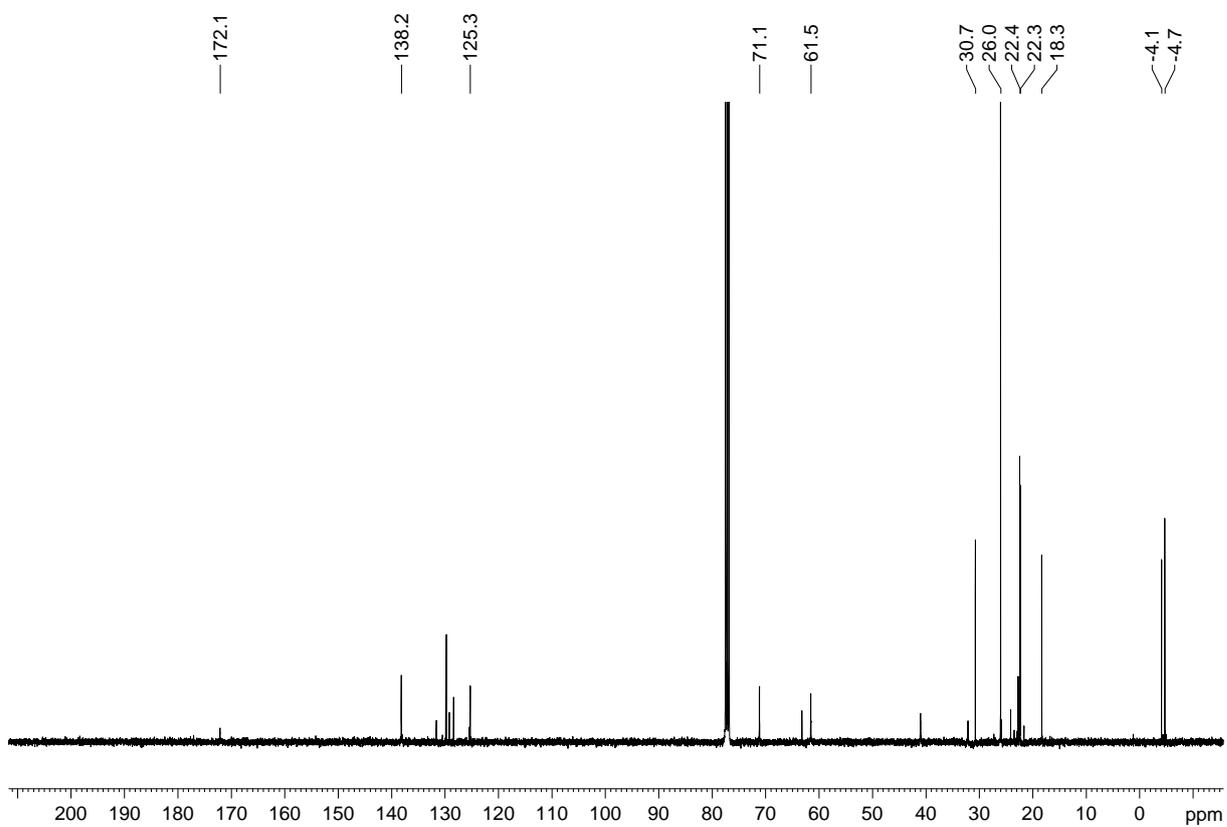
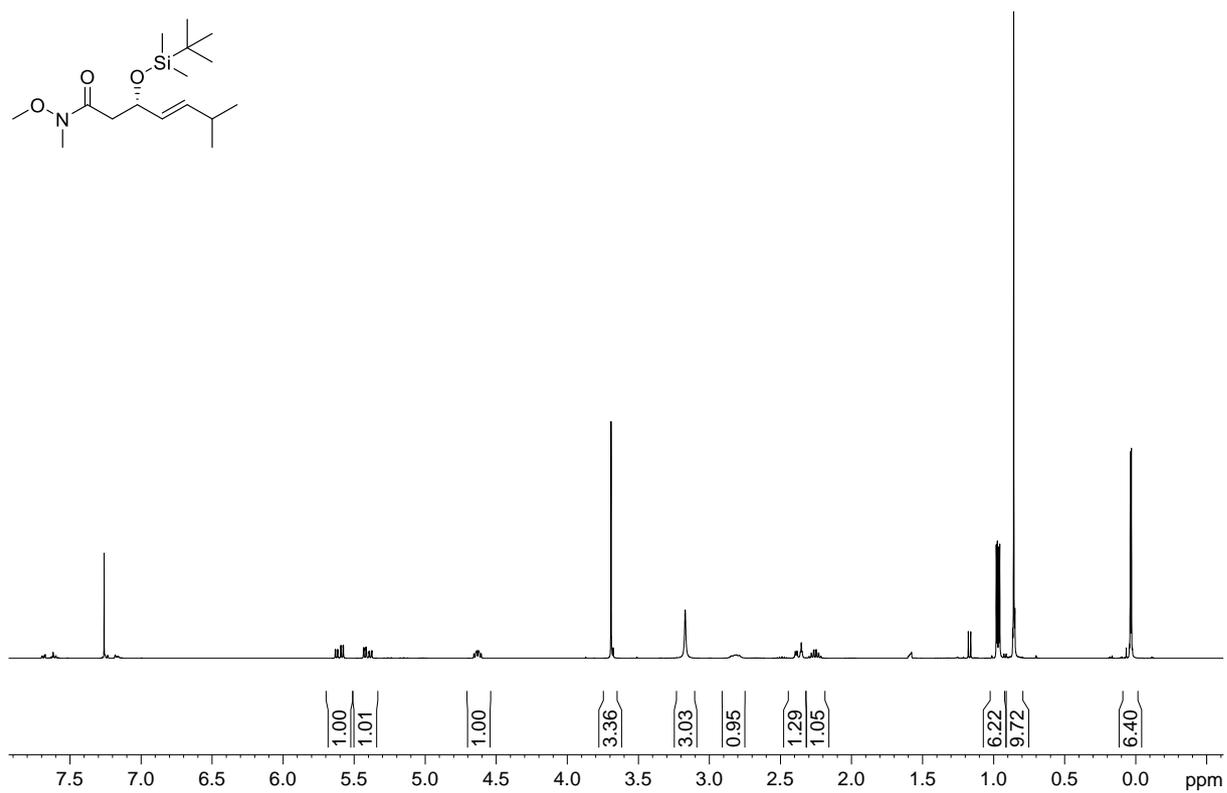
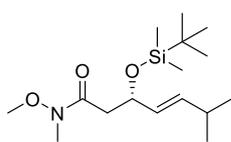


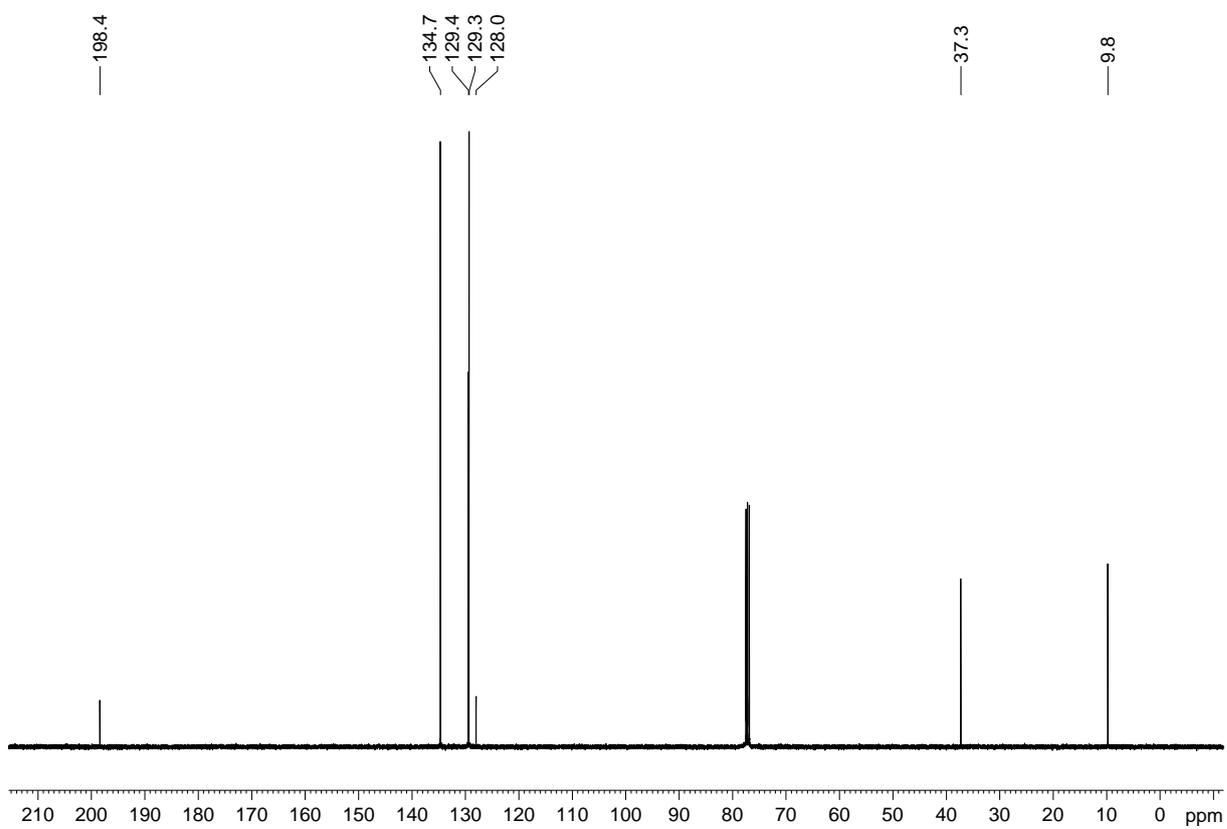
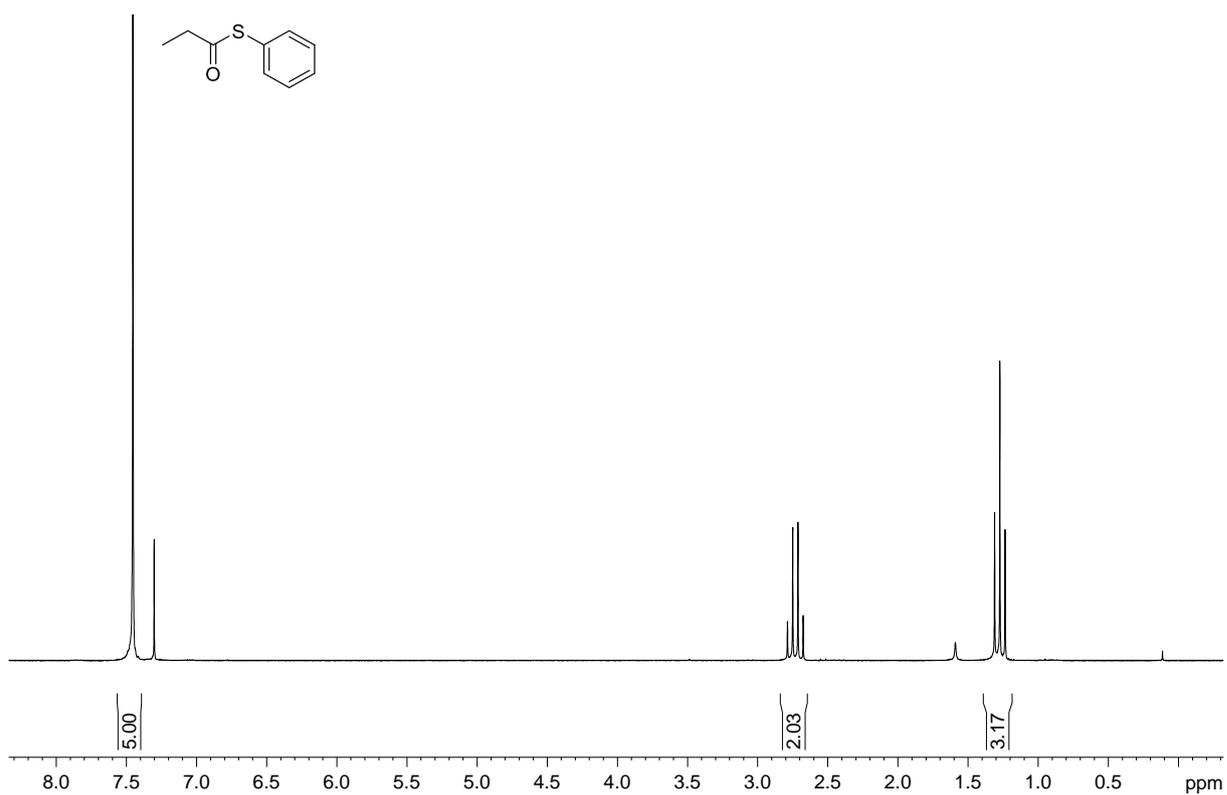


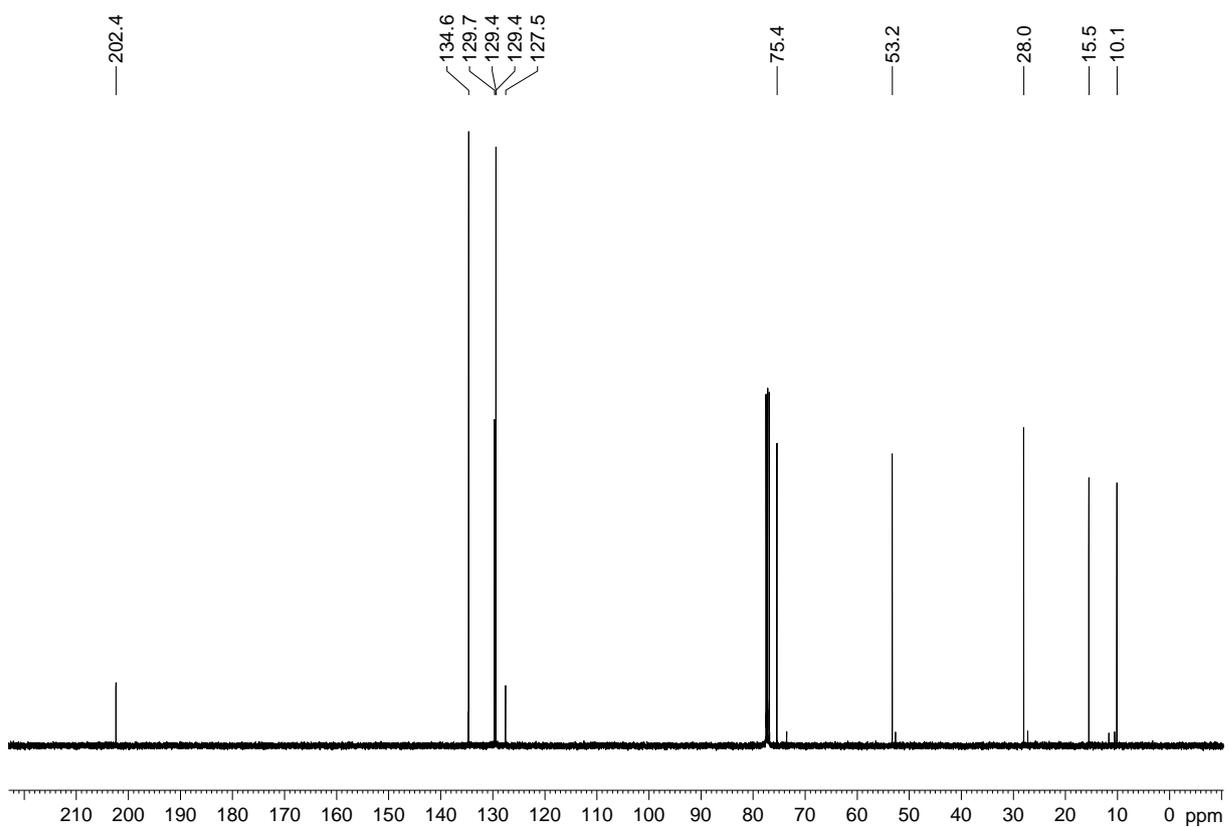
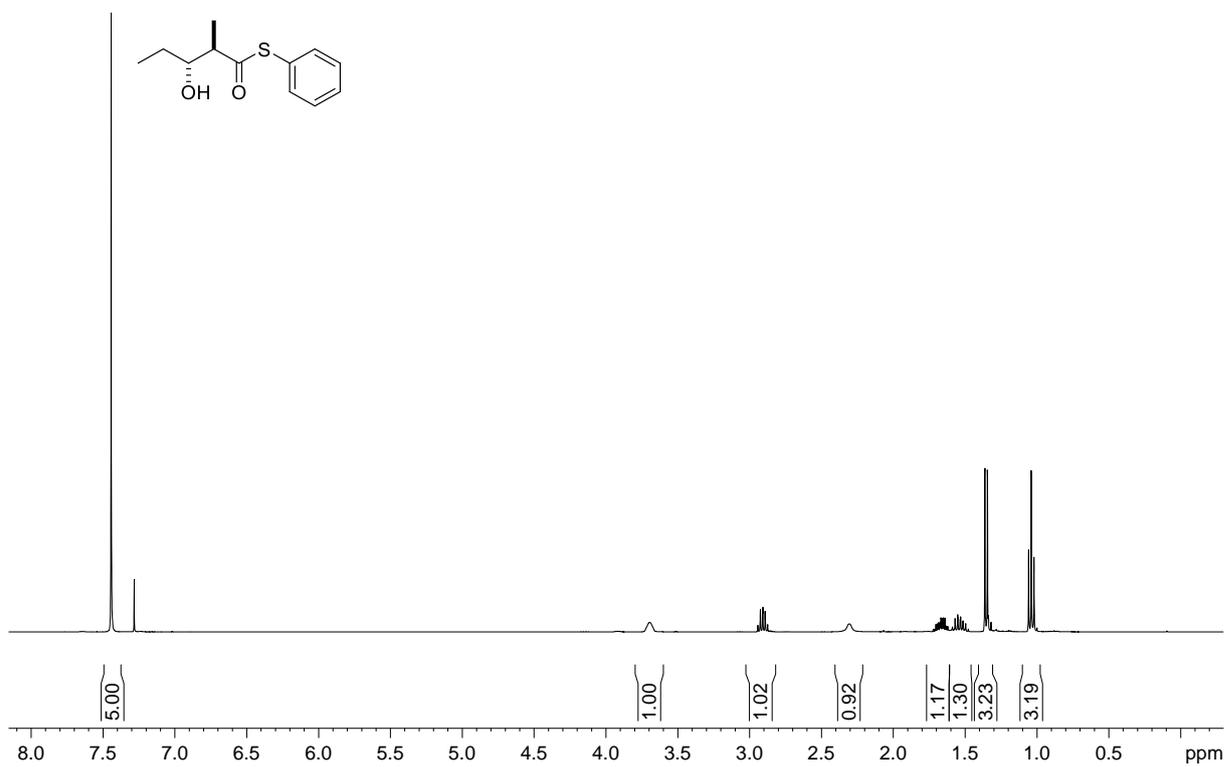


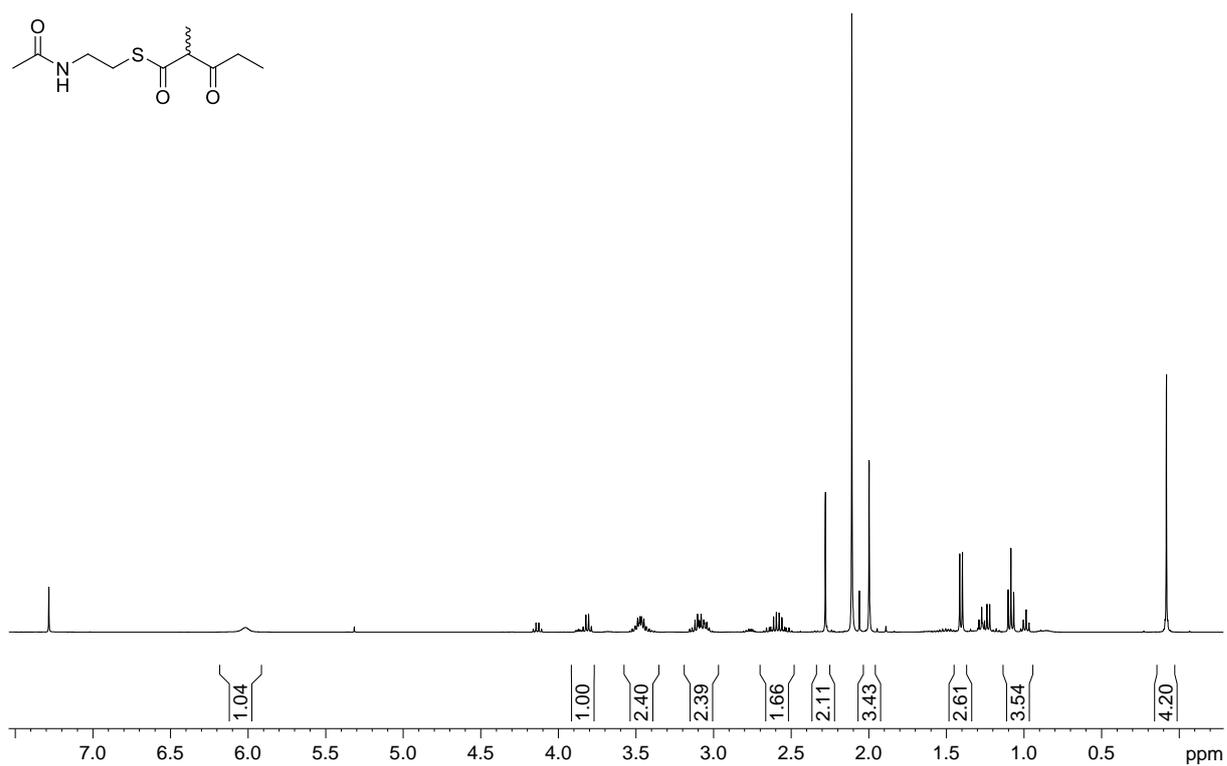
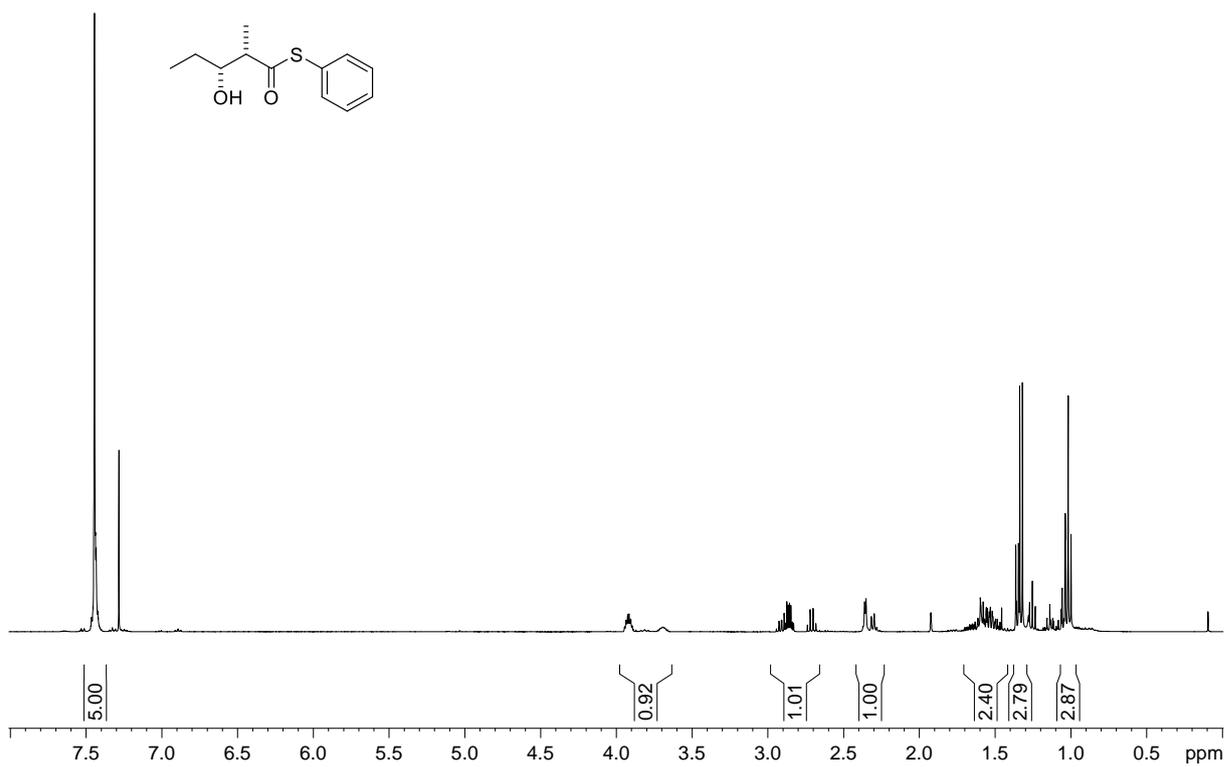


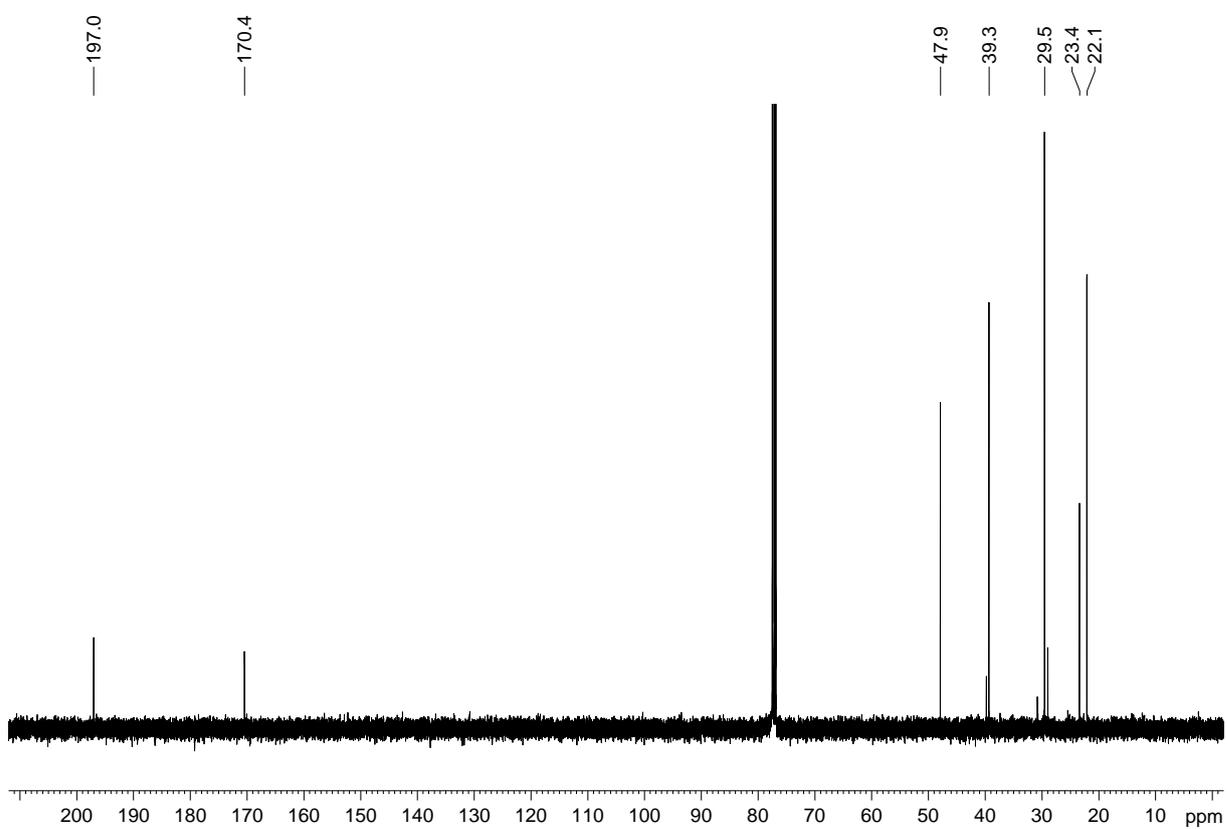
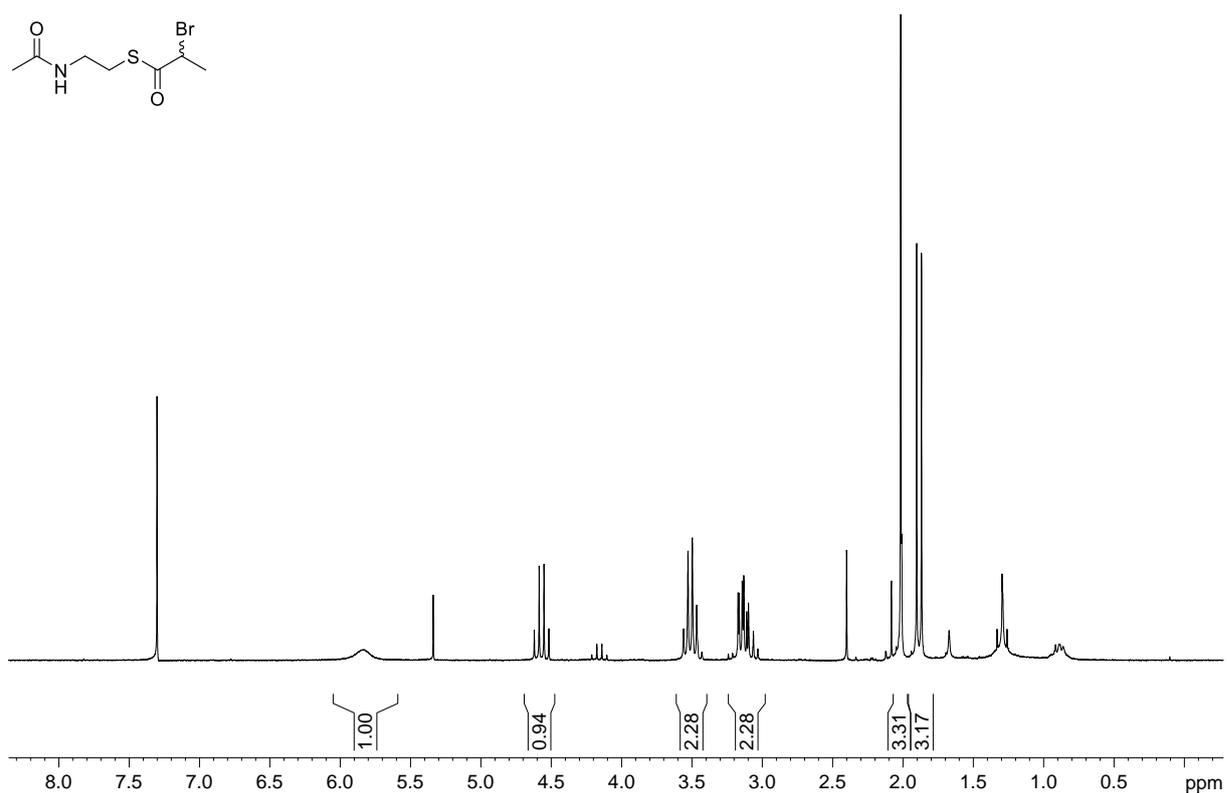
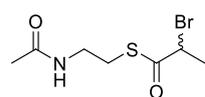


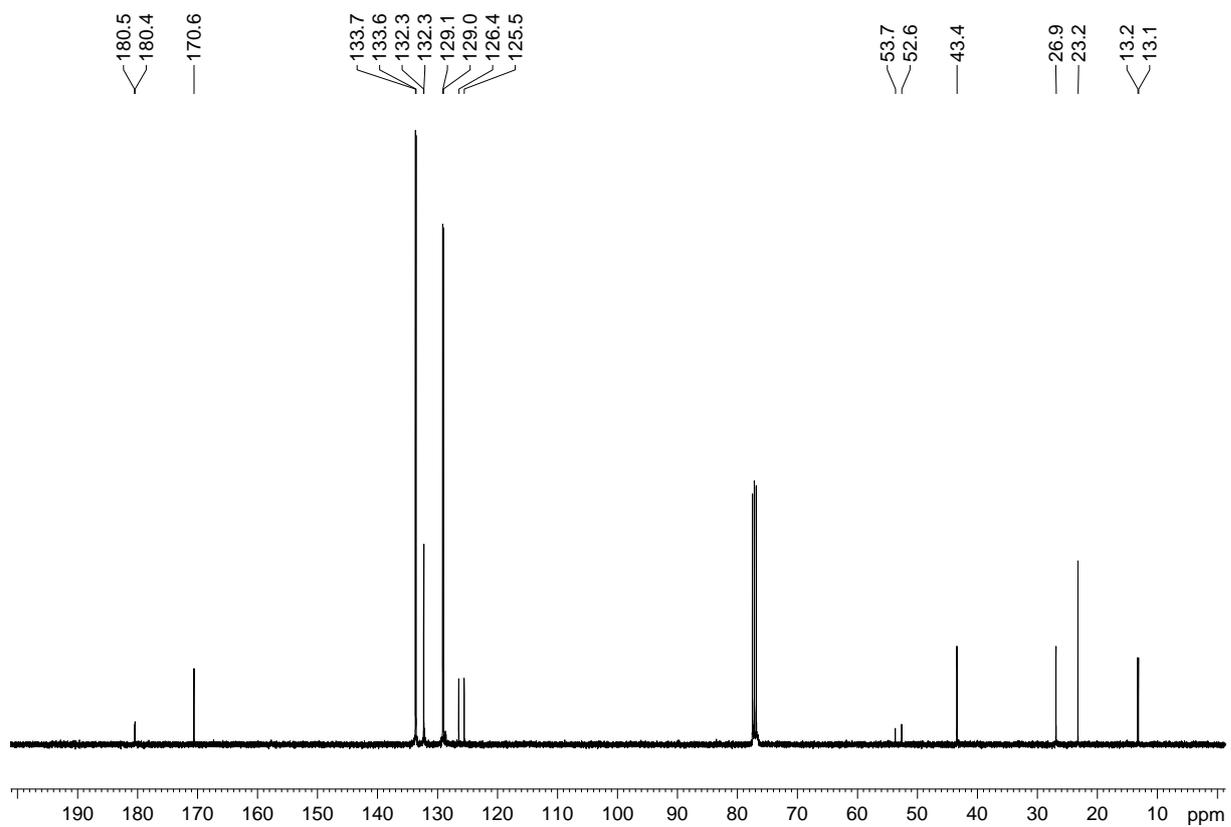
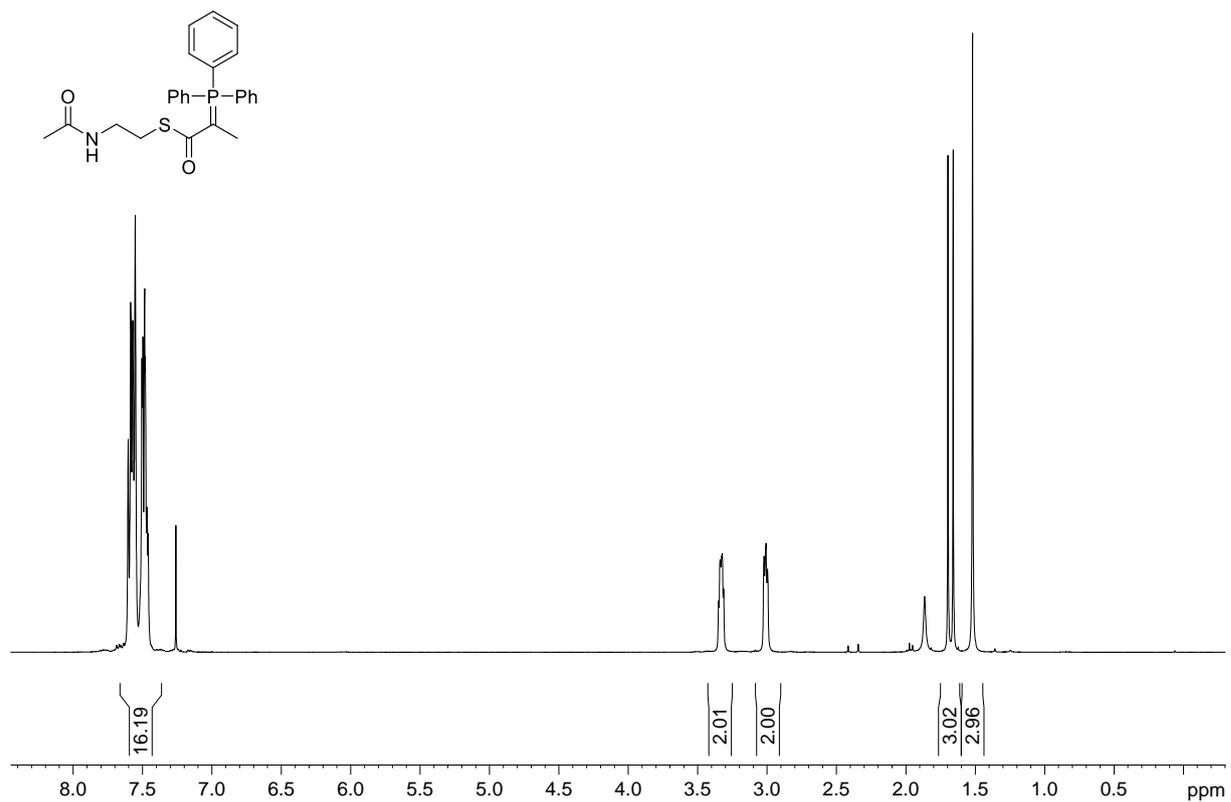


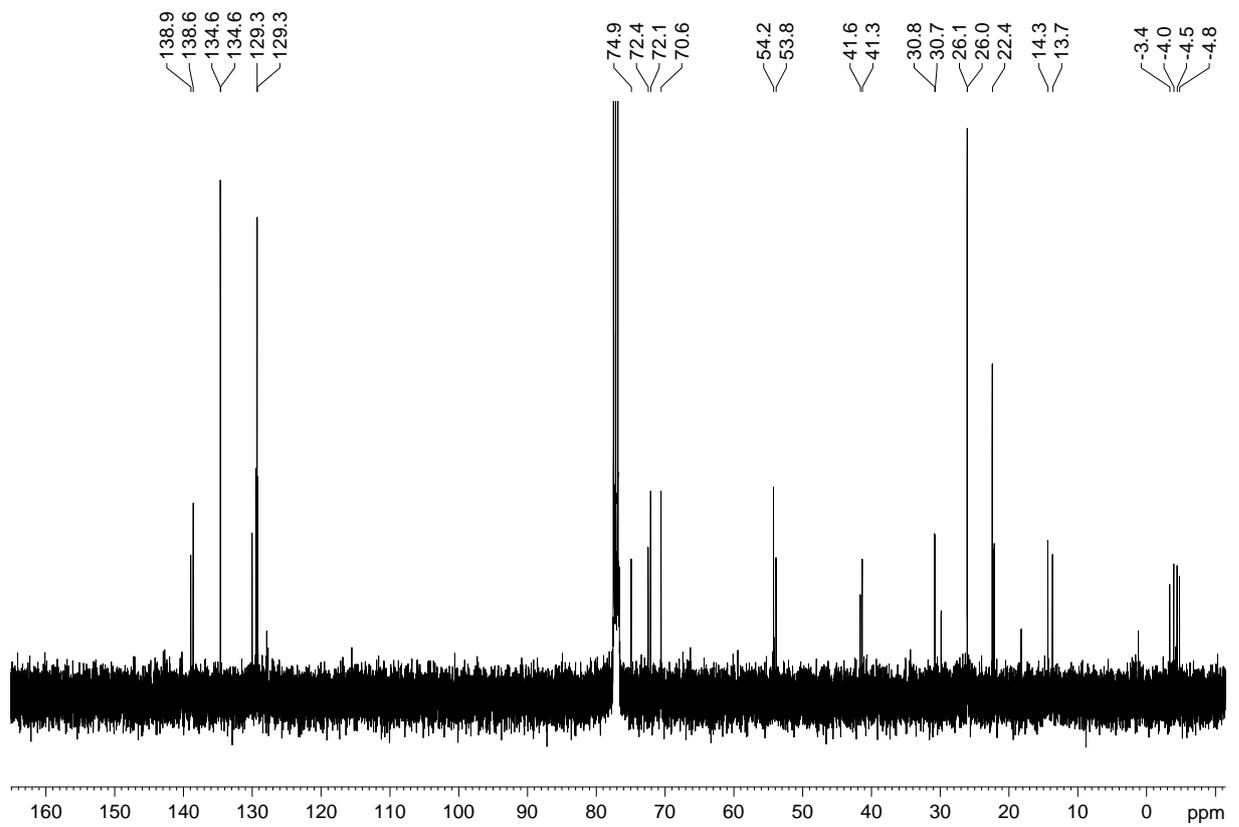
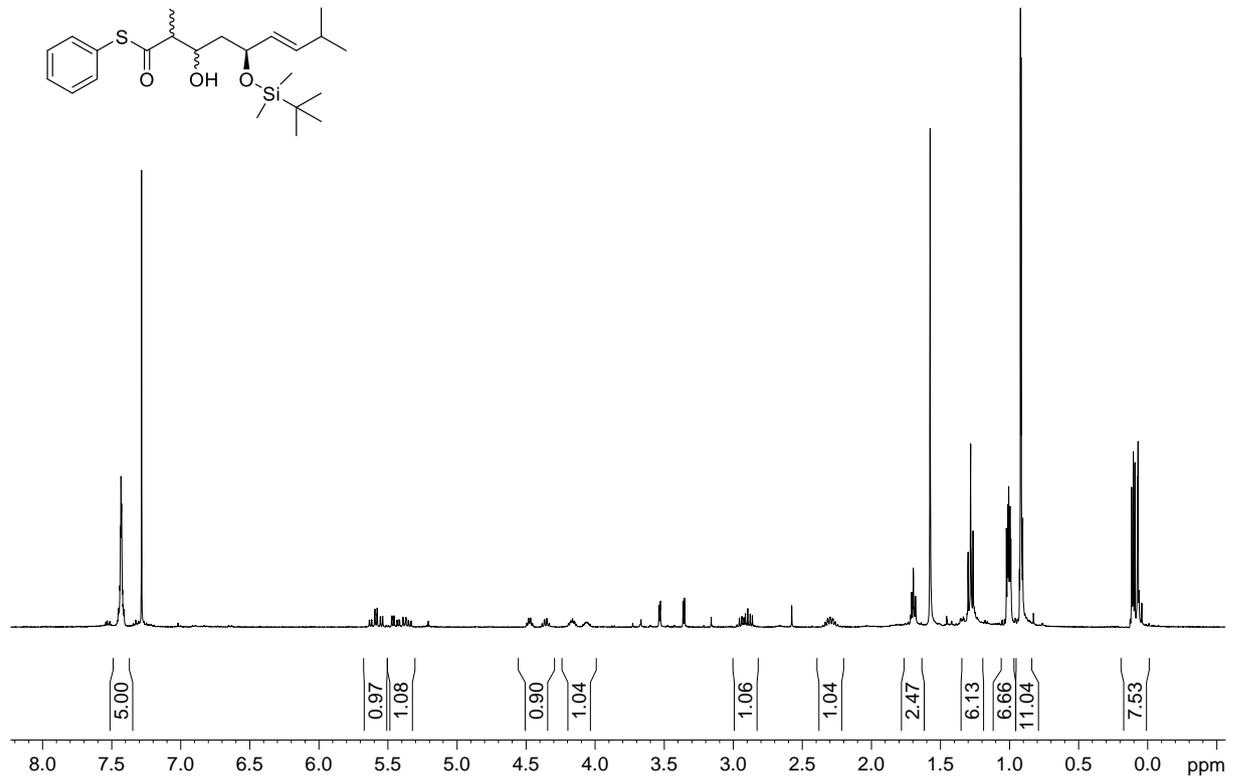


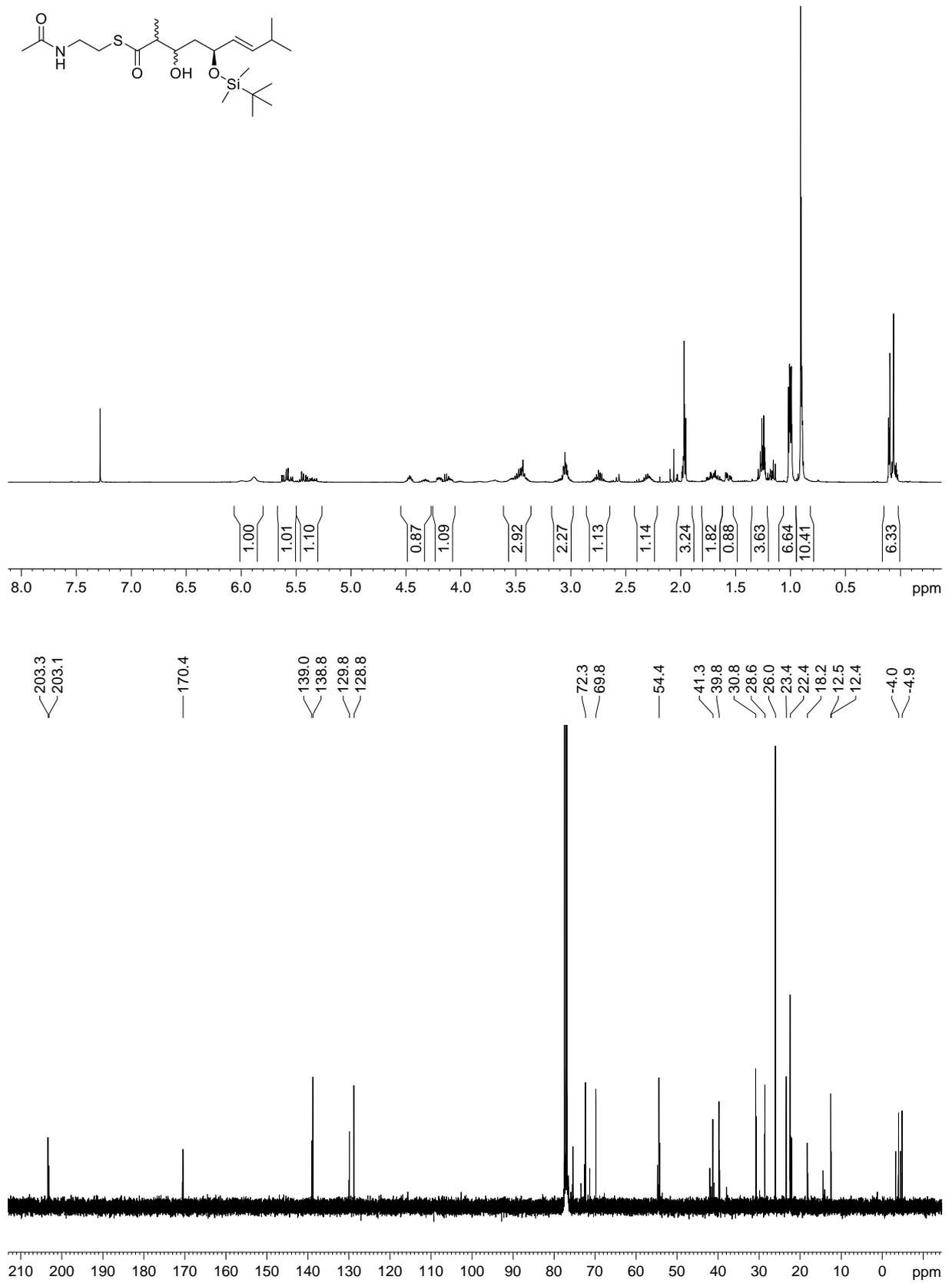


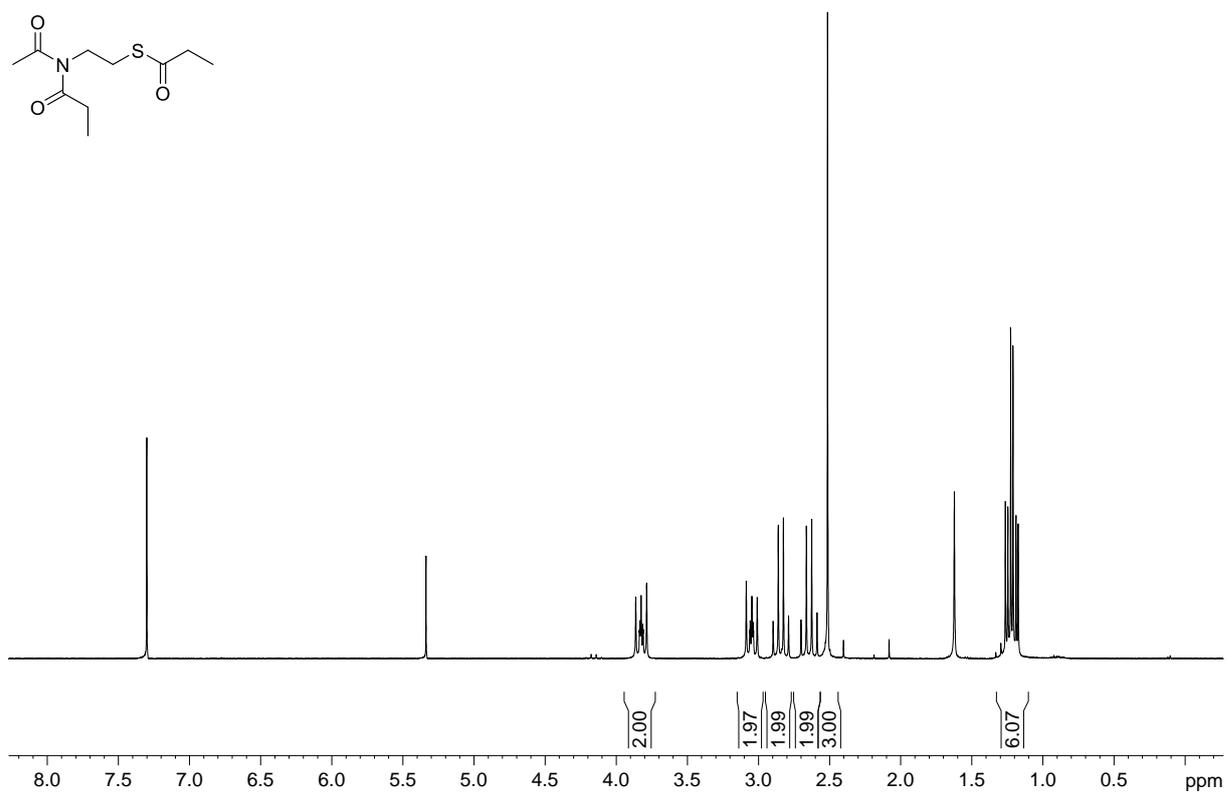
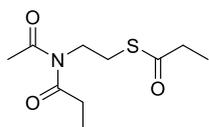
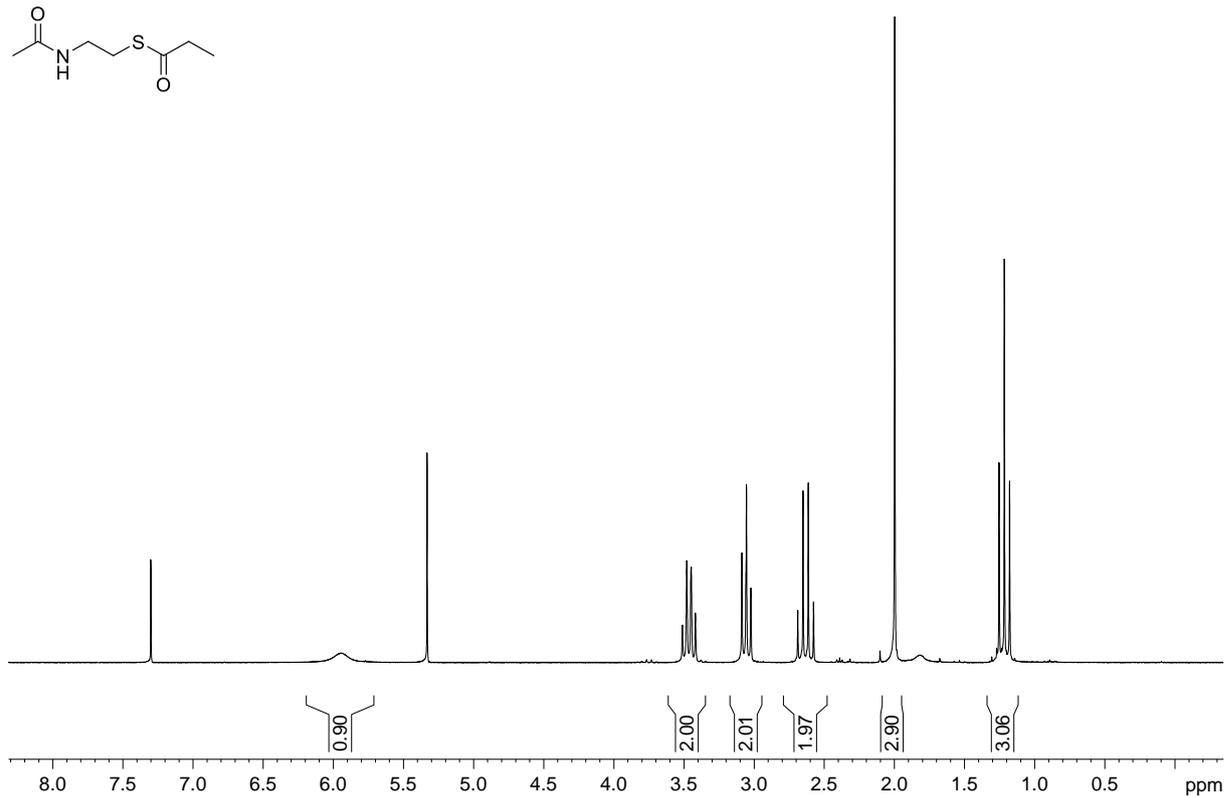
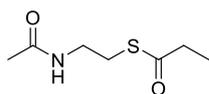


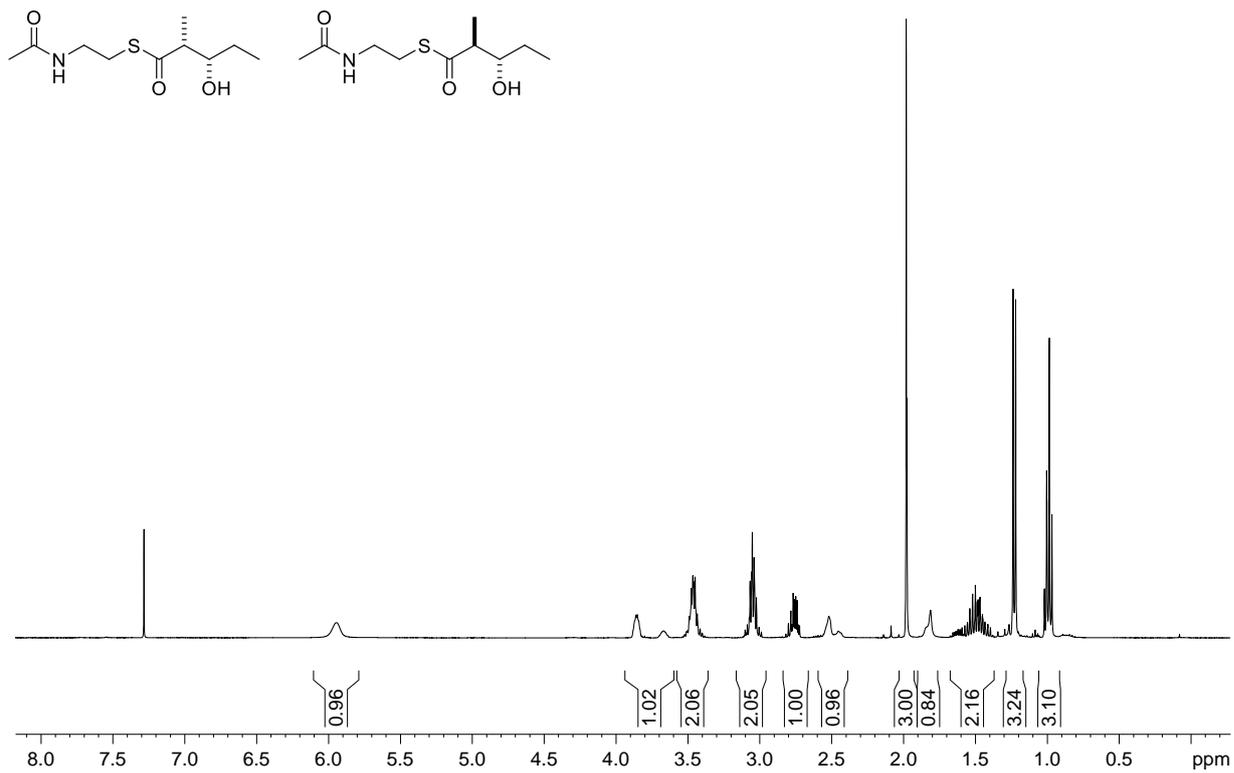


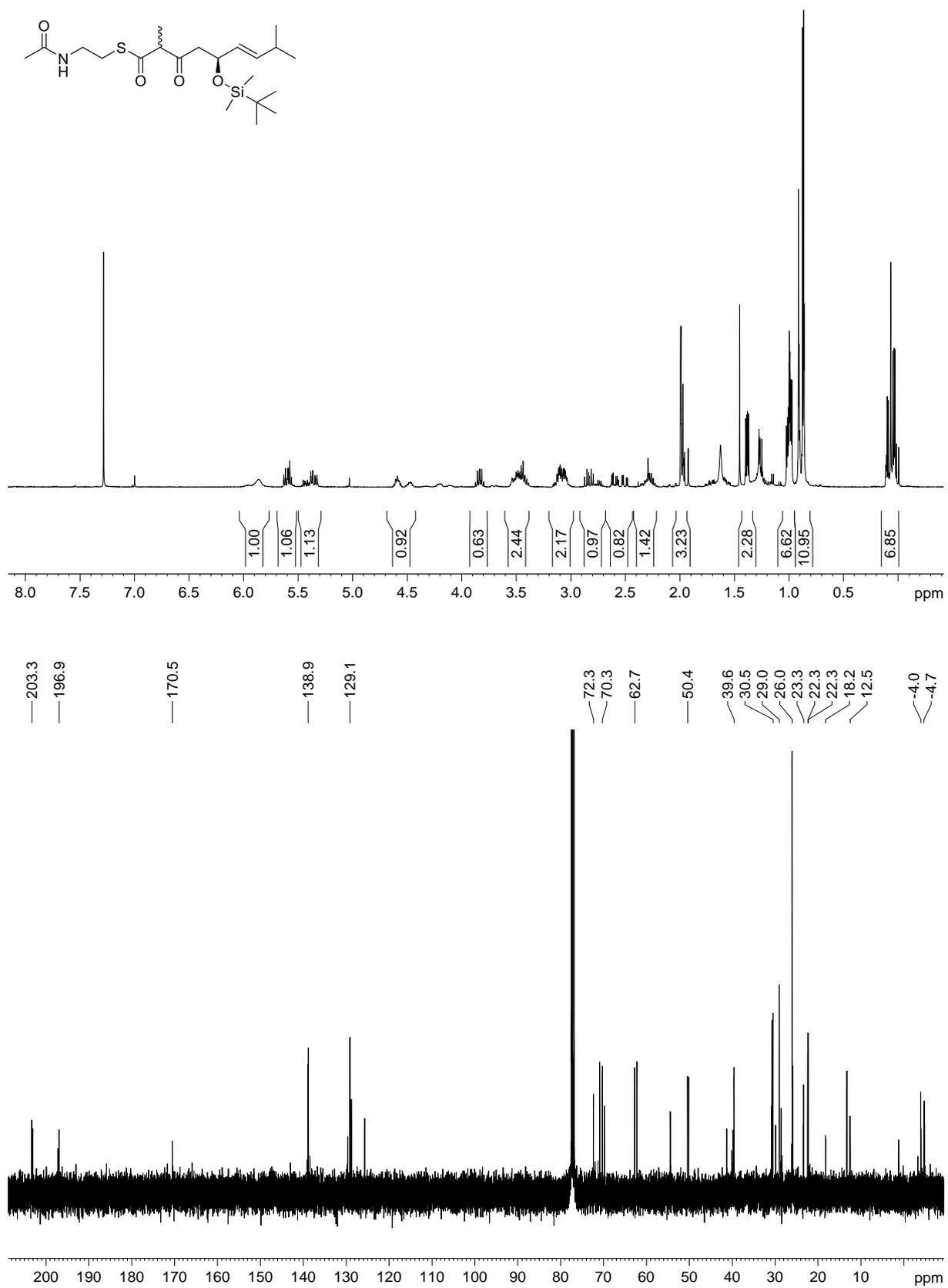


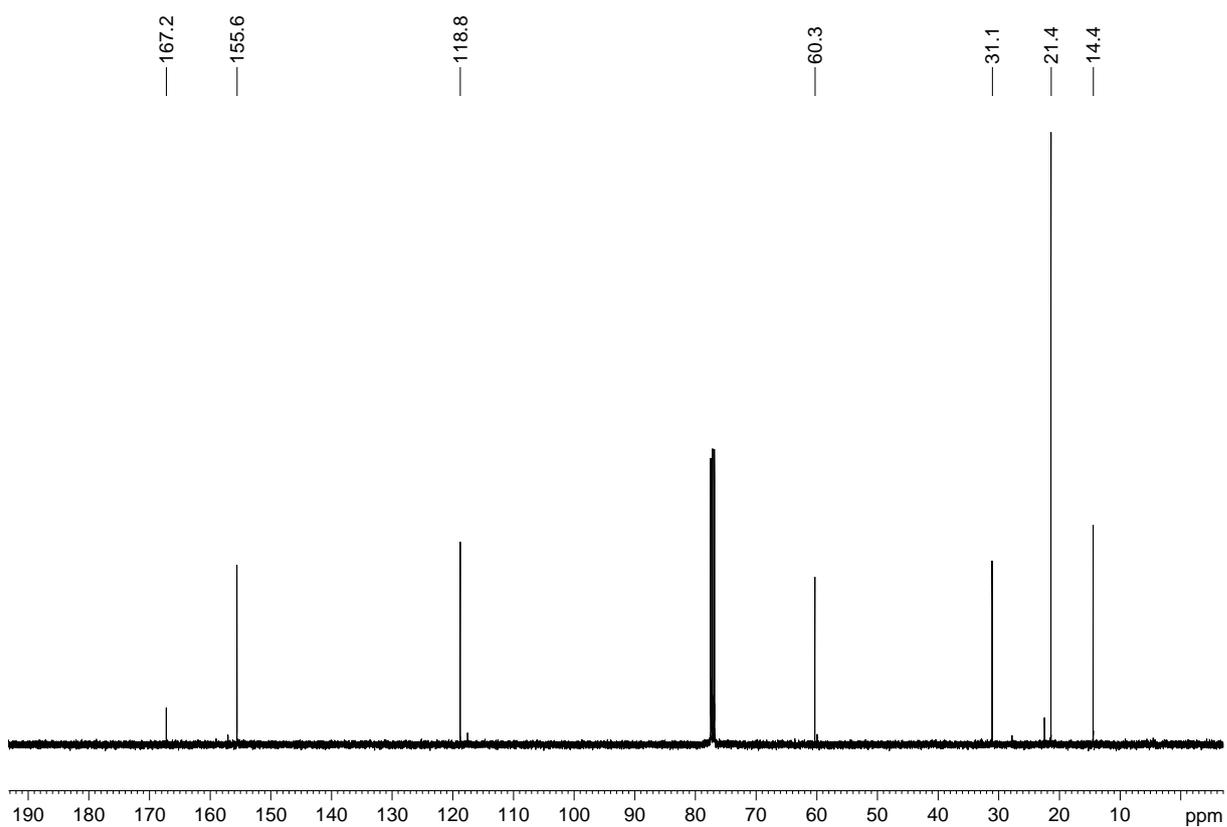
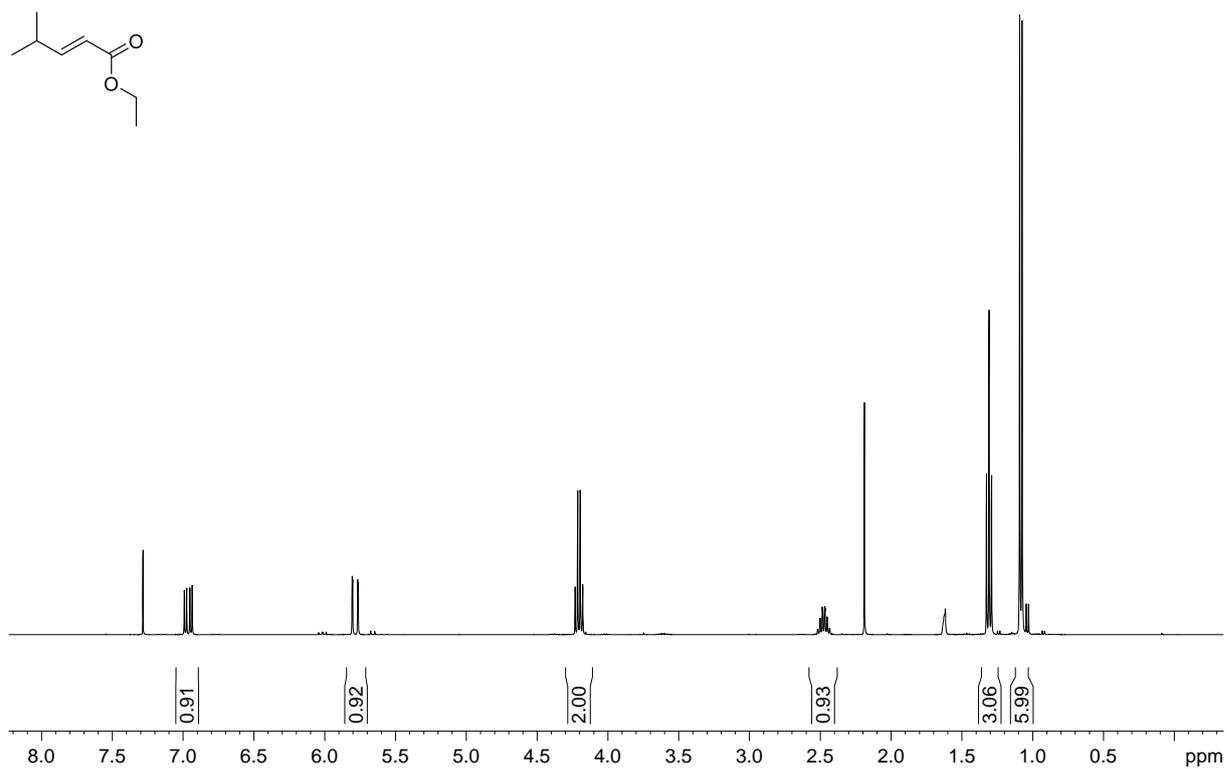
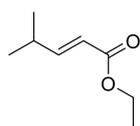


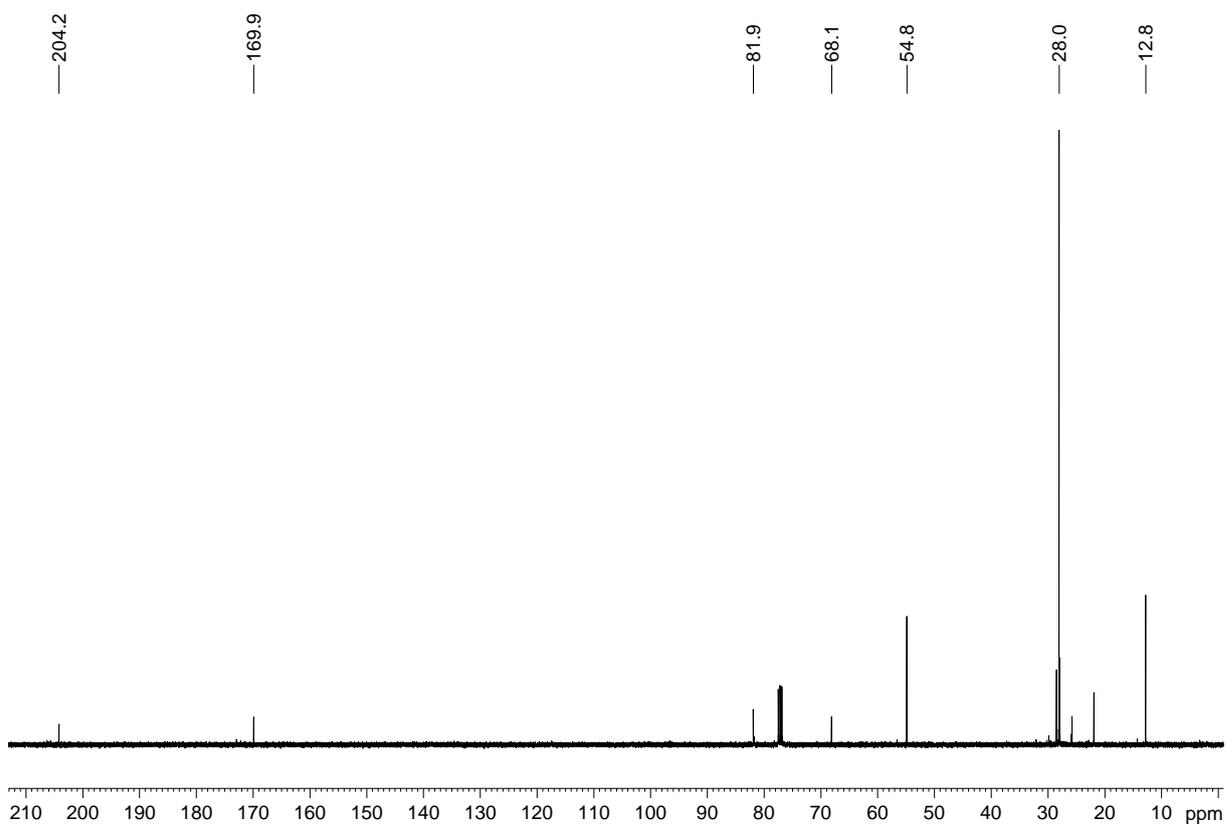
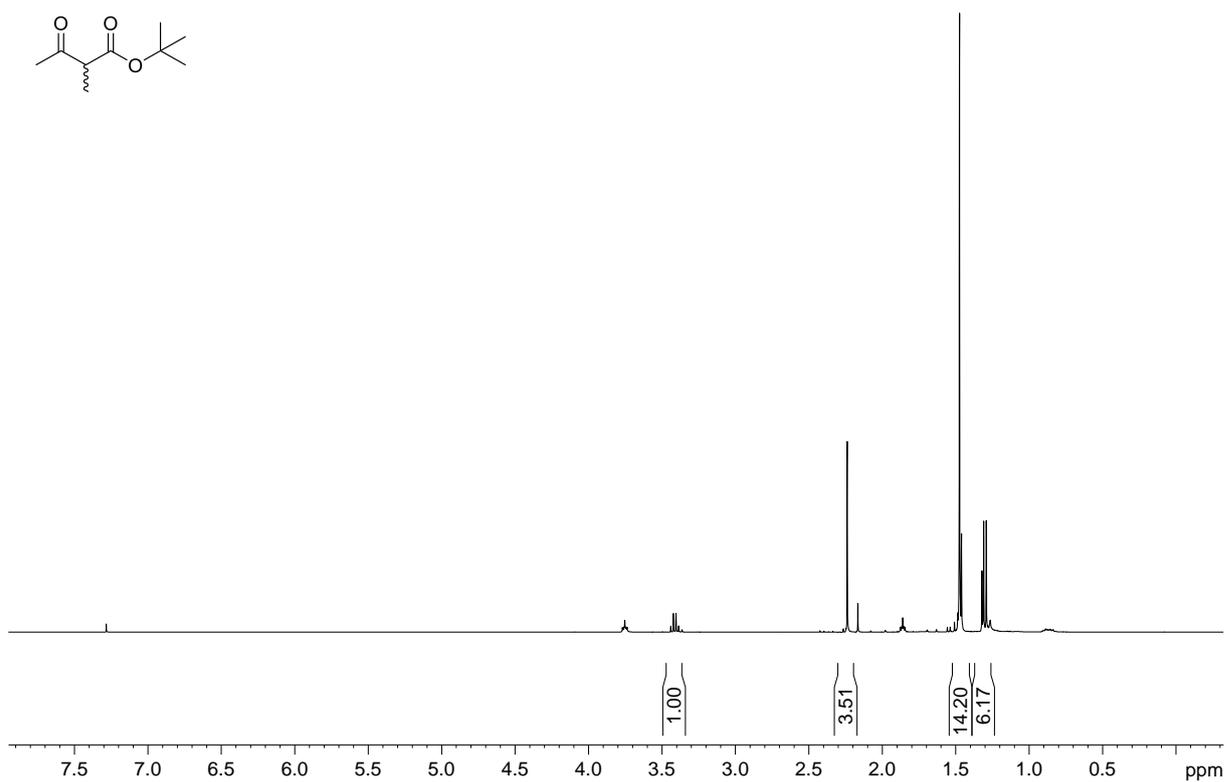
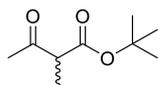


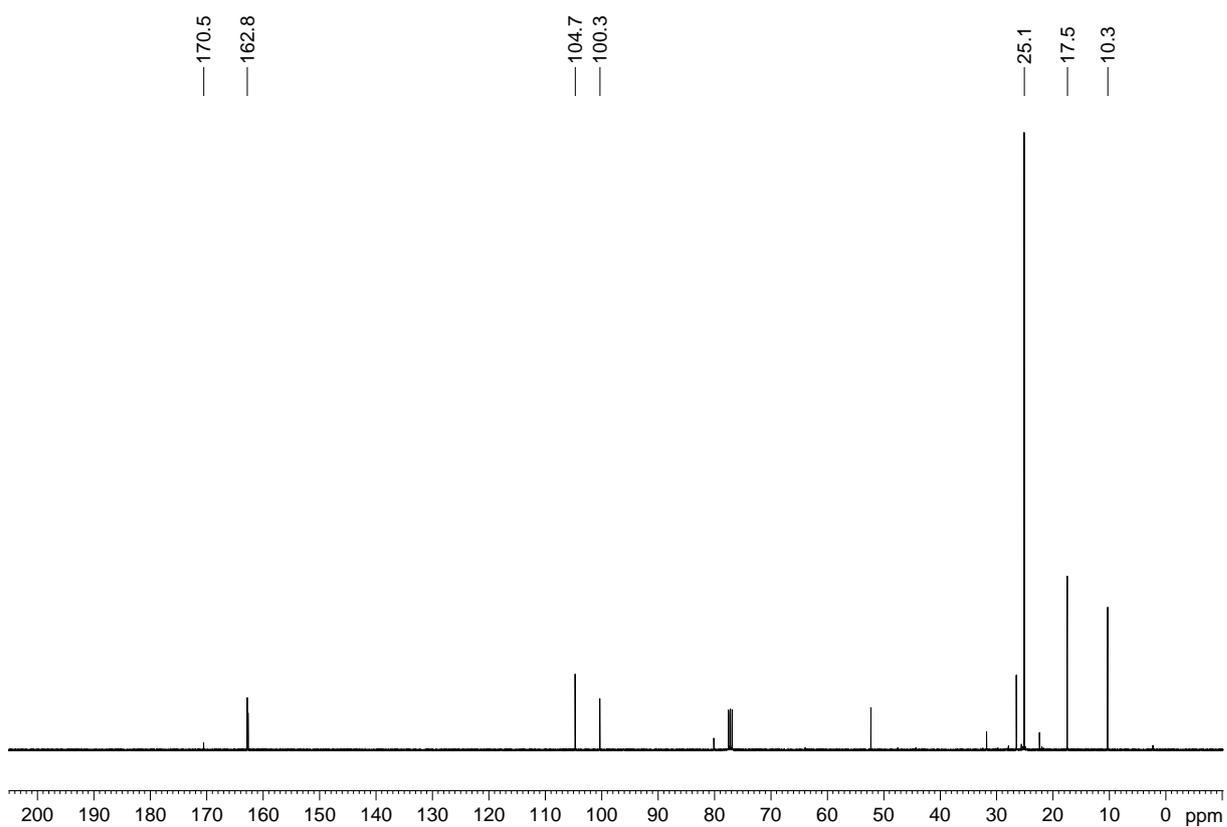
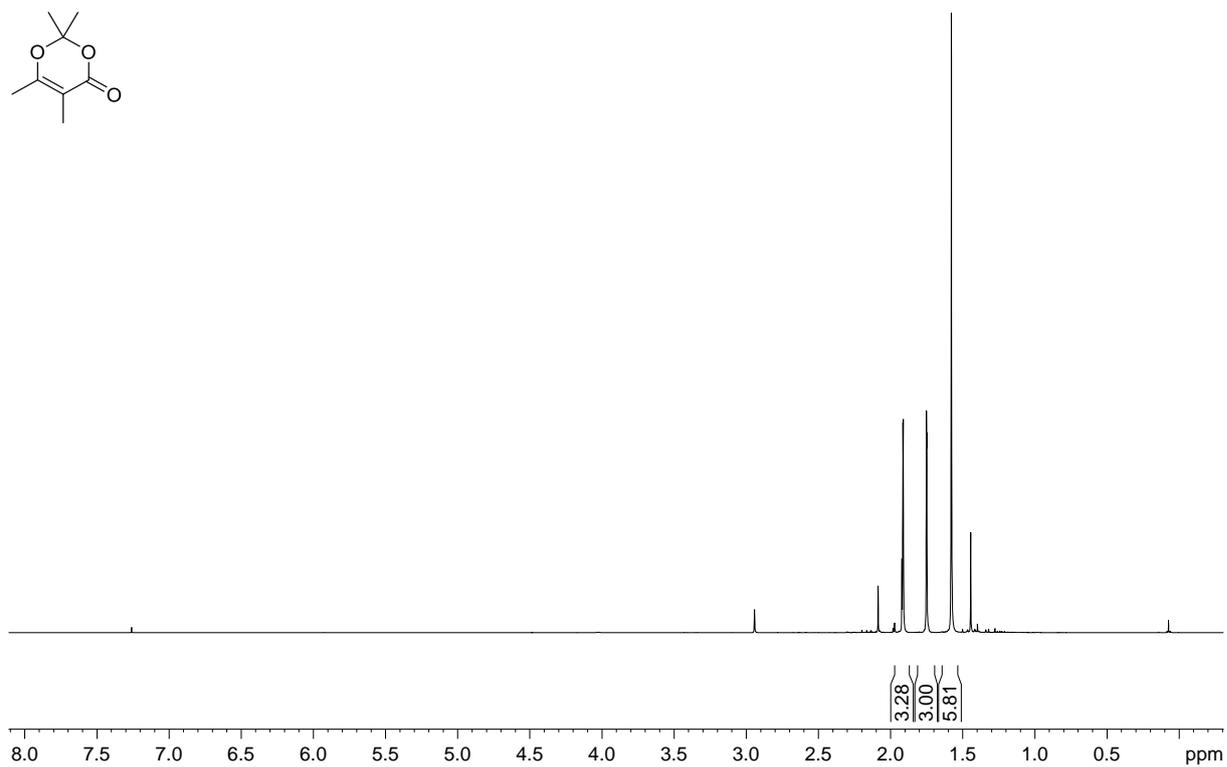
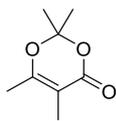


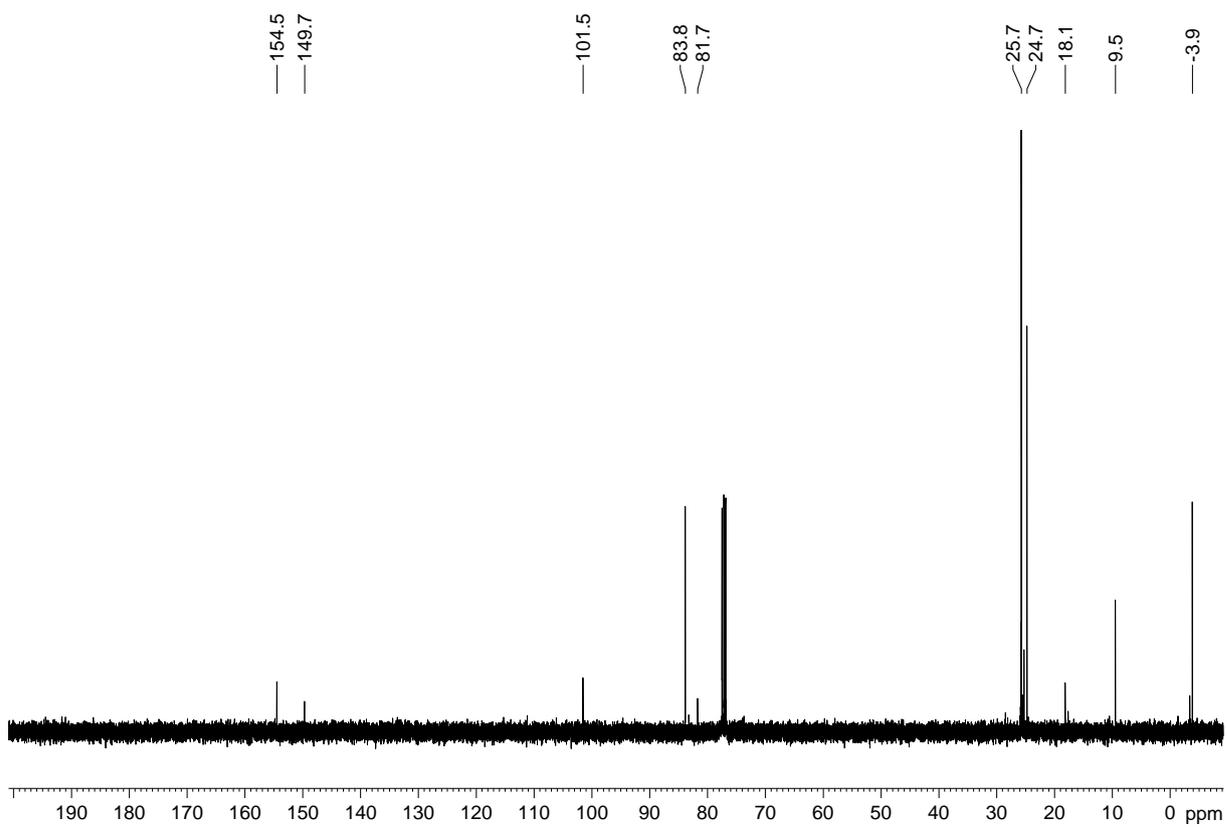
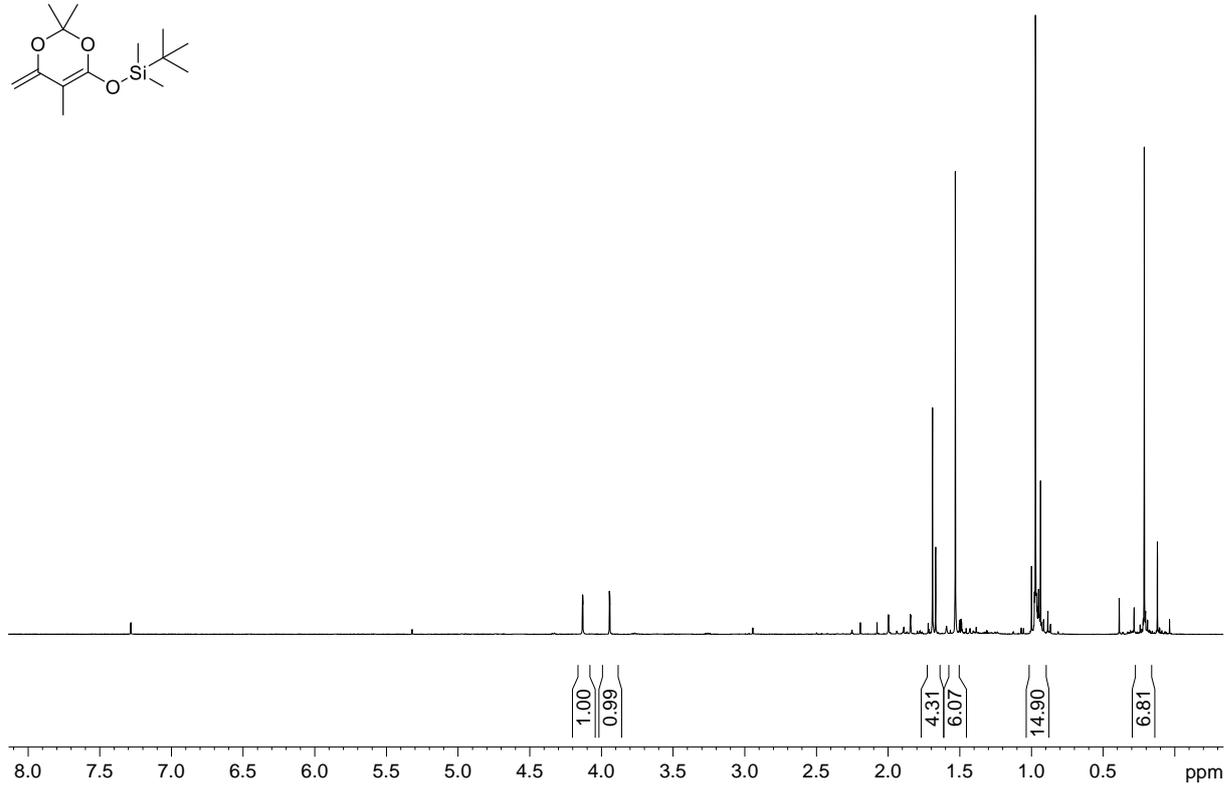
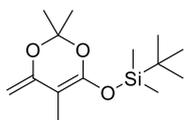


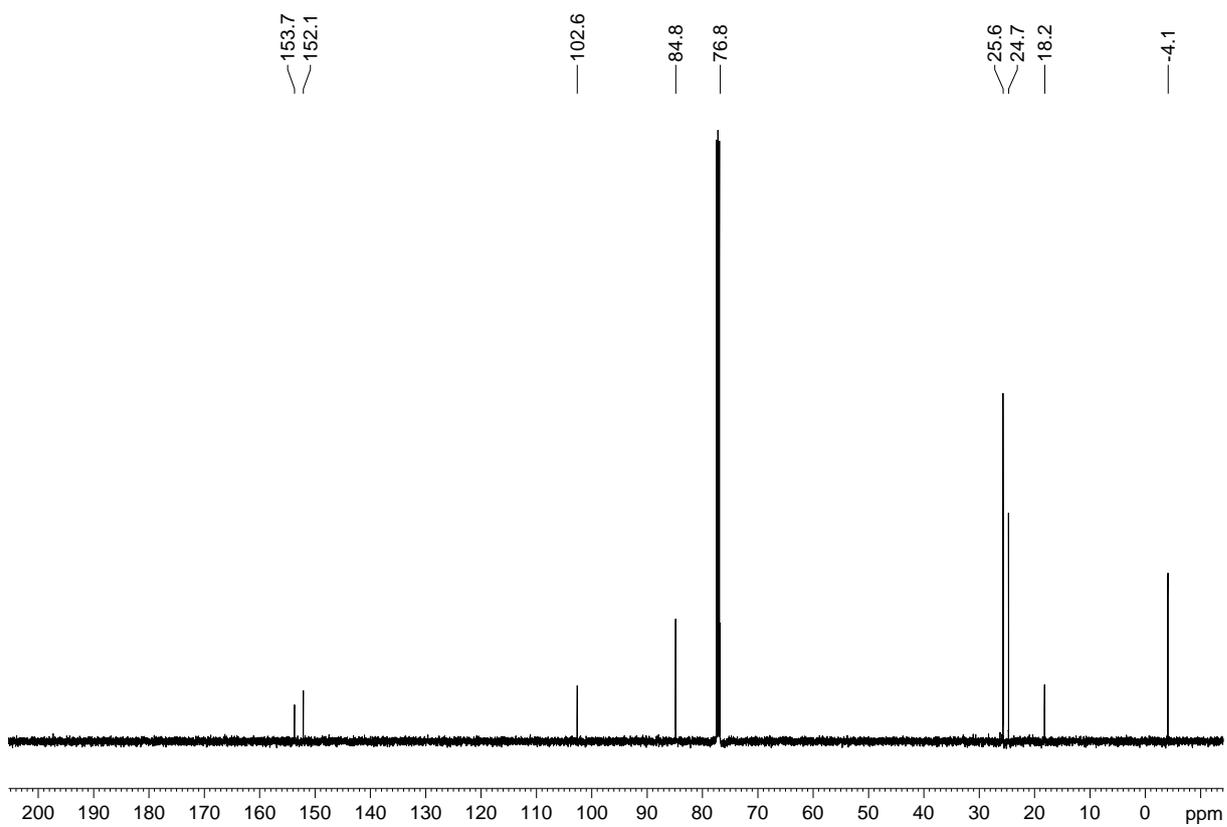
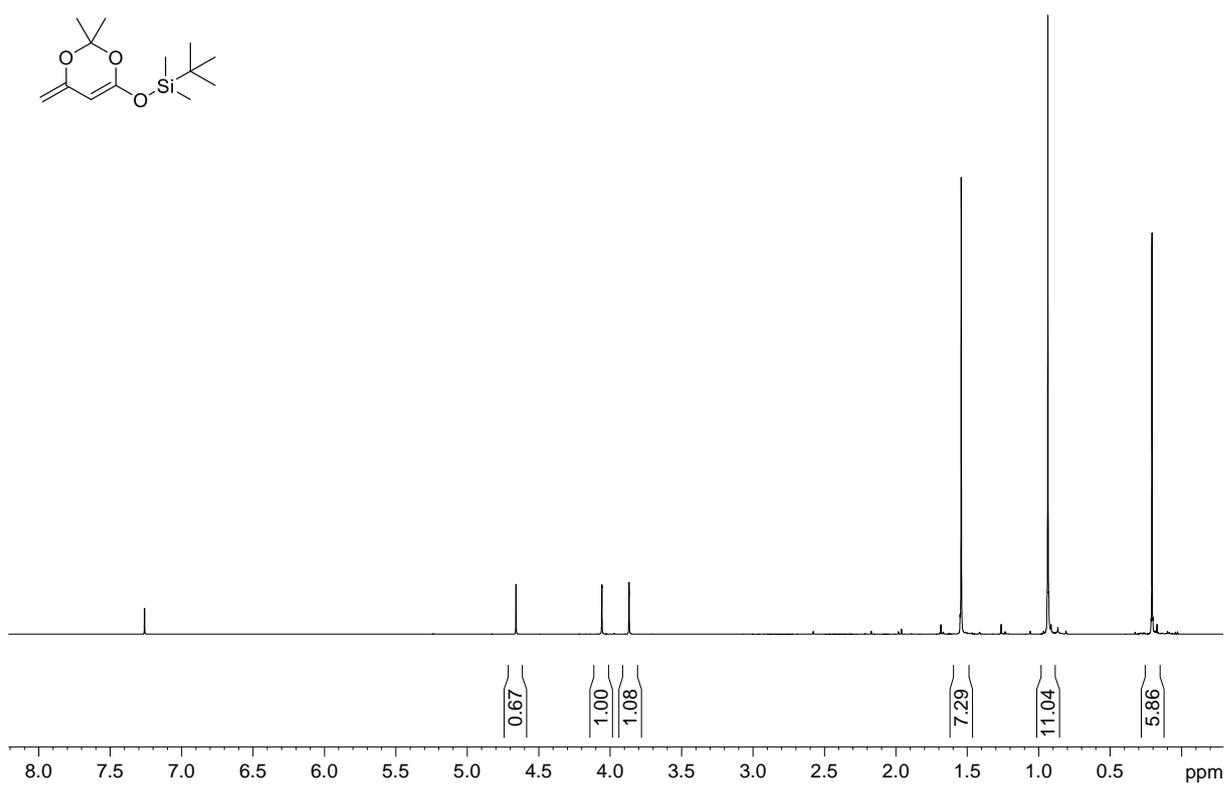
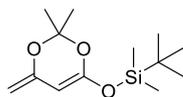


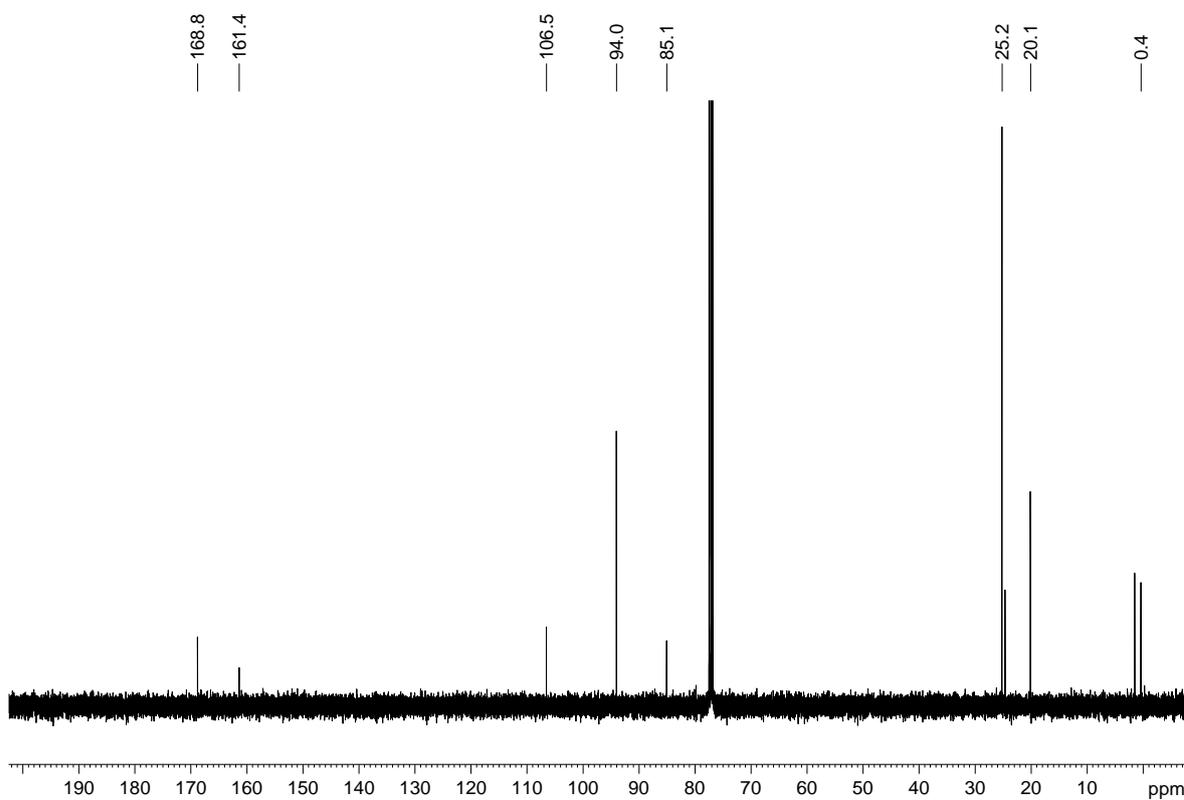
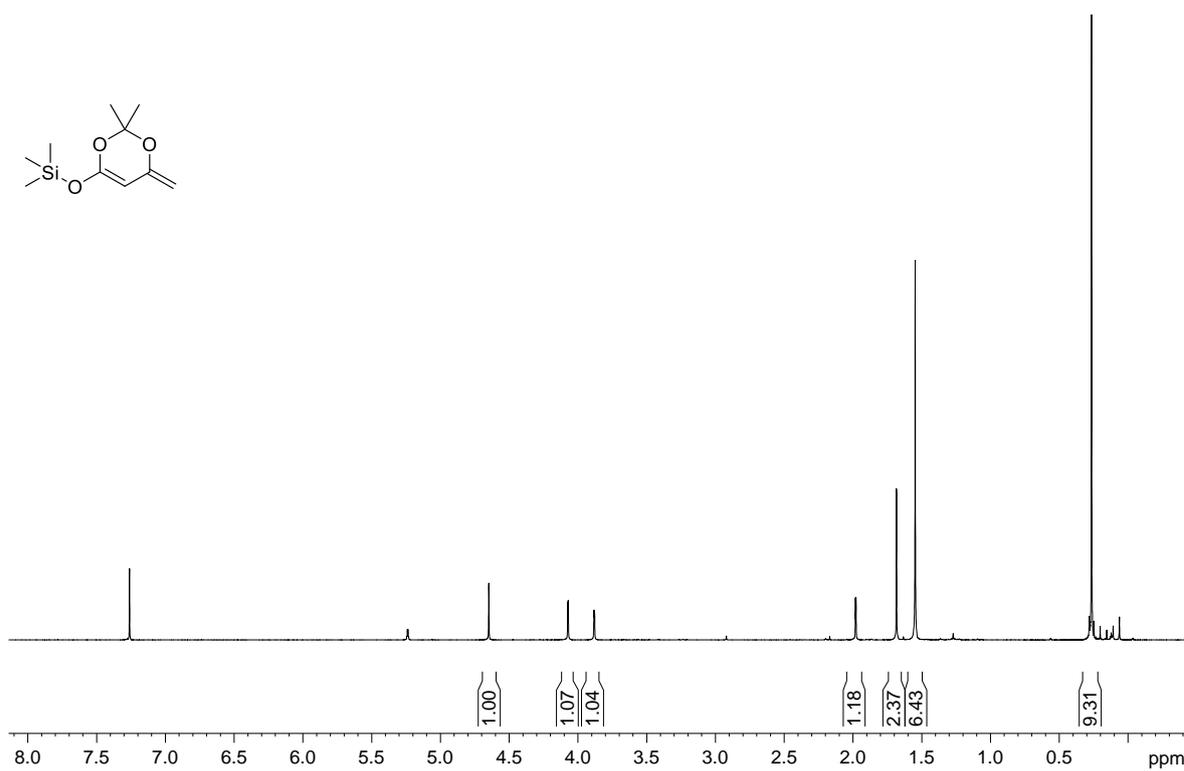
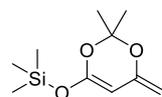


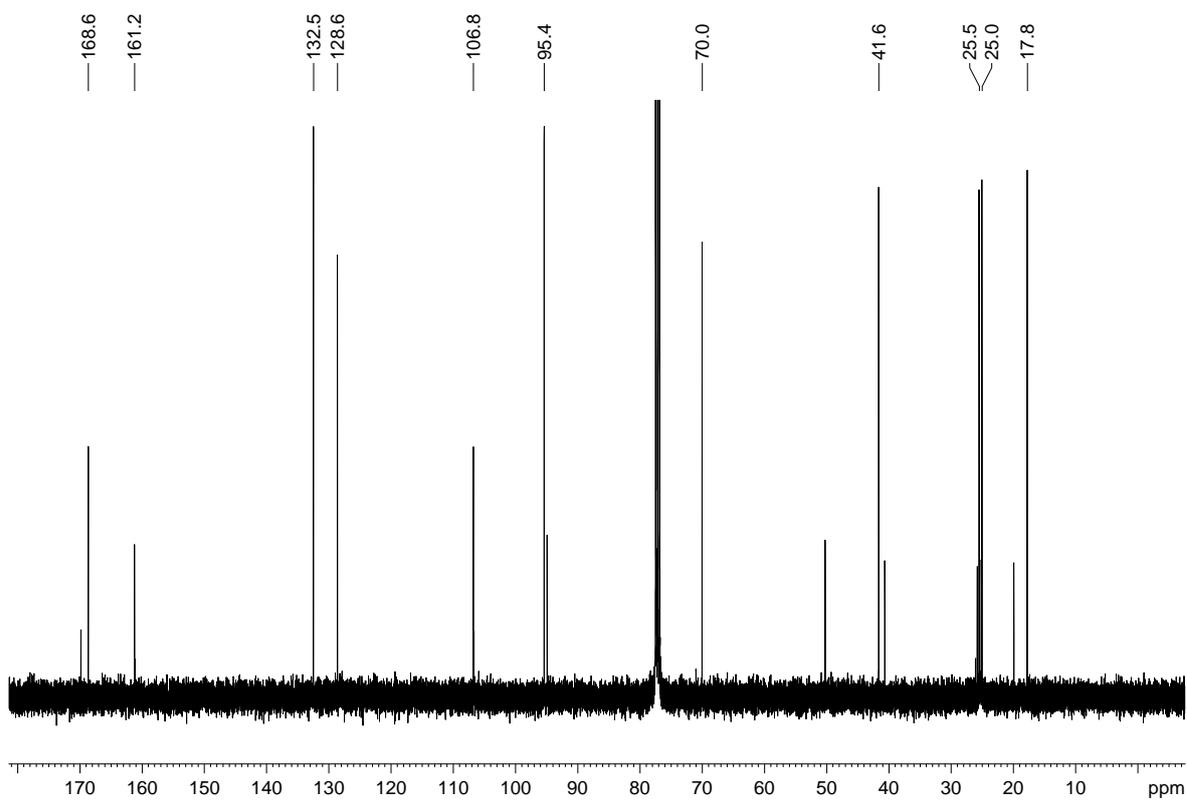
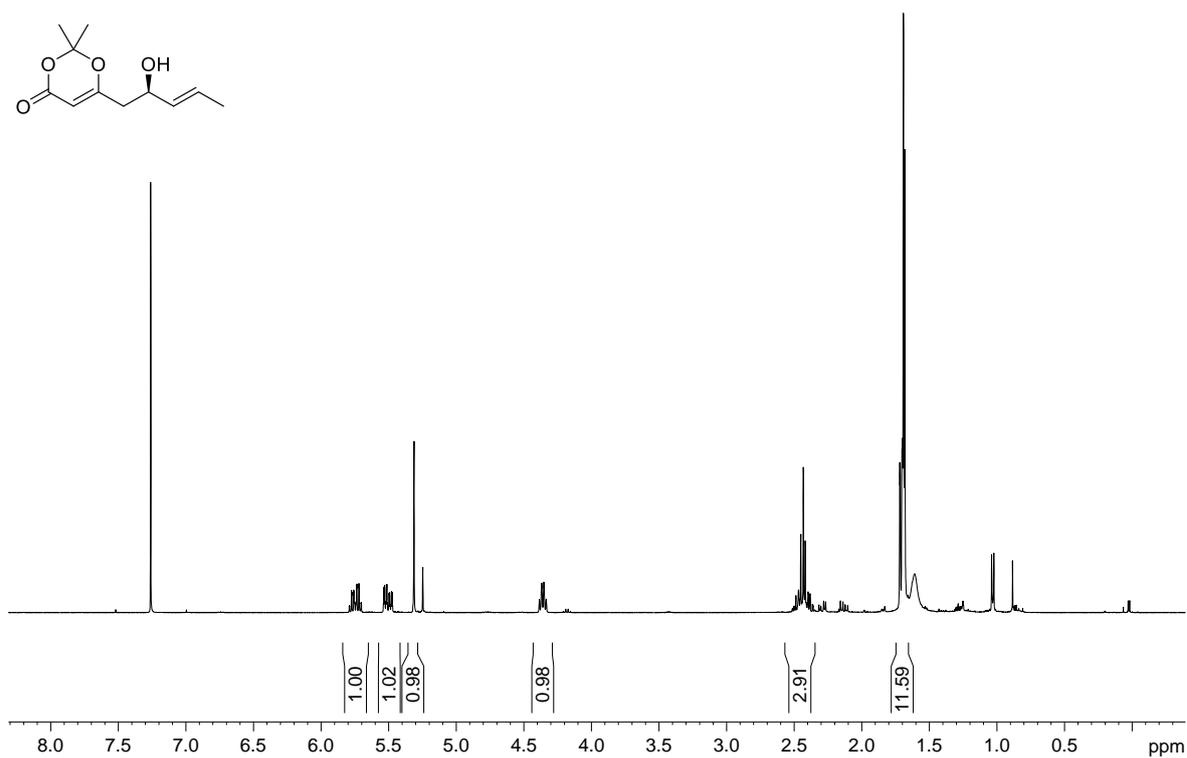
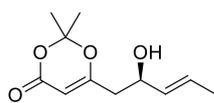


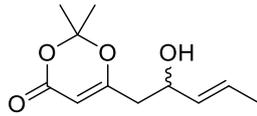
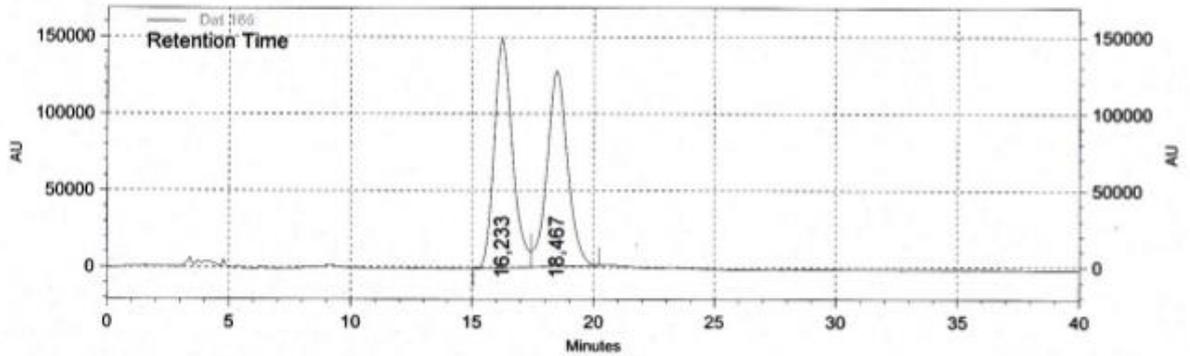




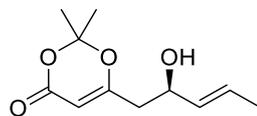
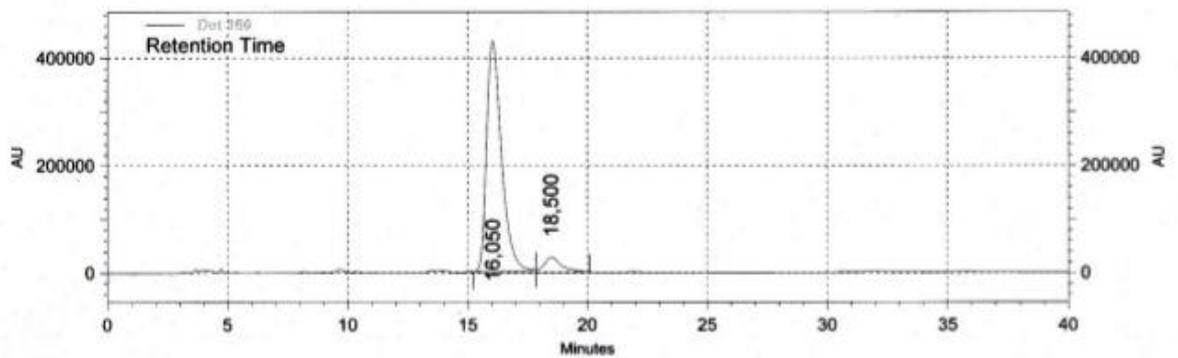




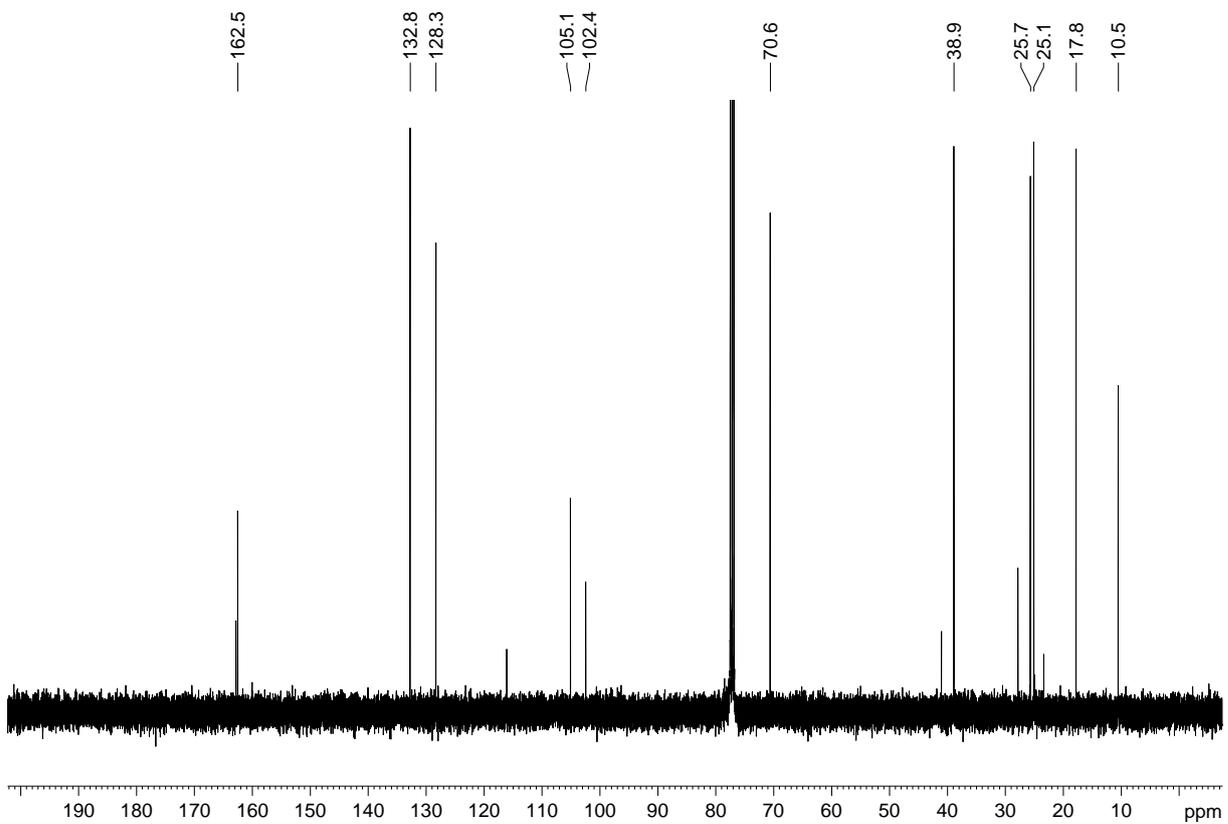
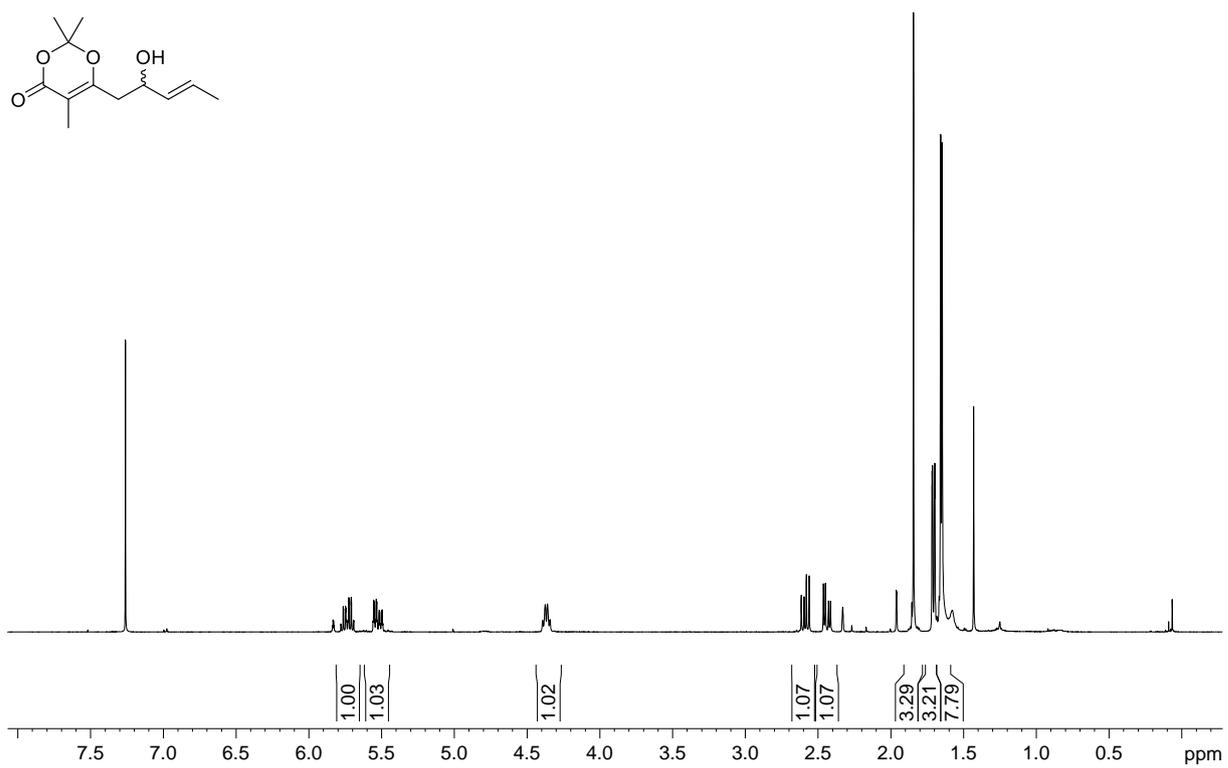
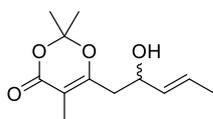


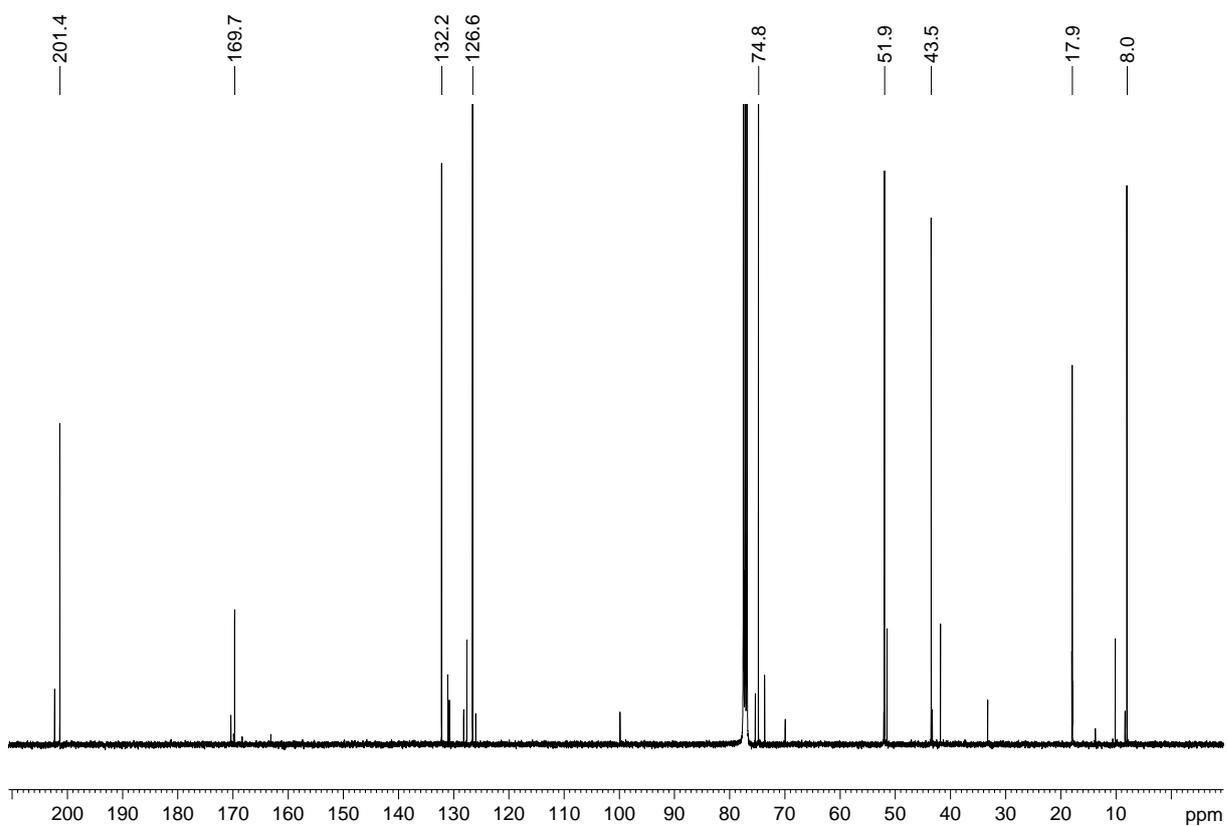
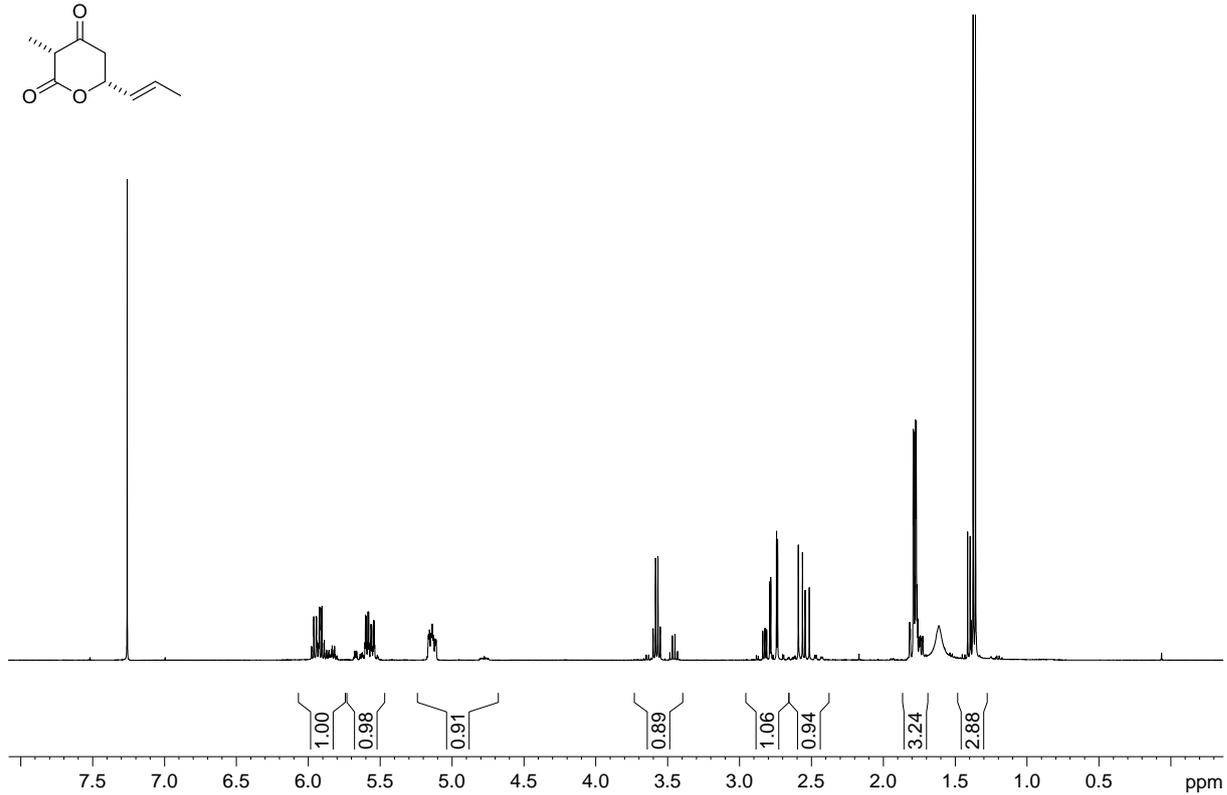
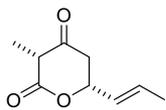
*rac-110a***Det 166 Results**

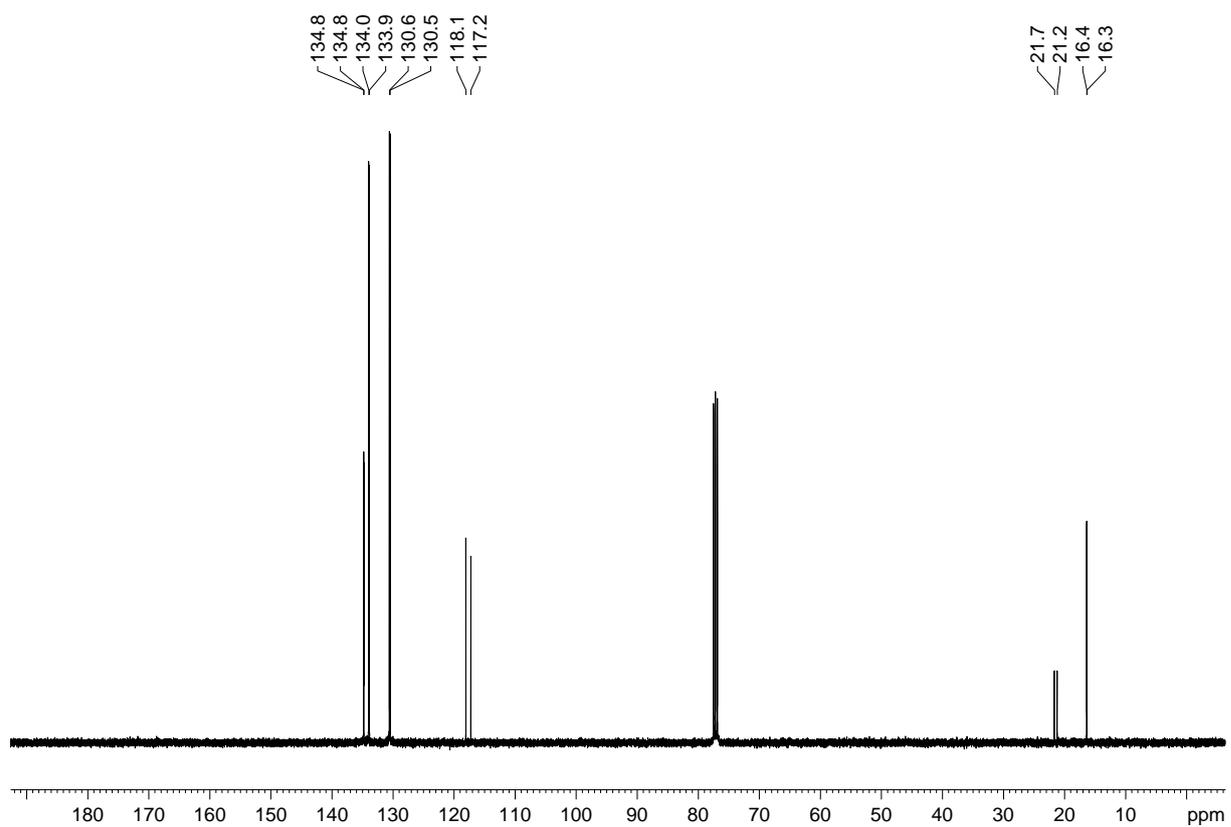
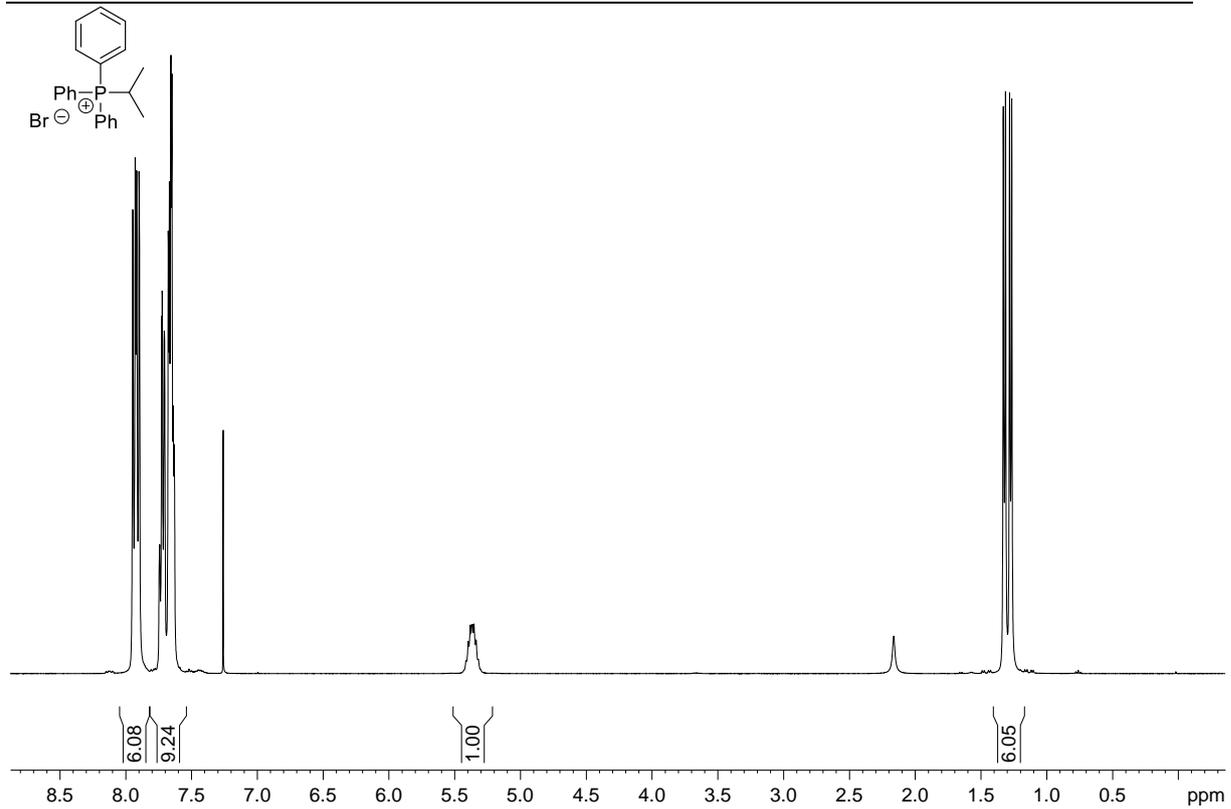
Time	Area	Area %	Height	Height %
16,233	7726874	51,02	150209	54,06
18,467	7418722	48,98	127635	45,94

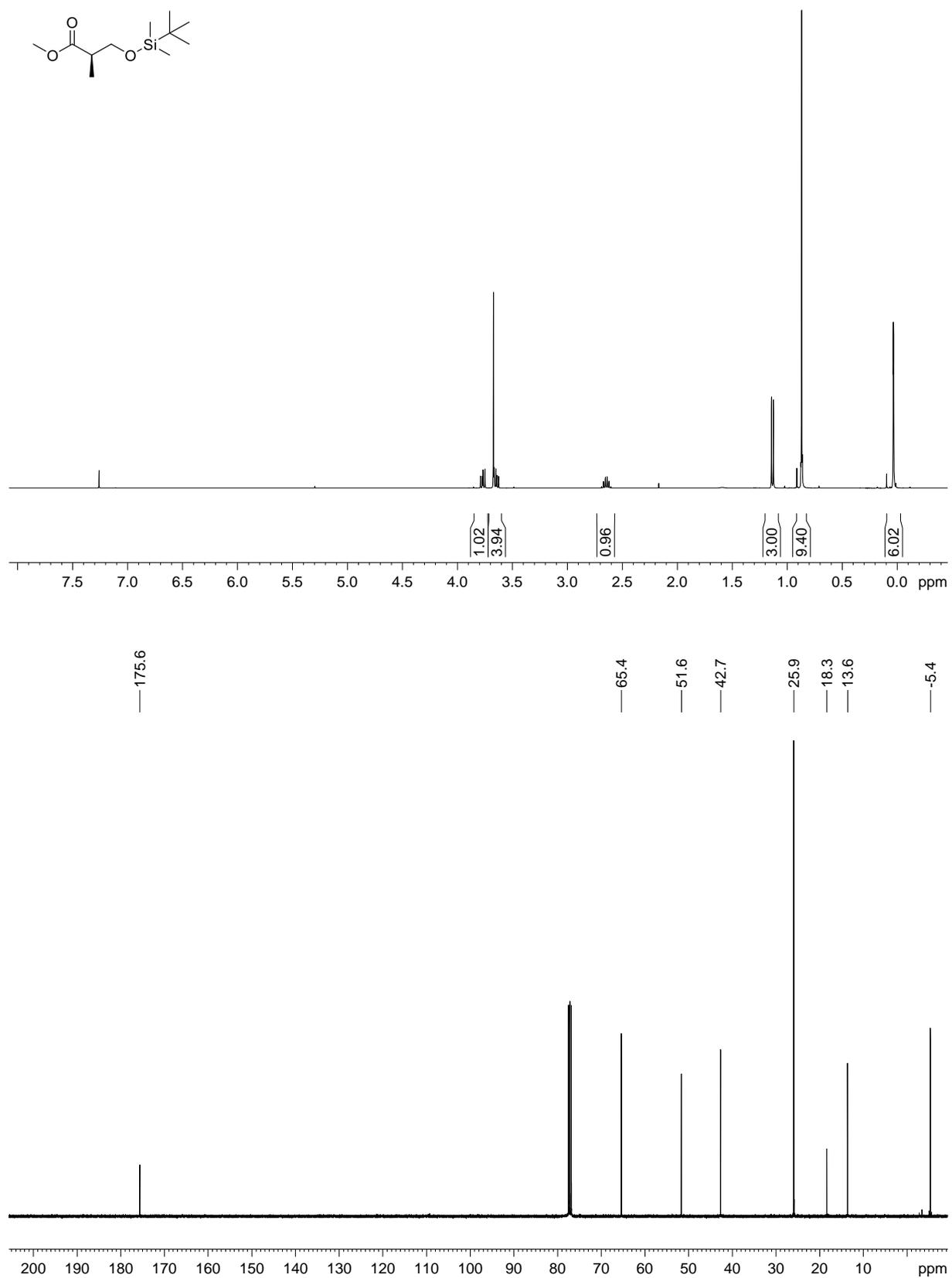
**110a****Det 166 Results**

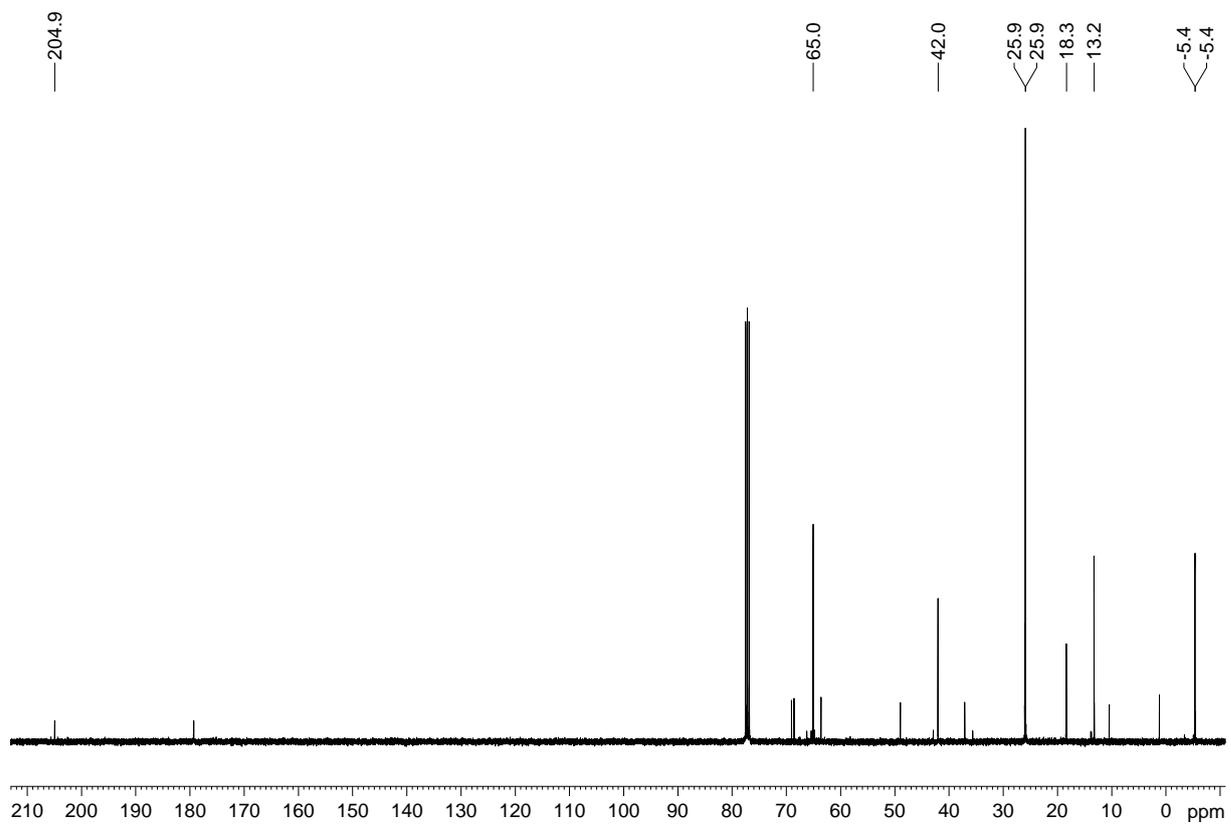
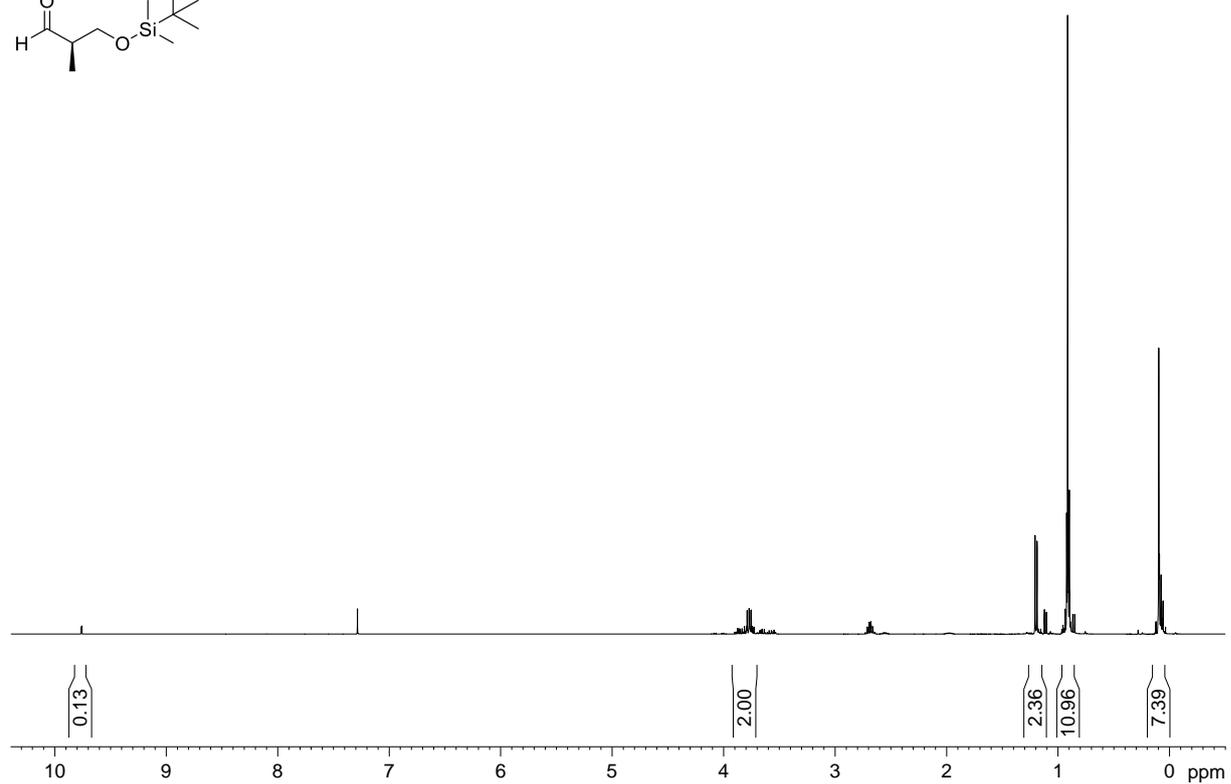
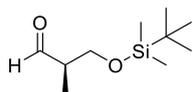
Time	Area	Area %	Height	Height %
16,050	18829796	93,25	429879	93,97
18,500	1362184	6,75	27592	6,03

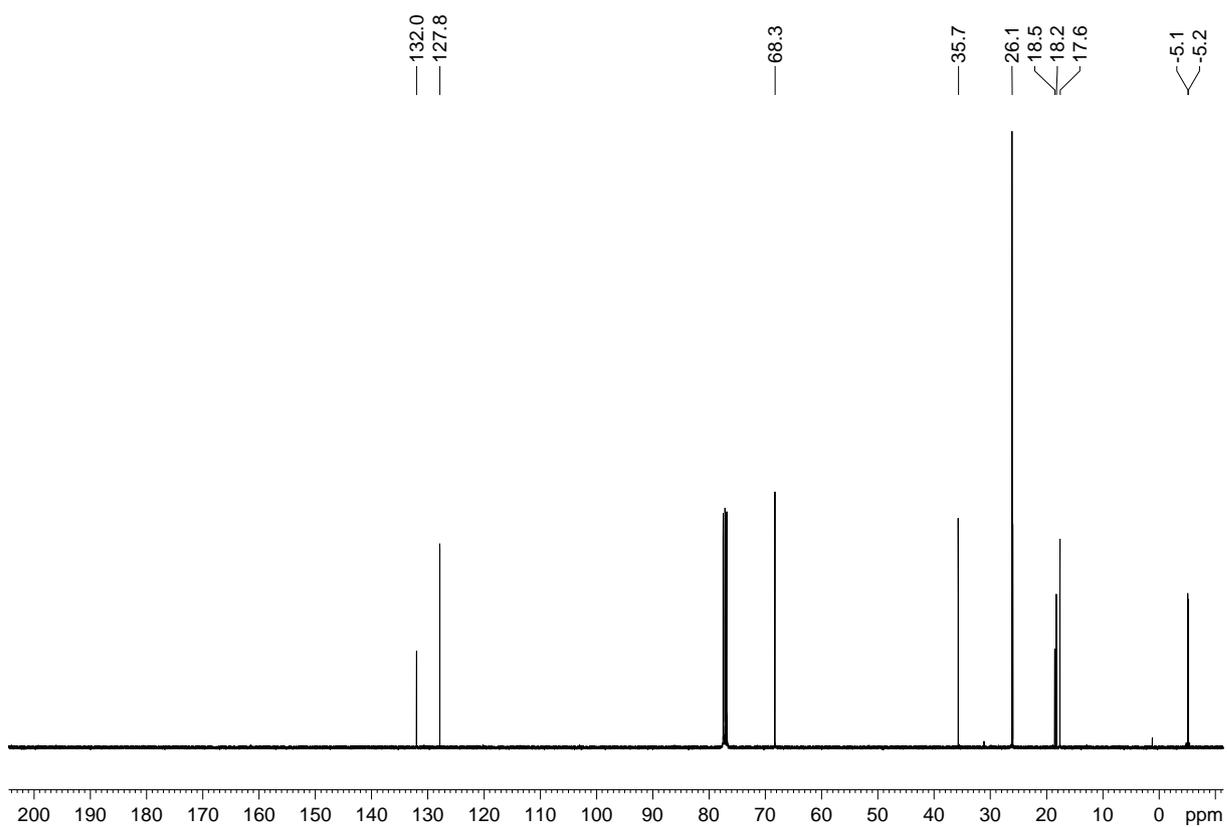
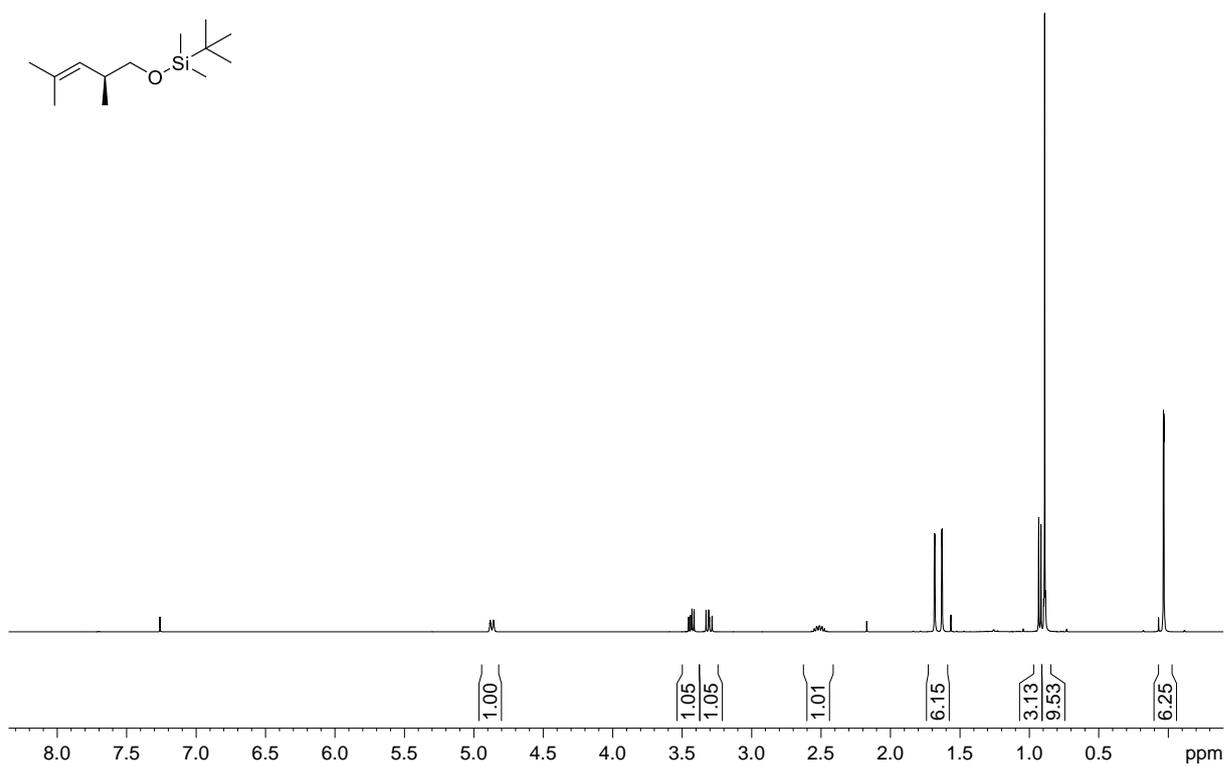
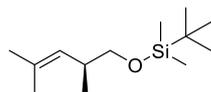


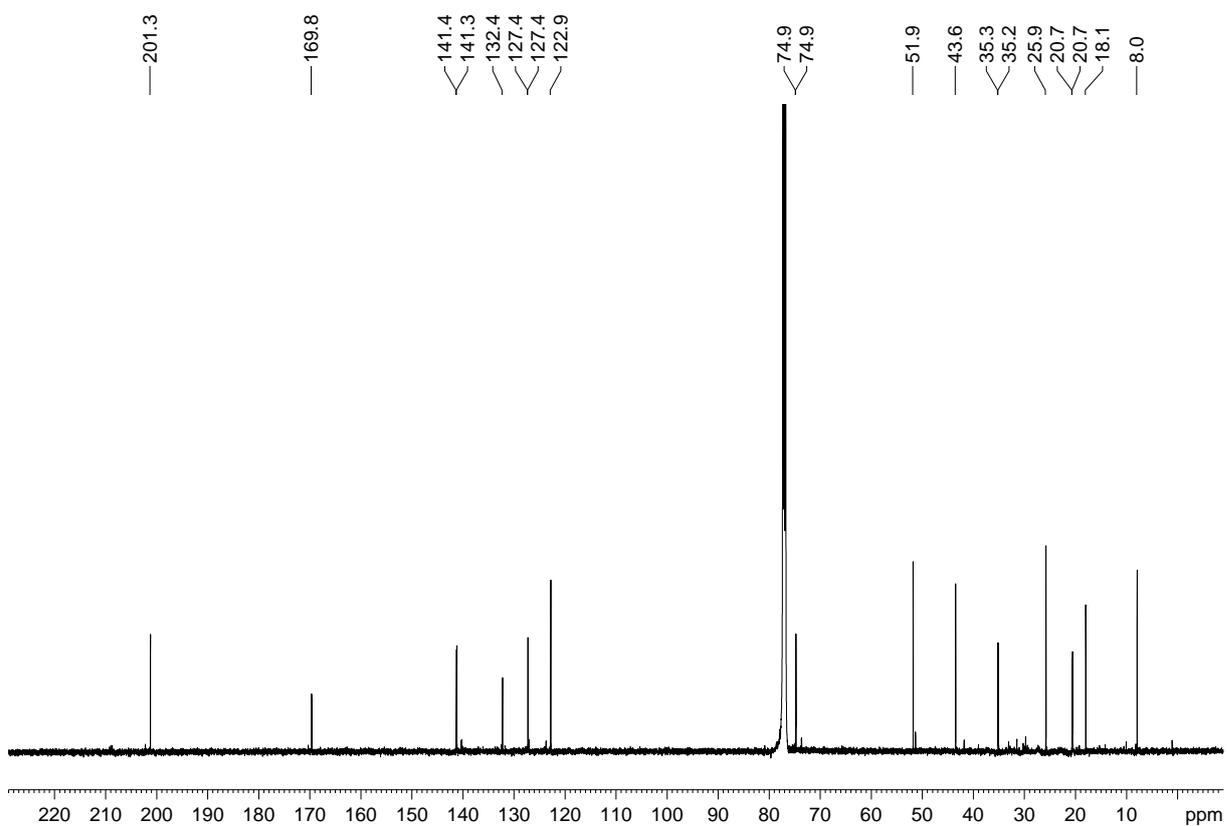
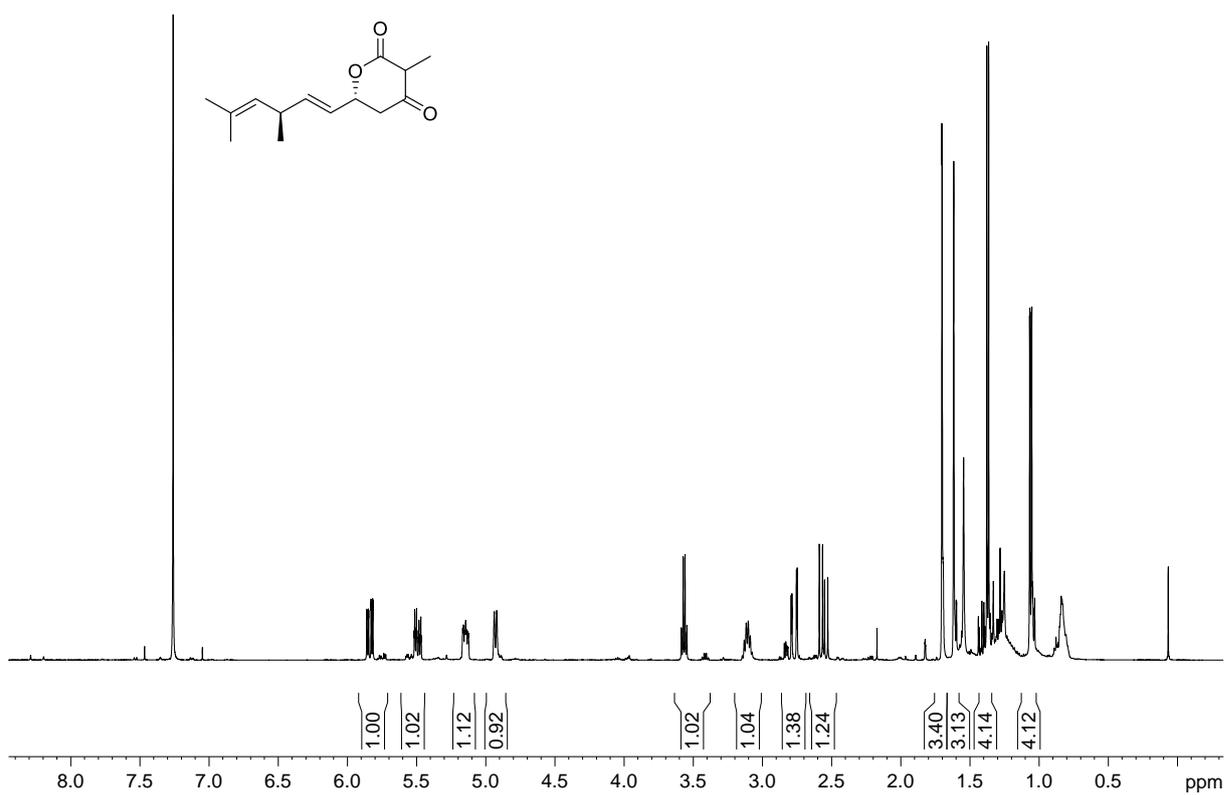


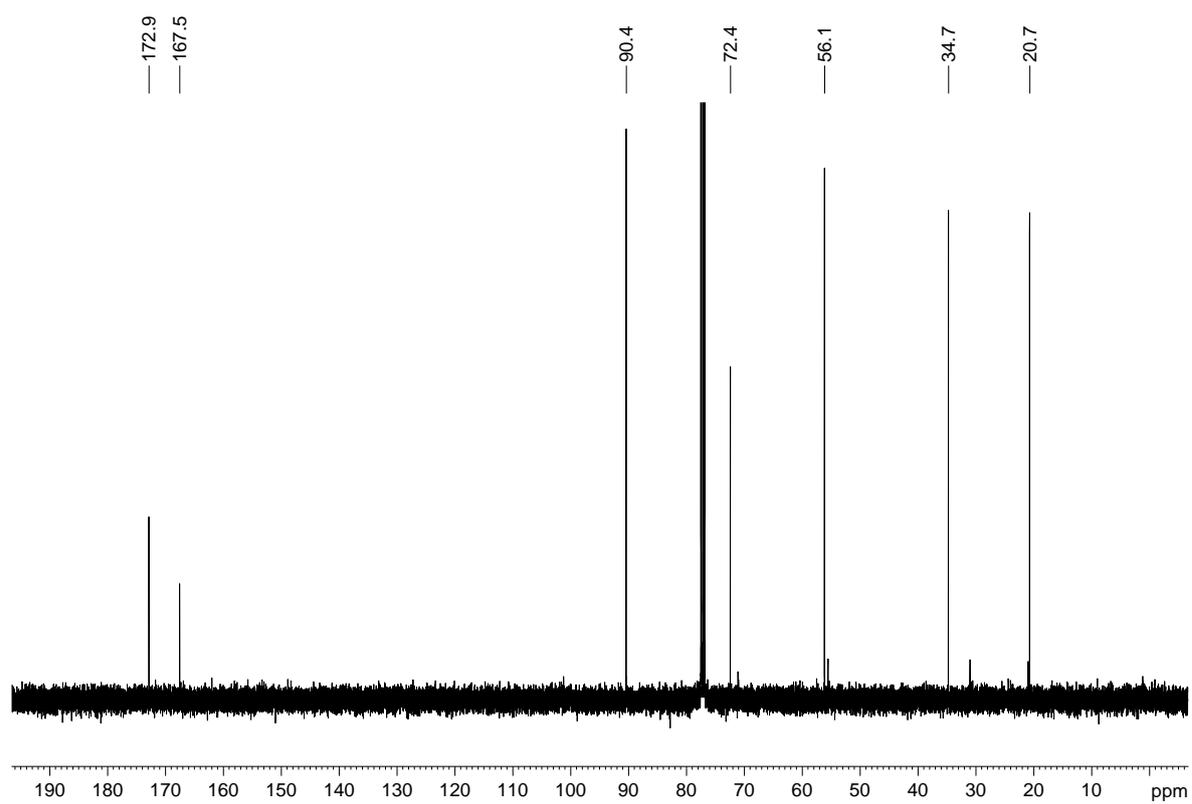
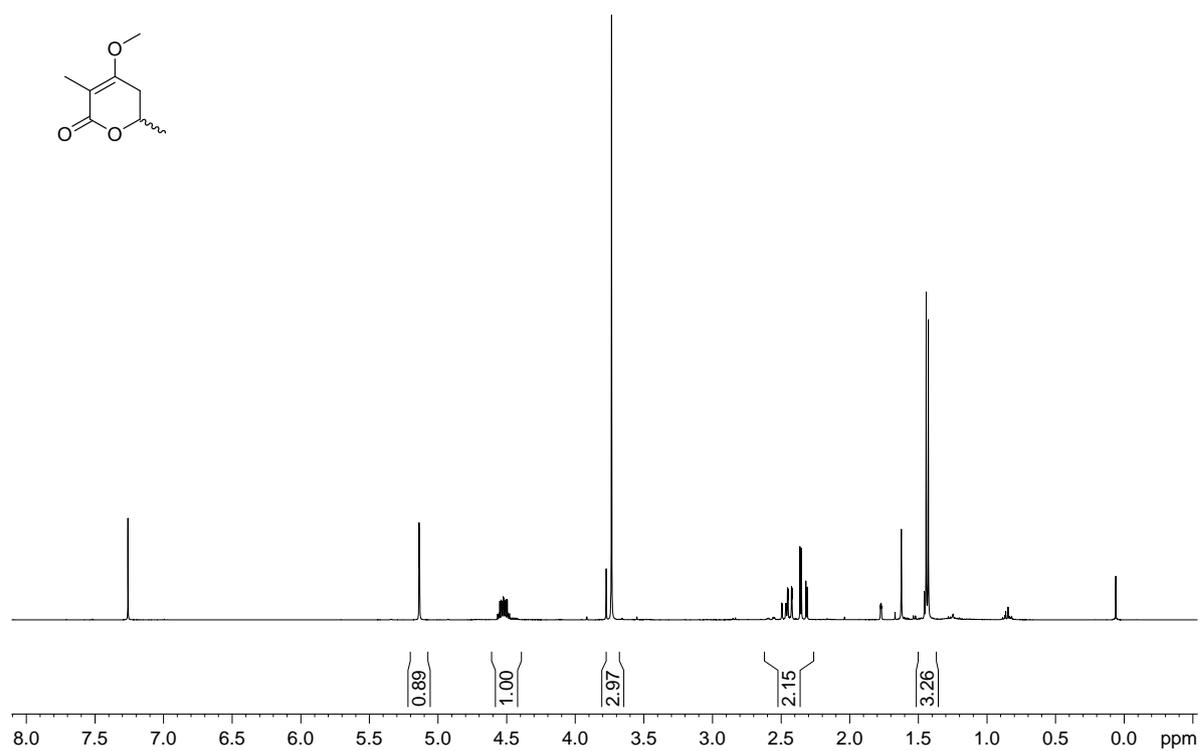




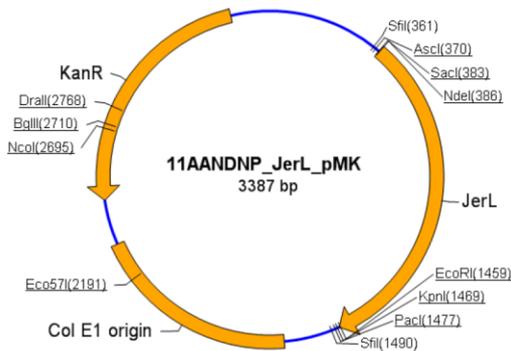
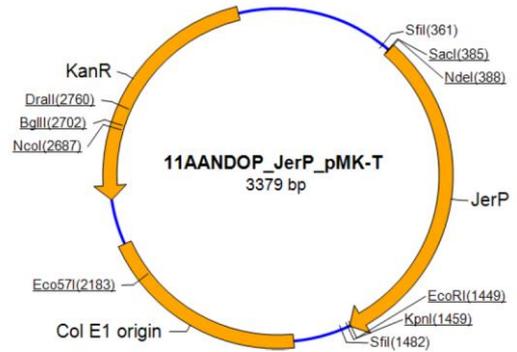
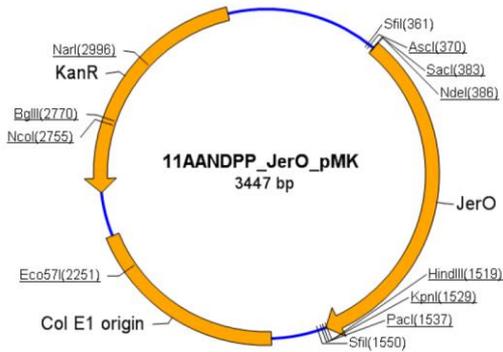
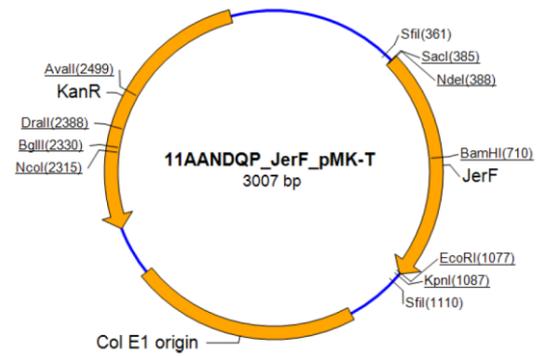
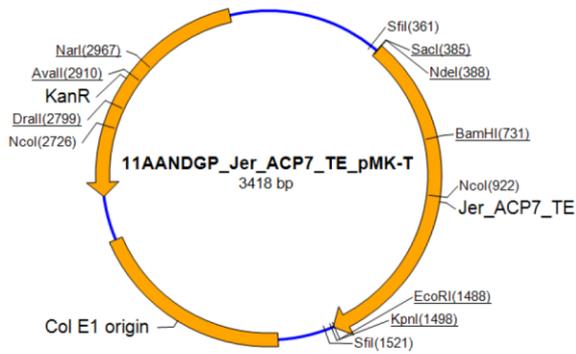








7.2 Synthetische Gene



>JerE7 (TE)

CGAATTGAAGGAAGGCCGTCAAGGCCACGTGTCTTGTCCAGAGCTCCATATGAGCCTGCGT
GATGTTCCGCCTGAAGAACGTCAGGGTGCACCTGGAACGTTTTGTTTCGTGAACAGCTGGCAG
CAGTTCTGCGTATGGATGCAGCACGTATTGAAGGTCAGACCACCATTAAAACCCTGGGTAT
TGATAGCCTGATGGCACTGGAAATTCGTAAACGTCTGGAAGCAGGTCTGGCAGTTACCCTG
CCGAGCACCTGATTTGGCAGTTTCCGCATGCAGAAGGCCTGGCACGTCATCTGATGACCC
GTCTGCCTGCCGGTGATGGTGAAGGTAGCGCAGTTGTTTCAGCCGGTGAACAGCCTCGTGC
ACCGAAAGAAGTTCCGGTTAGCATGGATCCGAGCGCATGGGTTTCATCGTCCGCGTCCGCGT
GCAGATGCACGTGTTTCGTCTGTTTTGTCTGCCGTATGCCGGTGCCGGTGCAAGCCGTTTTTC
GTGCATGGCCTGAGCTGCTGCCGAGTTGGGTTGAAGTTTGTCCGATTCAGCTGCCTGGTGC
TGAAGAACGCCTGCATGAACCGGCATTTGAAACCATGGATGCACCTGGTTGATGCCCTGGTT
CCGGCAGTTGAAGCACATATTGATCGTCCGTTTGCACCTGTTTGGTTGTAGCATGGGTGCC
TGCTGGCCTTTGAACTGGCACGTGCGCTGCAGAGCCGTCATCGTCTGGTTGCACGTCACCT
GTTTGGTGCAGCAAGCAGCAGTCCGCGTCTGTGTTAGTCCGGTGCGCGAACAGCTGAGTGCA
GTTGTTTTACCGGGTACAGTTCGTAGTGATGCAATGGCAAGCCTGCGTCAGCTGGGTCTGC
TGAGCAGCAGCAGCCTGCAGGATGAAGAAATGCTGGATGAAGTTTGGCCTGCATTTTCGTGC
AGATCTGAGCCTGACCCTGAAATATACCTGTCTGTGATGCAACACCGCTGGATGCACCGATT
AGCGTTTTTGGTGGCACCGAAGATCGTACCGTTGGTCGCGAAGATCTGGTTGCCTGGCATA
CCCTGACCAAAGATGCATTTTCAGGTTGCAATGCTGCCAGGTGGACACCTGTTTATGGATGC
CACCCCGAAACGTCTGTTTCATCACATTGAACATGCCCTGCAGCTGTAAGAATTCGGTACC
TGGAGCAAAGACTGGCCTCATGGGCCTTCCTTTCACTGC

>JerF

CGAATTGAAGGAAGGCCGTCAAGGCCACGTGTCTTGTCCAGAGCTCCATATGCGTACCAGT
GATGCAGTTTGGGCAGGCGCAGCAGGTTATACCCGTGCACGTCTGCAGGTTTATGATTTTT
TCATCTATGGCTTTAATAGTCCGGTGGCATGGAAATGTCCGGGTGAAGAACTGCTGGAAAA
CTATAATCGTCATGTGAGCGGTAATCATCTGGATGTTGGTGTGGCACCGGTTATCTGCTG
GATCGTTGTCGTTTTCCGACCGCAAACCGCGTGTTTTTCTGATGGATCTGAATCCGGATG
CACTGCAGGTTACCGCACAGCGTCTGCATCGTTTTTCAGCCGCAGACCCTGCGTCGTAATGT
TCTGGATCCGATTCGTTTTGATGGTGAACCGTTTGTAGCATCGGTATGAATTATCTGATG
CATTGTGTTCCGGGTAGCATTCCGGAAAAAGCAGTTATGTTTGTATCATCTGAGCGCACTGC
TGAAACCGGGTGGTGTATTTTTGGTAGCACCGTTCTGAGCGAAGGTGTTGATAAAGGTAT
TGTTGCACGTGCCATTATGGATCGCTTTAACAAAAAGGCATCTTCAGCAATACCCGTGAT
GCCGCAAGCGATCTGACCCGTGCCCTGGAAGAACGCTTTGATGATGTTAGCGTTCGTGTTG

TTGGTTGTGTTGGTCTGTTTAGCGCACGTAAACGTACCTGTGCAGGCACCGAAAGTCCGGC
ATAAGAATTCGGTACCTGGAGCACAAAGACTGGCCTCATGGGCCTTCCTTTCACTGC

>JerO

GGCGAATTGAAGGAAGGCCGTCAAGGCC TAGGCGCGCCATGAGCTCCATATGCATGTGGAA
GAATGCCATGTTGTTATTGTTGGTGCAGGTCCGAGCGGTCTGGCAGTTGGTGCATGTCTGC
GTGAACAGGGTATTCCGTTTGTCTGCTGGAAAAAGCGAAGCCGTTGGTGC AACCTGGCG
TCGTCATTATGATCGTCTGCATCTGAATACCATTAAACAGCTGAGCGCACTGCCTGGTCAG
CCGTGGCCTGAATATAGCGCACCGTATCCGAGCCGTGTTGAAATGGTTGATTATCTGGAAC
GTTATGCCGAACGTTTTTCGTCTGGAACCGCGTCTGGGTGTTGAAGTTGAACGTGCATATCA
TGATGGTAGCCGTTGGGTTACCCGTACCCATGCCGGTGAAGTGCCTAGCCAGGCACTGGTT
GTTGCAACCGGTTATAGCCGTCATCCGAATGTTCCGACCTGGCCTGATCAAGAACGCTTTC
GTGGTCGTATTCTGCATAGCAGCGCATATCGTAGCGGTGCAGAATTTCCGCGGTCAGCGTGT
TCTGGTGTGGGTGCCGGTAATAGCGCAAGCGAAATTGCACTGGATCTGTGGGAACATTGT
GCAGAAACCACCCTGAGCGTGCCTAGCGGTAATCATGTTATTCCGCGTGAAGTGTTTAAAC
TGCTGCACAGTTTAATGCACTGGCACTGTTTGAACGTCTGCCGCTGGCGGTTGGTGATCG
CCTGGCAACCGCAATTCTGAGCCGTGCAGTGGGTGATCTGAGTCGTTGGGGTATTTCGTCGT
CCGGCAGTGGGTCCTGGCACCCGTGCACTGAAAGAAGGTCGTATGCCGCTGATTGATATTG
GCACCGTTGCCCTGATT CAGCAGGGTAAAATCAAAGTTGTTCCGGGTCGCGTGCATTTAC
CGAAACCGGTGTTACCTTTACCGATGGTCTGGTCTGCCGTTTGATGTTGTTGTTCTGGCC
ACCGGTTATCGTCCGGTCTGGATGATTTTCTGGAAAATGCCACCCGTTATAACCGATGAAC
ATGGTTGTCCGCGTTGGCATGGTGCACCGACACCGGCACCGGGTCTGTTTTTTATCGGTTT
TCGTAATCCGATTACCGGTCAGATTCTGTGATATTGCAGCAGAAGCACCGCGTATTGCACGT
CATATTCAGGGTGTGAATTAAAAGCTTGGTACCTCTTAATTAAGTGGCCTCATGGGCCTTC
CTTTCACTGCCC

>JerP

CGAATTGAAGGAAGGCCGTCAAGGCCACGTGTCTTGTCCAGAGCTCCATATGGCAGAAGTGC
GATCATTGGCATCCGGTCTGCTGAGCCATGAACTGCGTCGTAAACCGCGTAATGTTTCGTC
TGCGAGGTCATGAAATTGTTGTTTTTCGTACCAGCAGCGGTGGTCTGGGTGCATTTACCGA
TCGTTGTCCGCATCGTAGCATGCGTCTGAGCGAAGGTTGGGTTGAAGGTGATCGTCTGGTT
TGTGCATATCATGGTTGGCGTTGGGCAGTTGATGGTCGTGGTGA AATTCCGGCAACACCGG
CAGCACGTCCGTGTGCACGTGCTGAAGATATGTTTGAAGCAGTTGAACGTTATGGTGCCAT
TTGGGTTAAACGTGCAGGTAGCCAGGCAGCATTTCCGCGTCTGGAAGGTGAAGGTTATGTT
CCGCGTGGTCTGCTGCGTCATCGTGCAACCGTTCCGTTTGAAGTGGCACTGGATAACTTTA

TCGAAATTGAACATACCCCGTTCGTGCATTTTATGCTGGGTATCCGCTGGAACGTATGCC
GGAAGTTGAAGCACGTGTTACCCTGACCGATGAAACCATTCGTGTTGTTTCATAGCGGTCCG
CGTCGTCCGATGCCTCGTGCAATGGAAAACTGCTGGGTATTCCGGAAGATGCCATTTTTG
TTGTTGATTGGACCAGCTATTTTAGCCCTGTGTATACCATTTATAACCATAGCCTGCGTGA
TCCGAAAACCAATCAGCCGGTTACCTTTCCGCTGCGTAGCGCAGTGTTTTTTAACCCGGTT
GGTCCGGAAAGCAGCGAAATGTATACCTTTCTGTTTGCAAGCCTGGCACCGTGGTCAAAT
TTGGTGCCGGTGCAGTTCTGTGGCTGCAATGCAGGTTGCAATGAATATTGAGCTGCGTCT
GGATATGCGTCTGCTGGATCGTCTGACAGATAAACGTGGTATTCTGAAAGGTAATGTGCTG
GGTCGTTTTGATAAACCGCTGGTTATTGCACGTGATCGTATTGATCGCATTTATCGTGGTC
GTGTTGCCGAAGCCGGTGATGGTCATGAAGCAGCCCGTCCGGCACGTCGTCTGCCGCTGGC
AGCACCGTTAGAATTCGGTACCTGGAGCACAAAGACTGGCCTCATGGGCCTTCCTTTCACTG
C

>JerL

GGCGAATTGAAGGAAGGCCGTCAAGGCCTAGGCGCGCCATGAGCTCCATATGTGTTATGGT
CTGGCAATGCATGCAGCACCGGCACGTGATCTGATTCGTCATTTTCATCCGGTTCTGCCTG
CAAGCAAACCTGGGTTCGTAACCGGTTTCGTGTTGTTCTGGCAGGTAATGCCTATGCACTGTT
TCGTGATGAACAGGGTCGTCCGGCAGCACTGGCAGATGCCTGTCCGCATCGTCTGGCACCG
CTGAGCCAGGGTCGTGTTTCGTCCGGATGGTCGTCTGGAATGTCCGTATCATGGTTGGCATT
TTGATGCCGAAGGTCGTGGTGCATGTCCGAGCCAGCCGAGCCTGACCCGTTGTGATACCCG
TAGCTTTCAGCTGGTTGAACAGCTGGGTTATCTGTGGCTGGCACATCGTGATACACCGCT
AGCGCACTGCCGGAACCTGGATTTTAGCAGTGATGGTTTTGAATATGCAGGCACCTTTAGCC
ATCTGGCACCCAGCACCGCTGCATGTTATTTTTGATAATAGCAGCGAAGATGAACACACCCC
GTTTGTTCATGGTCGCCTGGGTTGGACACCGGAAGATGCAGCACGTATTGATTTTAGTTGT
GATGTGTTTGAAGATCGCACCGAGGTGAAATATAGCGCACCGCAGCGTCCGAGCACCCCTGG
CACGTCTGATGCTGCTGCAGCCTGGTGATACCTTTCATAATCAGTGGGTTACCCGTTTTAG
TCCGGTTTATACCGTGTATACCAGTTGGTGGACCGCACAGAATGGTATGGAACGTCCGGTT
GTTGCCCGTGCAGGTATCTTTTTTGTTCGGAAACCGAACGTACCACCTTTGTTTCGTGCAT
TTCTGTTTGTGAAAATTACCGATCCGCGTTTTTCGTCCGCTGCTGCCGGTTGTTAAAAGCGC
AGCAATTGCACTGAGCTGGAAAGAAATCCGTGATGATGTGAAATTTATCCCGCATGTTGCA
GATACACCGTTTGAATGAAAGGCATGCGTCTGAACAAATATGATGCAACCCTGGTGCATA
ATCATCGGCTGATGCGTAGCATCTATTTTGGTGAACCCGTGGTGAAGCCGAAGGCACCGG
TGTTGGTCATGCAAGCGCATATAGAATTCGGTACCTCTTAATTAACCTGGCCTCATGGGCCTT
CCTTTCACTGCCC

Lebenslauf

Persönliches

Geboren am 08. Mai 1986,
in Cottbus,
ledig

Studium und Ausbildung

Seit 12/2011 Promotion in organischer Chemie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover
Thema: *„Untersuchungen zur Biosynthese von Polyketiden - Studien zur in-vitro-Aktivität der Tailoring-Enzyme aus der Jerangolid-Biosynthese“*
Betreuer: Prof. Dr. F. Hahn

10/2008 – 01/2011 Masterstudium der Chemie an der Universität Leipzig, Leipzig
Gesamtnote: 1,7
Thema der Masterarbeit: *„Synthese von monosubstituierten Piperidinen“* (Note: 1,7)
Betreuer: Prof. Dr. C. Schneider

10/2005 – 09/2008 Bachelorstudium der Chemie an der Universität Leipzig, Leipzig
Gesamtnote: 2,0
Thema der Bachelorarbeit: *„Beiträge zur organokatalytischen, vinylogenen Mannich-Reaktion“* (Note: 1,0)
Betreuer: Prof. Dr. C. Schneider

06/2005 Abitur
Ludwig-Leichhardt-Gymnasium, Cottbus

Promotionsbegleitende

Tätigkeiten

12/2011 – 10/2014 Betreuung von 1 Masterarbeit,
2 Bachelorarbeiten,
5 Forschungs- oder Vertiefungsarbeiten

Wissenschaftliche Präsentationen

[1] Poster; Orchem 2014 (Weimar); *In vitro* reconstruction of the post-PKS pathway of the jerangolid biosynthesis.

[2] Poster; 1st European Conference on Natural Products 2013 (Frankfurt am Main); *In vitro* reconstruction of the post-PKS pathway of the jerangolid biosynthesis.

[3] Poster und Kurzvortrag; Tagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie 2013 (Frankfurt am Main); *In vitro* reconstruction of the post-PKS pathway of the jerangolid biosynthesis.

Wissenschaftliche Publikationen

[1] "Opportunities for enzyme catalysis in natural product chemistry." Friedrich, S.; Hahn, F. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1473-1508.

[2] "Synthesis of Complex Intermediates for the Study of a Dehydratase from Borrelidin Biosynthesis." Hahn, F.; Kandziora, N.; Friedrich, S.; Leadlay, P. F. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 634-640.

Danksagung

Beginnend möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Frank Hahn für sein entgegengebrachtes Vertrauen und seine Unterstützung während meiner Zeit als Doktorand am OCI und BMWZ bedanken.

Bei Prof. Dr. Andreas Kirschning bedanke ich mich für die uneingeschränkte und freundliche Unterstützung der Arbeitsgruppe Hahn und für die Übernahme des Zweitgutachtens und der Zweitprüferschaft.

Einen besonderen Dank gebührt Dr. Gerald Dräger für seine Unterstützung durch sein außergewöhnliches technisches *Know-How* und sein Organisationstalent.

Ich bedanke mich weiterhin bei allen Mitarbeitern der NMR- und Massenspektrometrie-Abteilungen am OCI, sowie allen technischen Mitarbeitern am OCI und BMWZ. Besonders möchte ich mich hierbei bei Katja Körner für ihr enormes Engagement bedanken und dafür, dass stets genügend autoklavierte 500-mL-Kolben und LB-Medium im Biostore für mich bereitstanden. Bei Edda Jansen und Marcel Armbrrecht möchte ich mich für ihre Arbeiten in den Biolabs des OCI bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gehört allen meinen lieb gewonnenen Laborkollegen. Für die erste Zeit im Labor 120 bedanke ich mich ganz herzlich bei M. Sc. Nadine Kandziora, Dr. Jekaterina Hermene, Dipl.-Biol. Anja Heutling und M. Sc. Gesche Berkhan. Letztere stand mir auch auf der „Baustelle“ in Labor 320 und später auch im „Schwimmbad“ im Labor 114 als Laborkollegin stets zur Seite. Bei der Folgegeneration der „Hähnchen“ möchte ich mich im Einzelnen bedanken bei Franziska Hemmerling, Marius Schröder und Frederick Lindner. Marius und Freddy wünsche ich einen unkomplizierten Start und viel Erfolg in Bayreuth. Den Masterstudenten des Arbeitskreises Hahn danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die schönen Zeit außerhalb des Labors. Dazu gehören Hendrik, Anna, Claudia, Karen, und Timm. Ich bedanke mich beim gesamten Arbeitskreis Kirschning/Dräger in den jeweiligen Besetzungen zwischen 2011 und 2015. Insbesondere bedanke ich mich bei meinen hochgeschätzten Kollegen Gerrit Jürjens, Jana Franke, Thomas Schmidt, Jenny Barbier, Jan Hartwig, Jens Wegner, Andreas Krause, Lena Möller, Stephan Cludius-Brandt und Andreas Kipke. Weiterhin bei Egor Geist, Diplom-Chemiker Nick Dibbert, Michael Wolling, Jonas Ammermann, Benjamin Schröder, Katja Seidel, Ilona Bulyszko, Dr. Lukas Kupracz, Dr. Maria Moreno, Dr. David Candito, Dr. Liangliang Wang, Dr. Argyrios Kanakis und Dr. Nazar Pidlypnyi.

Ich bedanke mich weiterhin bei den aktuellen und ehemaligen Arbeitsgruppen des OCI und BMWZ: AK Gaich, AK Boysen, AK Kalesse, AK Butenschön und AK Cox. Dr. Carsten Zeilinger möchte ich für zahlreiche Flurgespräche und Anregungen danken. Für GC- und HPLC-Troubleshooting danke ich Dr. Wladimir Solodenko und Dipl.-Chem. Wojciech Dziechciejewski.

Im Speziellen danke ich Gesche für die Klärung der „wirklich wichtigen Fragen des Lebens“. Nadine danke ich für schonungslose Kritik bei unsachgemäßer Flüssigstickstoff-Entsorgung und für Fahrten mit der Sommerrodelbahn Hahnenklee. Ich danke Mike Boysen für zahlreiche, außergewöhnliche Motto-Abende. Lukas Kupracz und Francesco Trenti danke ich für die vielen schönen Stunden des gemeinsamen Musizierens. In großer Verbundenheit danke ich Egor, Dave und Nick für eine gemeinsame Zeit und insbesondere für die prägenden Stunden im Gym. Gerrit und Jan danke ich für epische Paintball-Schlachten, Trashfilm- und Bierverkostungsabende und für das gemeinsame Ausüben des Sternenhandwerks.

Ich danke Gesche, Jonas und Hendrik für die Korrekturen an dieser Arbeit. Ebenfalls danke ich dem Sekretariat des OCI und des BMWZ, insbesondere Frau Griese und Frau Struckmeier für die unkomplizierte Hilfe in komplizierten organisatorischen Fragen.

Abschließend möchte ich mich von tiefsten Herzen bei meiner Familie und all meinen Verwandten bedanken für die jahrelange, bedingungslose Unterstützung und den überaus starken Rückhalt. Schließen möchte ich mit einem ganz persönlichen Dank an Sabrina für Ihre Geduld und Zuversicht.