

Neue Methoden zur synthetischen und mikrobiellen Naturstoffderivatisierung

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie

der Technischen Universität Dortmund

angenommene

Dissertation

von

M.Sc. Stephan Klopries

aus Bottrop-Kirchhellen

Dekanin: Prof. Dr. Insa Melle

1. Gutachter: Prof. Dr. Frank Schulz

2. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann

Eingereicht am: 09.10.2014

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2014

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Frank Schulz an der Fakultät für Chemie an der Technischen Universität Dortmund, am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann und an der Ruhr-Universität Bochum im Zeitraum vom Oktober 2010 bis Oktober 2014.

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen veröffentlicht bzw. sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Quantification of Incorporation of N-acetylcysteamin activated Methylmalonate into Polyketides Biosynthesis, S. Klopries, U. Sundermann, F. Schulz, *Beilstein J. Org. Chem.* **2013**, 9, 664–674.

Enzyme-Directed Mutasynthesis: A Combined Experimental and Theoretical Approach to Substrate Recognition of a Polyketide Synthase, U. Sundermann, K. Bravo-Rodriguez, S. Klopries, S. Kushnir, H. Gomez, E. Sanchez-Garcia, F. Schulz, *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8, 443–450.

Exploration of biosynthetic access to the shared precursor of the fusicoccane diterpenoid family, J. Arens, B. Engels, S. Klopries, S. Jennewein, C. Ottmann, F. Schulz, *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 4337-4339.

Biosynthesis with Fluorine, S. Klopries, Kyra R. M. Koopmans, E. Sanchez-Garcia, F. Schulz, *ChemBioChem*, **2014**, 15, 495-497.

Predicted Incorporation of Non-Native Substrates by a Polyketide Synthase yields Bioactive Natural Product Derivatives, K. Bravo-Rodriguez, A. F. Ismail-Ali, S. Klopries, S. Kushnir, S. Ismail, A. Wittinghofer, F. Schulz, E. Sanchez-Garcia, *ChemBioChem*, **2014**, 15, 1991-1997.

Substrate Flexibility of a Mutated Acyltransferase Domain: Implications for Polyketide Biosynthesis, K. Bravo-Rodriguez, S. Klopries, K. R. M. Koopmans, U. Sundermann, S. Yahiaoui, J. Arens, E. Sanchez-Garcia, F. Schulz, **2014**, zur Veröffentlichung eingereicht.

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Frank Schulz danke ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die gute Betreuung. Besonders für die interessanten Themenstellungen, die freie Hand bei der experimentellen Durchführung und die Möglichkeit eigene Ideen zu entwickeln und ihnen nachzugehen zu dürfen.

Für die Übernahme des Koreferats, sowie die Möglichkeit meine Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu dürfen und so von der gesamten Infrastruktur profitieren zu können, danke ich Herrn Prof. Dr. Herbert Waldmann.

Meinen ehemaligen Masterstudenten und jetzigen Nachfolger Niclas Pryk, sowie meiner ehemaligen Masterstudentin Christina Nöcker, und meiner ehemaligen Bachelor Studentin Kim-Elisabeth Schlipkoeter danke ich für ihre Arbeit die sie geleistet haben.

Meinen Azubis Ilka Hinzer, Marvin Fröse, Dennis Ernst, Linda Kronenberg, Malte Metz, und Sascha Gerber, die häufig die undankbare Aufgabe hatten unbequeme Synthesrouten zu testen.

Meinen Praktikanten Andrea Ernst, Sandra Börding, Benjamin Heinz, David Möller, Lucas Robke, Dominic Danielsiek, Thomas Dunkel, Christine Schulz, Alexander Dreger, Isabelle Kohtz und Youssef Slibi für das Nachziehen von Stufen.

Dr. Uschi Sundermann, Julia Arens, Kyra Koopmans, Ahmed Ali und Dr. Susanna Kushnir „meinen“ Biologen, danke ich für die Kooperation in den einzelnen Projekten.

Dem gesamten AK Schulz und der AG Waldmann danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre. Dem Analytik-Team um Dr. Petra Janning danke ich für die Bestimmung akkurater Massen sowie der Hilfe in analytischen Fragestellungen.

Unserer Kooperationspartnerin Dr. Elsa Sanchez-Garcia sowie Ihrer Arbeitsgruppe vom MPI in Mülheim danke ich für die Modellierungen der AT-Domänen.

Marco Potowski meinen langjährigen Studienkollegen und meiner Familie für die ganze Unterstützung, die ich immer bekommen habe. Ich danke meinen Eltern, dass sie immer für mich da sind.

Danke

„Experience is simply the name we give our mistakes.”

Oscar Wilde

1 Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Inhaltsverzeichnis..... | 1 |
| 2 | Einleitung..... | 9 |
| 2.1 | Polyketide..... | 9 |
| 2.2 | Biosynthese der Polyketide..... | 10 |
| 2.3 | Derivatisierung von Polyketiden..... | 16 |
| 3 | Zielsetzung..... | 20 |
| 4 | Ergebnisse und Diskussion..... | 22 |
| 4.1 | Generierung neuartiger Polyketide mittels vorläuferdirigierte Biosynthese..... | 22 |
| 4.2 | Generierung neuartiger Polyketidderivate mittels Mutasynthese..... | 23 |
| 4.2.1 | Mutasynthese neuer Rapamycinderivate..... | 24 |
| 4.2.2 | rapK-Blockmutanten der Rapamycin-Starteinheit..... | 27 |
| 4.2.3 | Synthese der Cyclohexancarbonsäurederivate..... | 28 |
| 4.2.4 | Fermentation von NRRL 5491 und der rapK-Blockmutanten..... | 31 |
| 4.3 | Fazit und Diskussion..... | 44 |
| 4.4 | Die Entwicklung einer enzymgerichteten Mutasynthese am Beispiel des Erythromycins..... | 48 |
| 4.4.1 | Chemomikrobieller Einbau von artifiziellen Malonaten in Erythromycin..... | 48 |
| 4.5 | Studien zur Substratspezifität von <i>cis</i> - und <i>trans</i> - agierenden Acyltransferasen | 50 |
| 4.5.1 | <i>cis</i> -AT Ansatz..... | 50 |
| 4.5.2 | <i>trans</i> -AT Ansatz..... | 51 |
| 4.6 | Analyseplattform für die gerichtete Evolution einer <i>trans</i> -AT..... | 52 |
| 4.6.1 | Aufbau der Malonsäurederivate und Reporter-moleküle..... | 54 |
| 4.6.2 | Syntheseplanung des Reporter-moleküls für Azidomalonate..... | 55 |
| 4.6.3 | Synthese von 7-Hydroxycumarinsäure (70) und 7-Acetoxycumarinsäure (76) | 56 |
| 4.6.4 | Synthese des Cyclooctin (72)..... | 56 |
| 4.6.5 | Synthese des Polyethylenlinker (71)..... | 57 |
| 4.6.6 | Syntheseversuche zur Darstellung des Reporter-moleküls (74)..... | 57 |
| 4.6.7 | Design und Synthese eines alternativen Cyclooctin/Cumarin-Linkers..... | 60 |
| 4.6.8 | Synthese des Reporter-moleküls (93)..... | 60 |
| 4.6.9 | Syntheseplanung des Reporter-moleküls für Alkinmalonate..... | 61 |
| 4.6.10 | Synthese des Azidomethylpyridin (98)..... | 62 |
| 4.6.11 | Synthese des Reporter-moleküls (99)..... | 63 |
| 4.6.12 | Diskussion..... | 63 |
| 4.7 | Chemomikrobieller Einbau nicht-nativer Malonate durch „Enzymgeleitete Mutasynthese“ (cis-AT-Projekt)..... | 65 |
| 4.7.1 | Quantifizierung der Einbauraten von <i>N</i> -Acetylcysteamin aktivierten Methylmalonat in der Biosynthese von Polyketiden..... | 65 |
| 4.7.1.1 | Synthese von D ₃ -MMSNAC (103)..... | 67 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.7.1.2 | Fütterungsexperimente | 69 |
| 4.7.1.3 | Einbauraten von D ₃ -MMSNAC in Erythromycin..... | 70 |
| 4.7.1.4 | Einbauraten von D ₃ -MMSNAC in Rapamycin..... | 72 |
| 4.7.1.5 | Quantifizierung des Einflusses durch SNAC-Aktivierung..... | 74 |
| 4.7.1.6 | Diskussion | 74 |
| 4.7.2 | Synthese von SNAC-aktivierten Malonsäurederivaten | 76 |
| 4.7.2.1 | Synthese von Propargyl-MSNAC (109)..... | 76 |
| 4.7.2.2 | Entwicklung neuartiger Syntheserouten zur Darstellung von Propargyl-MSNAC (109)..... | 77 |
| 4.7.2.3 | Darstellung präparativer Mengen von Propargylmalonsäure (109) | 79 |
| 4.7.2.4 | Darstellung neuer Malonsäurederivate mittels reduktiver Alkylierung..... | 80 |
| 4.7.2.5 | Zusammenfassung zur Darstellung von Alkylmalonsäuren | 81 |
| 4.7.2.6 | Versuche zur Darstellung verschieden funktionalisierter SNAC-Malonsäurederivate | 84 |
| 4.7.2.7 | Diskussion | 87 |
| 4.7.3 | Screening der Mutantenbibliothek auf Substratpromiskuität..... | 90 |
| 4.7.3.1 | Betrachtung des Modells der AT6 _{DEBS} -Region und Generierung der V295A-Variante | 91 |
| 4.7.3.2 | Diskussion und Ausblick | 94 |
| 4.7.4 | Substratpromiskuität der V295-Varianten..... | 95 |
| 4.7.4.1 | Ergebnisse und Diskussion..... | 95 |
| 4.7.4.2 | Fütterungsexperimente | 95 |
| 4.7.4.3 | <i>In silico</i> Versuche..... | 98 |
| 4.7.4.4 | Modellierung der AT6 _{DEBS} mit nicht-nativen Substraten..... | 99 |
| 4.7.4.5 | Vergleich der Fütterungs- und Modellierungsergebnisse | 100 |
| 4.7.4.6 | Diskussion | 100 |
| 4.8 | Einbau nicht-nativer Substrate durch eine Polyketidsynthese führt zu neuen Monensin- und Premonensinderivaten | 102 |
| 4.8.1 | Monensin und Premonensin | 102 |
| 4.8.2 | Molekulares Modelling der AT5 _{mon} -Domäne..... | 113 |
| 4.8.3 | Diskussion | 114 |
| 4.9 | Die biologische Aktivität von Premonensin und dessen Derivaten | 115 |
| 4.9.1 | Synthese neuer Premonensinderivate | 117 |
| 4.9.2 | Diskussion und Ausblick | 121 |
| 4.10 | Versuche zur Darstellung neuer Fusicoccadien Derivate..... | 122 |
| 4.10.1 | Diterpene und ihr Potenzial..... | 122 |
| 4.10.2 | Semisynthetischeransatz zur Synthese des 16-Methoxy-Fusicoccadien..... | 126 |
| 4.10.3 | Versuche zur Synthese von 16-OMe-FCdien durch allylische Bromierung.... | 130 |
| 4.10.4 | Versuche zur allylischen Oxidation mit Quecksilber(II)acetat | 131 |
| 4.10.5 | Weitere Versuche zur allylischen Oxidation mit Cobalt- und Mangansalzen in Gegenwart von TBHP oder Pyridiniumchlorochromat..... | 132 |

| | | |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.10.6 | Diskussion und Ausblick | 132 |
| 5 | Zusammenfassung..... | 134 |
| 6 | Experimenteller Teil | 142 |
| 6.1 | Analysemethoden..... | 142 |
| 6.1.1 | NMR-Spektroskopie..... | 142 |
| 6.1.2 | Massenspektroskopie GC- MS | 142 |
| 6.1.3 | Massenspektroskopie LC-ESI-MS | 143 |
| 6.1.3.1 | LC-ESI-MS Analytik..... | 143 |
| 6.1.3.2 | Hochauflösende Massen Spektrometrie (HRMS)..... | 147 |
| 6.1.4 | IR-Spektroskopie | 147 |
| 6.1.5 | Spezifische optische Drehung $[\alpha]_D^{20}$ | 148 |
| 6.1.6 | Schmelzpunktbestimmung..... | 148 |
| 6.1.7 | Säulenchromatographie..... | 148 |
| 6.1.8 | Dünnschichtchromatographie (DC)..... | 148 |
| 6.2 | Präparative Verfahren und Reagenzien | 150 |
| 6.2.1 | Präparative Verfahren..... | 150 |
| 6.2.2 | Reagenzien | 150 |
| 6.2.3 | Synthese von Lithiumdiisopropylamin (LDA)..... | 150 |
| 6.3 | Verwendete Puffer für die Fütterungsexperimente mit D ₃ -Markierung..... | 150 |
| 6.3.1 | Verwendete Puffer für Erythromycin-Varianten | 150 |
| 6.3.2 | Verwendete Puffer für Rapamycin-Varianten | 151 |
| 6.4 | Umgang und Entsorgung von Aziden, Tetrazolen, Cyaniden, Cr(VI)-Verbindungen und Halogenen | 151 |
| 6.4.1 | Umgang und Entsorgung von Aziden | 151 |
| 6.4.2 | Umgang und Entsorgung von Tetrazolen..... | 151 |
| 6.4.3 | Umgang und Entsorgung von Cr(VI)-Verbindungen..... | 152 |
| 6.4.4 | Umgang und Entsorgung von Cyaniden | 152 |
| 6.4.5 | Umgang und Entsorgung von Br ₂ und I ₂ | 152 |
| 7 | Synthese der Verbindungen..... | 153 |
| 7.1 | Synthese von Cyclohept-4-encarbonsäure (51) ^[80, 81] | 153 |
| 7.2 | Synthese von Cyclooc-4-encarbonsäure (52) ^[80, 81] | 154 |
| 7.3 | Synthese von (1S, 4S) 4-Hydroxycyclohexancarbonsäureethylester (29) ^[320] | 155 |
| 7.4 | Synthese von (<i>R</i>)-3-Oxocyclohexancarbonsäureethylester (41) | 156 |
| 7.5 | Synthese von (1 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *)-3-(Methylsulfonyloxy)-cyclohexancarbonsäureethylester (35) | 157 |
| 7.5.1 | Synthese von (1 <i>R</i> *,5 <i>S</i> *)-6-oxabicyclo[3.2.1]octan-7-on (33) ^[322] | 157 |
| 7.5.2 | Synthese von (1 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *)-3-Hydroxycyclohexancarbonsäureethylester (34)... .. | 158 |
| 7.5.3 | Synthese von (1 <i>R</i> *, 3 <i>S</i> *)-3-(Methylsulfonyloxy)-cyclohexancarbonsäureethylester (35) | 159 |

| | | |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 7.5.4 | Synthese von (1 <i>R</i> *, 3 <i>R</i> *)-3-(Azido)-cyclohexancarbonsäureethylester (37) .. | 160 |
| 7.5.5 | Synthese von (1 <i>R</i> *, 3 <i>R</i> *)-3-(Acetylthio)cyclohexancarbonsäureethylester (36) | 161 |
| 7.6 | Synthese (<i>R</i> *)-5-Oxocyclohex-3-encarbonsäureethylester (32) | 162 |
| 7.6.1 | Synthese von (1 <i>R</i> *, 5 <i>R</i> *)-6-Oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-7-on (30) ^[323] | 162 |
| 7.6.2 | Synthese von (1 <i>R</i> *, 5 <i>R</i> *)-5-Hydroxycyclohex-3-encarbonsäureethylester (31) | 163 |
| 7.6.3 | Synthese von (<i>R</i> *)-5-Oxocyclohex-3-encarbonsäureethylester (32)..... | 164 |
| 7.7 | Synthese von (1 <i>s</i> , 4 <i>s</i>)-4(-Hydroxymethyl)-cyclohexancarbonsäureethylester (47) | 165 |
| 7.7.1 | Synthese von (1 <i>s</i> ,4 <i>s</i>)-Diethylcyclohexan-1,4-dicarboxylat (43) | 165 |
| 7.7.2 | Synthese von (1 <i>s</i> , 4 <i>s</i>)-Cyclohexandicarbonsäuremonoethylester (45)..... | 166 |
| 7.7.3 | Synthese von (1 <i>s</i> , 4 <i>s</i>)-4(-Hydroxymethyl)-cyclohexancarbonsäureethylester (47) | 167 |
| 7.8 | Synthese von (1 <i>r</i> , 4 <i>r</i>)-4(-Hydroxymethyl)-cyclohexancarbonsäureethylester (48) | 168 |
| 7.8.1 | Synthese von (1 <i>r</i> , 4 <i>r</i>)-Diethylcyclohexan-1,4-dicarboxylat (42) | 168 |
| 7.8.2 | Synthese von (1 <i>r</i> , 4 <i>r</i>)-Cyclohexandicarbonsäuremonoethylester (44) | 169 |
| 7.8.3 | Synthese von (1 <i>r</i> , 4 <i>r</i>)- 4(-Hydroxymethyl)-cyclohexancarbonsäureethylester (46) | 170 |
| 7.8.4 | Synthese von (1 <i>r</i> , 4 <i>r</i>)-Ethyl-4-(tosyl)-cyclohexancarboxylat (48) | 171 |
| 7.8.5 | Synthese von (1 <i>r</i> , 4 <i>r</i>)-4-((Acetylthio)methyl)cyclohexancarbonsäureethylester (49) | 172 |
| 7.8.6 | Synthese von (1 <i>r</i> , 4 <i>r</i>)-4-(Azidomethyl)-cyclohexancarbonsäureethylester (50) | 173 |
| 7.9 | Synthese von 7-Acetoxy-2-oxo-2H-chromen-3-carbonsäure (76) | 174 |
| 7.9.1 | Synthese von 7-Hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-carbonsäureethylester (75).. | 174 |
| 7.9.2 | Synthese von 7-Hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-carbonsäure (70) | 175 |
| 7.9.3 | Synthese von 7-Acetoxy-2-oxo-2H-chromen-3-carbonsäure (76) ^[148] | 176 |
| 7.10 | Synthese von 2-(7-(Dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)essigsäure (89) ^[157] | 177 |
| 7.10.1 | Synthese von Ethyl 2-(7-(dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetat (215) ^[157] | 177 |
| 7.10.2 | Synthese von 2-(7-(Dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)essigsäure (89) ^[157] | 178 |
| 7.11 | Synthese von 6-((Azido)methyl)nicotinat (98) ^[142] | 179 |
| 7.11.1 | Synthese von Synthese von 6-(Hydroxymethyl)nicotinsäuremethylester (100) ^[142] | 179 |
| 7.11.2 | Synthese von Synthese von 6-((Azido)methyl)nicotinsäuremethylester (102) ^[142] | 180 |
| 7.11.3 | Synthese von 6-((Azido)methyl)nicotinat (98) ^[142] | 181 |
| 7.12 | Synthese von <i>tert</i> -Butyl-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy) ethoxy) ethoxy) propyl)- carbammat (71)..... | 182 |
| 7.12.1 | Synthese von <i>tert</i> .-Butyl-3-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoat (80) ^[324] | 182 |

| | | |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 7.12.2 | Synthese von <i>tert.</i> -Butyl-3-(2-(2-(2-methylsulfonylethoxy) ethoxy) ethoxy) propanoat (81) | 183 |
| 7.12.3 | Synthese von <i>tert.</i> -Butyl-3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoat (82) | 184 |
| 7.12.4 | Synthese von <i>tert.</i> -Butyl-3-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoate (71) | 185 |
| 7.13 | Synthese von 2-(2-(2-(2-(7-(Dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl) acetoxyl) ethoxy) ethoxy) ethyl 6-(azidomethyl) nicotinat (99) | 186 |
| 7.13.1 | Synthese von 2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl 2-(7-(Dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetat (97) | 186 |
| 7.13.2 | Synthese von 2-(2-(2-(2-(7-(Dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl) acetoxyl) ethoxy) ethoxy) ethyl 6-(azidomethyl) nicotinat (99) | 187 |
| 7.14 | Synthese von Cyclooct-2-yn-1-yl-(4-nitrophenyl) carbonat (92) ^[146] | 188 |
| 7.14.1 | Synthese von 8,8-Dibromobicyclo[5.1.0]octan (78) ^[146] | 189 |
| 7.14.2 | Synthese von (E)-2-Bromocyclooct-2-enol (77) ^[151] | 190 |
| 7.14.3 | Synthese von Cyclooct-2-ynol (72) ^[146] | 191 |
| 7.14.4 | Synthese von Cyclooct-2-yn-1-yl (4-nitrophenyl) carbonat (92) ^[146, 147] | 192 |
| 7.15 | Synthese von Cyclooct-2-yn-1-yl-(1-(7-(dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-2-oxo-7, 10, 13-trioxa-3-azahexadecan-16-yl)carbamat (93) | 193 |
| 7.15.1 | Synthese von <i>tert.</i> -Butyl-(1-(7-(dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-2-oxo-7, 10, 13-trioxa-3-azahexadecan-16-yl)carbamat (94) | 194 |
| 7.15.2 | Synthese <i>N</i> -(3-(2-(2-(3-Aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-2-(7-(dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl) acetamid (91) | 195 |
| 7.15.3 | Synthese Cyclooct-2-yn-1-yl-(1-(7-(dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-2-oxo-7, 10, 13-trioxa-3-azahexadecan-16-yl)carbamat (93) | 196 |
| 7.16 | Synthese von TMS-EBX (217) ^[200] | 197 |
| 7.16.1 | Synthese von 1-Hydroxyl-1,2-benziodoxol-3(1H)-on (216) ^[200] | 197 |
| 7.16.2 | Synthese von 1-[(Trimethylsilyl)ethynyl]-1,2-benziodoxol-3(1H)-on (TMS-EBX) (217) ^[200] | 198 |
| 7.17 | Synthese von CoA-Mimetika | 199 |
| 7.17.1 | Synthese von N-Acetylcysteamin (SNAC) (218) ^[114] | 199 |
| 7.17.2 | Synthese von S-(2-Acetamidoethyl)ethanethioat (AcSNAC) (219) | 200 |
| 7.17.3 | Synthese von S-(2-Acetamidoethyl) 3-oxobutanethioat (222) (AcAcSNAC) .. | 201 |
| 7.17.3.1 | Synthese von Lithium 3-oxobutanoat (220) ^[325] | 201 |
| 7.17.3.2 | Synthese von 3-Oxobutanoat (221) ^[326] | 201 |
| 7.17.3.3 | Synthese von S-(2-Acetamidoethyl) 3-oxobutanethioat (222) ^[326] | 202 |
| 7.18 | Synthese von 1-Azido-2-iodoethan (225) ^[201] | 203 |
| 7.18.1 | Synthese von 2-Azidoethanol (223) ^[201] | 203 |
| 7.18.2 | Synthese von 2-Azidoethyl-4-methylbenzensulfonat (224) ^[201] | 204 |
| 7.18.3 | Synthese von 1-Azido-2-iodoethan (225) ^[201] | 205 |
| 7.19 | Synthese von 2-Bromoethylmethansulfonat (226) | 206 |
| 7.20 | Synthese von 2-Iodoethyl-4-methylbenzensulfonat (227) | 207 |

| | | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 7.21 | Synthese von (3-Iodopropoxy)trimethylsilan (228)..... | 208 |
| 7.22 | Synthese von 3-((2-Acetamidoethyl)thio)-2-D ₃ -methyl-3-oxopropansäure (103) | 209 |
| 7.22.1 | Synthese von 3-(<i>tert.</i> -Butoxy)-2-D ₃ -methyl-3-oxopropansäure (105)..... | 209 |
| 7.22.2 | Synthese von <i>tert.</i> -Butyl-3-(2-acetamidoethylthio)-2-D ₃ -methyl-3-oxopropanoat (106) | 210 |
| 7.22.3 | Synthese von 3-((2-Acetamidoethyl)thio)-2-D ₃ -methyl-3-oxopropansäure (103) | 211 |
| 7.23 | Synthese der Malonsäurederivate (116, 118, 122, 160) | 212 |
| 7.24 | Synthese von Cyclopropan-1,1-dicarbonensäure (155) ^[189] | 214 |
| 7.25 | Synthese der Meldrums Säurederivate (117, 119, 123) ^[189] | 215 |
| 7.26 | Synthese von 3-(2,2-Dimethyl-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-yl)propannitril (161) | 218 |
| 7.27 | Synthese der Meldrums Säurederivate (126, 127, 129-131) durch reduktive Alkylierung ^[190] | 219 |
| 7.28 | Synthese 5-Isopropyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (128) durch reduktive Alkylierung ^[190] | 223 |
| 7.29 | Synthese von 5-Bromo-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (178) ^[210] | 224 |
| 7.30 | Synthese von 5-(Hydroxymethylen)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (230) ^[327] | 225 |
| 7.30.1 | Synthese von 5-(Methoxymethylen)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dion (229) ^[327] | 225 |
| 7.30.2 | Synthese von 5-(Hydroxymethylen)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dion (230) ^[327] | 226 |
| 7.31 | Synthese von 2,2-Dimethyl-4,6-dioxo-5-(pyridin-1-ium-1-ylmethyl)-1,3-dioxan-5-id (231) ^[328] | 227 |
| 7.32 | Synthese der <i>tert.</i> -Butylmalonsäuren (107, 120, 125, 138-143)..... | 228 |
| 7.33 | Synthese von 2-(<i>tert.</i> -Butoxycarbonyl)-4-cyanobutansäure (162) ^[197] | 233 |
| 7.34 | Synthese von 3-(<i>tert.</i> -Butoxy)-2-(cyanomethyl)-3-oxopropansäure (152) | 234 |
| 7.34.1 | Synthese von 1- <i>tert.</i> -Butyl 3-methyl 2-(cyanomethyl)malonat (151) | 234 |
| 7.34.2 | Synthese von 3-(<i>tert.</i> -Butoxy)-2-(cyanomethyl)-3-oxopropansäure (152)..... | 235 |
| 7.35 | Synthese von <i>tert.</i> -Butylmalonsäure-SNAC-Ester (108, 121, 125, 138-143, 153, 163) | 236 |
| 7.36 | Synthese von Malonsäure-SNAC-Ester (109, 144-150) | 243 |
| 7.37 | Synthese von Triethyl prop-2-yn-1,1,1-tricarboxylat (166) | 248 |
| 7.38 | Synthese von 1- <i>tert.</i> -Butyl-1,1-dimethylmethanetricarboxylat (169)..... | 249 |
| 7.39 | Synthese von 1- <i>tert.</i> -Butyl-3-methyl 2-allyl-2-((tosyloxy)methyl)malonat (175) . | 250 |
| 7.39.1 | Synthese von 1- <i>tert.</i> -Butyl-3-methyl-2-allylmalonat (173)..... | 250 |
| 7.39.2 | Synthese von 1- <i>tert.</i> -Butyl-3-methyl-2-allyl-2-(hydroxymethyl)malonat (174) . | 251 |
| 7.39.3 | Synthese von 1- <i>tert.</i> -Butyl-3-methyl-2-allyl-2-((tosyloxy)methyl)malonate (175) | 252 |
| 7.39.4 | Synthese von 1- <i>tert.</i> -Butyl-3-methyl 2-allyl-2-cyano-malonat (232) | 253 |
| 7.40 | Synthese von Diethyl-2-allyl-2-(2-bromoethyl)malonat (233) | 254 |
| 7.41 | Synthese von 2-(2-bromoethyl)malonsäurediethylester (234)..... | 255 |
| 7.42 | Synthese von 2-(1H-tetrazol-5-yl)acetohydrazid (192)..... | 256 |

| | | |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 7.43 | Synthese von Ethyl 1H-Tetrazol-5-carboxylat (235) ^[330] | 257 |
| 7.44 | Synthese von Di-Kalium-5-carboxyltetrazolat(236) ^[330] | 258 |
| 7.45 | Premonensinderivatisierung | 259 |
| 7.45.1 | Synthese von Cyanopremonensin A (195)..... | 259 |
| 7.45.2 | Synthese von Cyanosemicarbazolpremonensin A (193)..... | 259 |
| 7.45.3 | Synthese von Tetrazolpremonensin A (194) | 259 |
| 7.45.4 | Synthese von Hydrazonpremoniensin A (196)..... | 260 |
| 8 | Abkürzungen und Akronyme | 261 |
| 9 | Literaturverzeichnis | 266 |
| 10 | Strukturverzeichnis..... | 277 |
| 10.1 | Rapamycin Starteinheiten | 277 |
| 10.2 | Cumarine | 279 |
| 10.3 | Cyclooctin | 280 |
| 10.4 | Nicotinsäureazid..... | 281 |
| 10.5 | Linker | 282 |
| 10.6 | Reporter-molekül..... | 283 |
| 10.7 | Malonsäurederivate..... | 284 |
| 10.8 | Meldrums Säurederivate | 285 |
| 10.9 | <i>Tert.</i> -Butylmalonsäurederivate | 287 |
| 10.10 | <i>Tert.</i> -Butylmalonsäure-SNAC-Ester..... | 289 |
| 10.11 | Malonsäure-SNAC-Ester..... | 290 |
| 10.12 | Andere Malonsäurederivate | 291 |
| 10.13 | 2-Bromethanolderivate und TMS-EBX | 292 |
| 10.14 | CoA-Mimetika | 293 |
| 10.15 | Tetrazole | 294 |
| 10.16 | Testreaktionen Premonensinderivate | 295 |
| 11 | Eidesstattliche Erklärung..... | 296 |
| 12 | Curriculum vitae | 297 |
| 13 | Anhang | 298 |
| 13.1 | Fragmentierungsmuster | 298 |
| 13.1.1 | Fragmentierungsmuster von Propargylerythromycin ^[212] | 298 |
| 13.1.2 | Fragmentierungsmuster von Monensinderivaten ^[231] | 299 |
| 13.2 | LC-ESI-MS-Chromatogramme der Verbindungen | 301 |
| 13.2.1 | LC-MS-Chromatogramm von Propylpremonensin | 301 |
| 13.2.2 | LC-MS-Chromatogramm von Butylpremonensin..... | 302 |
| 13.2.3 | LC-MS-Chromatogramm von Allylpremonensin | 303 |
| 13.2.4 | LC-MS-Chromatogramm von Propargylpremonensin | 304 |
| 13.2.5 | LC-MS-Chromatogramm von Allylpremonensin ER2 ⁰ | 305 |
| 13.2.6 | LC-MS-Chromatogramm von Propylpremonensin ER2 ⁰ | 306 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------|------------------------------------------------|-----|
| 13.2.7 | LC-MS-Chromatogramm von Allylmonensin | 307 |
| 13.2.8 | LC-MS-Chromatogramm von Propargylmonensin..... | 307 |

2 Einleitung

Durch die stetige Zunahme an Antibiotikaresistenzen zählen Infektionskrankheiten weltweit zu den häufigsten Todesursachen. Sie verursachen einen volkswirtschaftlichen Schaden, der pro Land ~1,6% des Bruttoinlandsprodukt entspricht.^[1] Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (engl.: World Health Organization, kurz: WHO) sterben jedes Jahr rund 25.000 Menschen in der Europäischen Union (EU) an bakteriellen Infektionen, die durch antibiotikaresistente Keime hervorgerufen werden.^[1] Nach Schätzungen der WHO besteht zudem ein 25%iges Risiko in Europa an Krebs zu erkranken und ein 12,5%iges Risiko an Krebs zu sterben.^[2] Diese Zahlen veranschaulichen die Notwendigkeit der Entwicklung bzw. Weiterentwicklung neuer Antibiotika oder Tumortherapeutika. Eine sehr viel versprechende Basis solcher neuen Arzneimittel können Naturstoffe sein. Von den derzeit mehr als 1.000.000 bekannten Naturstoffen besitzen etwa 25% einen potenziellen industriellen oder pharmazeutischen Nutzen.^[3, 4] Obwohl Naturstoffe aufgrund ihrer zum Teil moderaten Stabilität, schwierig für medizinische Anwendung nutzbar zu sind^[5], beruhen 26% aller Arzneimittel die von 1981 bis 2010 für den Markt zugelassen worden sind, auf Naturstoffen oder Naturstoffderivaten.^[6] Dies verdeutlicht das Potenzial dieser Verbindungen für die Medizin.

2.1 Polyketide

Eine der größten bekannten Naturstoffklassen sind die Polyketide. Dabei handelt es sich um Sekundärmetabolite, die aus Bakterien, Pilzen und Pflanzen isoliert werden.^[7, 8] Sie dienen Organismen häufig als Pigmente, Virulenzfaktoren oder als Boten- und Abwehrstoffe.^[8, 9] Polyketide und Polyketidderivate finden eine breite Anwendung als Arzneien in der Human- und Veterinärmedizin.^[8, 10-12] Sie besitzen z.B. antibiotische, fungizide, antivirale, antiparasitäre, immunsuppressive oder antikarzinogene Eigenschaften.^[10, 11] Die Struktur der Polyketide ist äußerst vielfältig und häufig auch sehr komplex. So zählen zu dieser Naturstoffklasse unter anderem Polyether, Polyene, Polyphenole, Makrolide und Endiine (Abbildung 1). Die Komplexität dieser Verbindungen ist auf einfachste Bausteine zurückzuführen. So werden diese Moleküle basierend auf einer kontrollierten Verknüpfung von Acetat oder Propionat erzeugt.^[8] Basierend auf dem biosynthetischen Ursprung unterscheidet man zwischen aromatischen und reduzierten Polyketiden. Aromatische Polyketide entstehen aus den Polyketonketten innerhalb der Polyketidbiosynthese und werden durch Typ-II-Polyketidsynthasen (Typ-II-PKS) aufgebaut.^[13] Diese Enzymkomplexe basieren auf nichtkovalenten Wechselwirkungen und sind aus relativ kleinen Enzymen zusammengesetzt.^[8, 14] Reduzierte Polyketide resultieren aus der zusätzlichen Reduktion dieser Polyketone.^[15] Diese Biosynthesen werden von außergewöhnlich großen, Typ-I-PKS

Einleitung

katalysiert. Typ-I-PKS bilden ein molekulares Fließband, in dem für jeden Reaktionsschritt eine festgelegte Enzymdomäne zuständig ist.^[8, 14, 15]

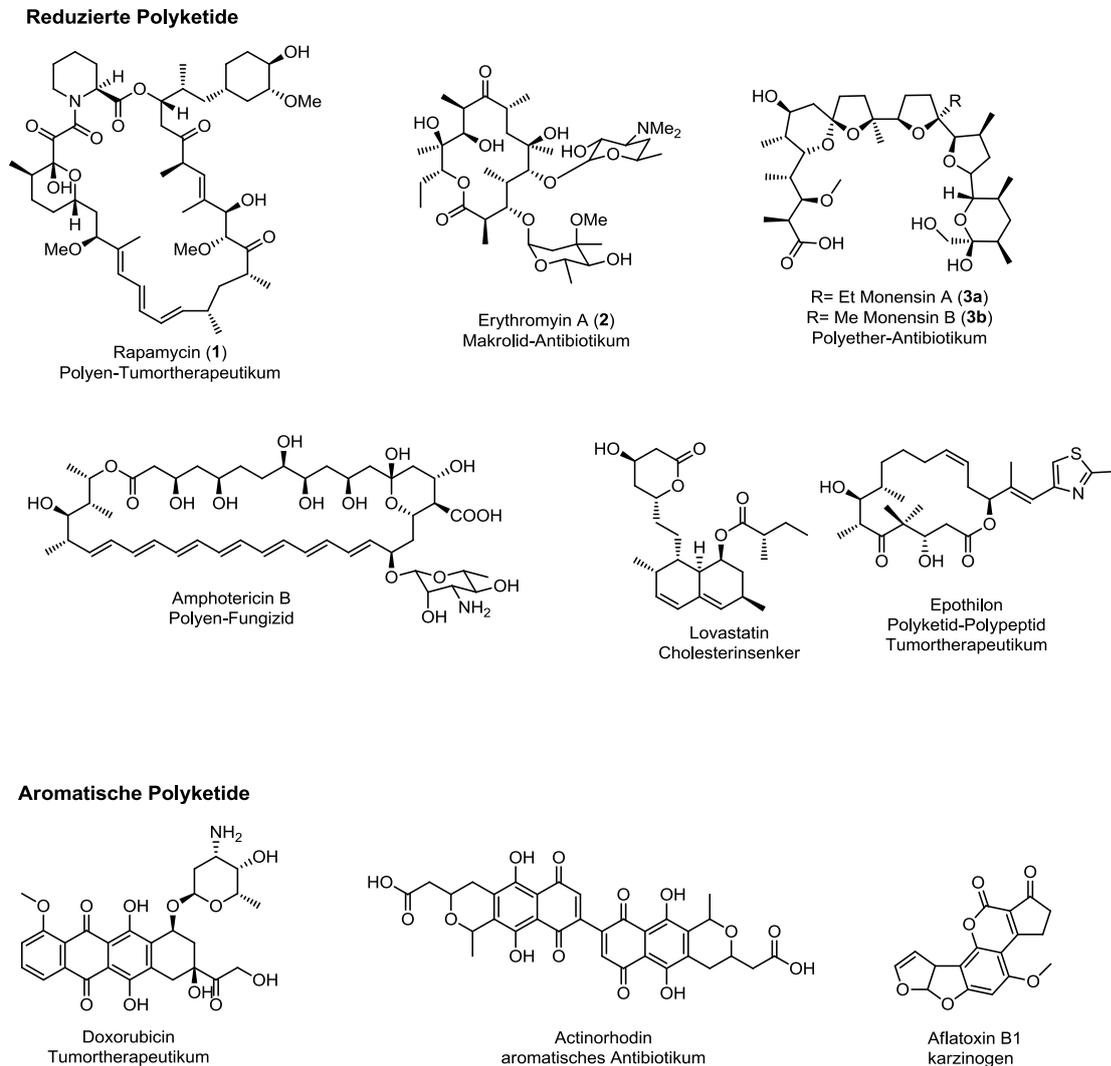
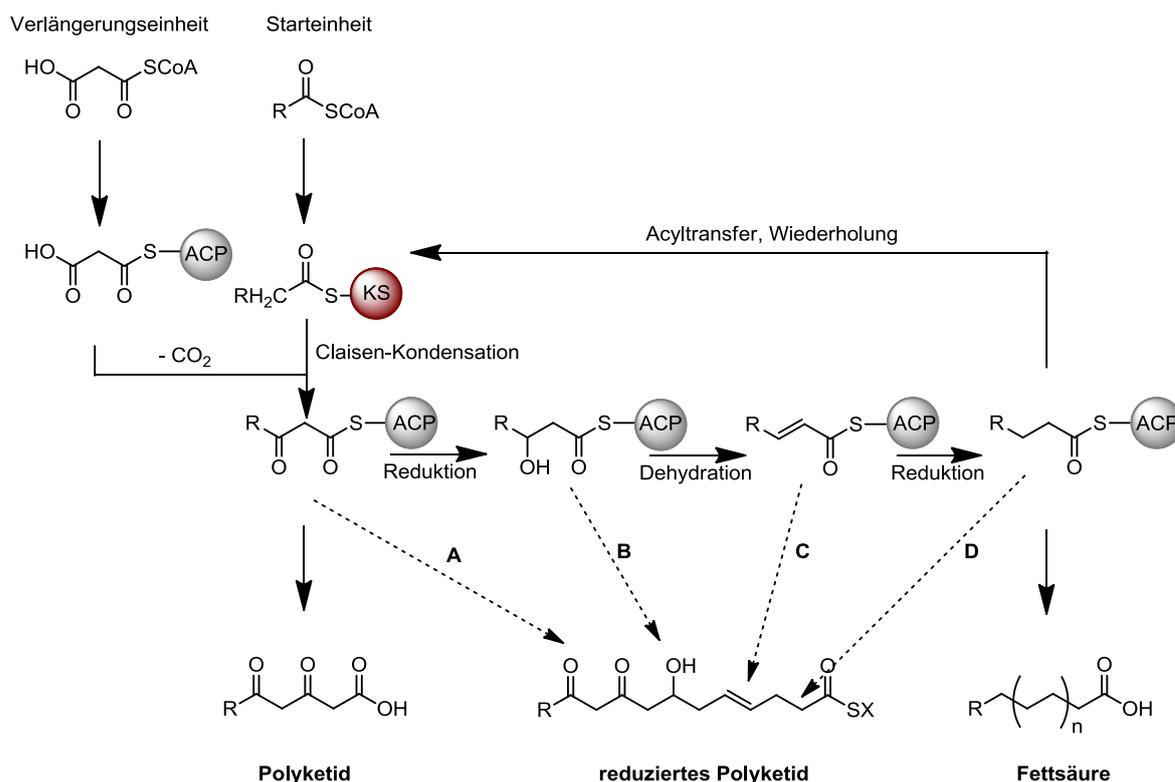


Abbildung 1: Reduzierte und aromatische Polyketide mit ihrer jeweiligen Bioaktivität.

2.2 Biosynthese der Polyketide

Die enorme Vielfalt und Komplexität dieser Moleküle ist genetisch codiert. Es wurde damit begonnen, die für die Biosynthese und Stereochemie verantwortlichen Enzyme zu klonieren, isolieren und zu charakterisieren.^[14, 16] Die Biosynthese der Polyketide besitzt viele Analogien zur Fettsäurebiosynthese (FAS, Schema 1).^[17, 18] Von beiden Enzymklassen wird eine decarboxylierende Claisen-Kondensation katalysiert, die Acetyl-CoA und Malonyl-CoA in β -Ketoacylpolymere überführt. Dabei ist die wachsende Kette fortlaufend an den Enzymen über einen Thioester gebunden.^[17, 19] In der Fettsäurebiosynthese wird das Keton des β -Ketoester nach jedem Kondensationsschritt vollständig reduziert, bevor eine weitere

Kondensation mit Malonyl-Coenzym A (MCoA) erfolgen kann.^[20] Bei Polyketiden kann eine wesentlich größere Vielfalt erzeugt werden, weil die reduktiven Schritte optional stattfinden können. Dadurch lässt sich ein breiteres Spektrum an Oxidationsmustern bilden, das sowohl Ketone, Hydroxyl- oder Enoylgruppen aufweisen kann. Außerdem akzeptieren PKS potenziell verschiedene Start- und Endeinheiten.^[14, 21, 22]

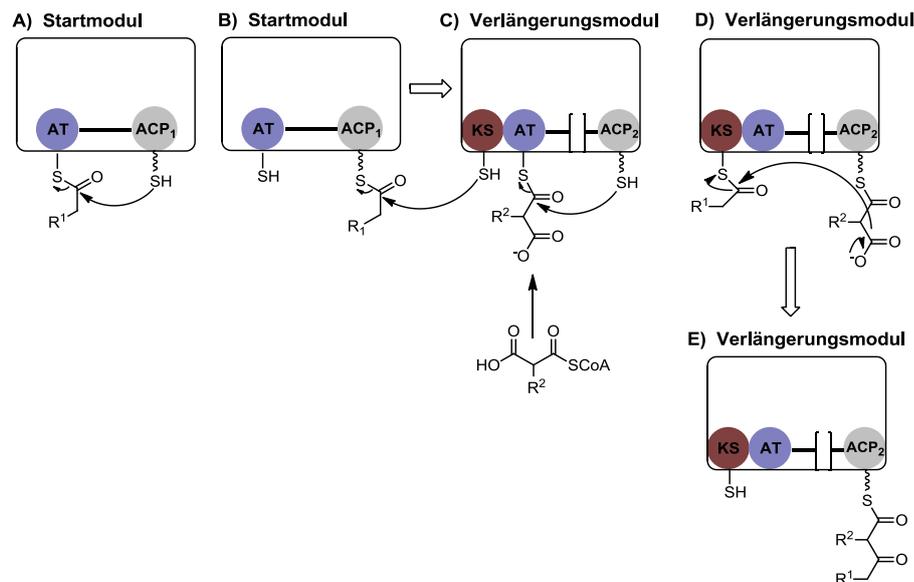


Schema 1: Analogien zwischen Fettsäurebiosynthese und der Polyketidbiosynthese. Die wachsende Kette wird sowohl in der Fettsäurebiosynthese, als auch in der Polyketidbiosynthese durch eine Reihe von Claisen-Kondensationen aufgebaut. Diese Kondensationsschritte werden durch Ketosynthasen (KS) katalysiert. In der Fettsäurebiosynthese wird das Keton des β -Ketoesters nach jedem Kondensationsschritt vollständig reduziert, bevor eine weitere Kondensation mit Malonyl-Coenzym A (MCoA) erfolgen kann. Bei aromatischen Polyketiden entfallen die Reduktionsschritte des β -Ketoesters vollständig. Der dadurch entstehende Polyketoester wird durch enzymkatalysierte intramolekulare Zyklisierungsreaktion zum Aromaten umgesetzt. Bei reduzierten Polyketiden können in der Verlängerungsregion eine Mischung aus Ketonen, Hydroxyl, Doppelbindungen und Methylengruppen auftreten, je nachdem wie viele Redox-Domänen der β -Ketoester durchläuft. CoA= Coenzym A, ACP= Acyl Carrier Protein, KS= Ketosynthase. Schema in Anlehnung an D. A. Hopwood.^[21]

Die PKS der Polyketidbiosynthese werden in drei Typen unterteilt.^[13] Bei Typ-I-PKS sind die katalytischen Domänen miteinander assoziiert und formen ein molekulares Fließband.^[14, 19] Typ-II-PKS besitzen dissoziierbare Enzymkomplexe monofunktionaler Enzyme.^[13] Als Typ-III-PKS werden multifunktionelle Enzyme des Chalkonsynthase-Typ bezeichnet.^[8, 13] Die klare Klassifizierung der PKS in die bisherigen drei Typen ist jedoch nicht mehr eindeutig, da die Entdeckung und Erforschung neuer Biosynthesewege in jüngster Zeit tiefere Einsichten

Einleitung

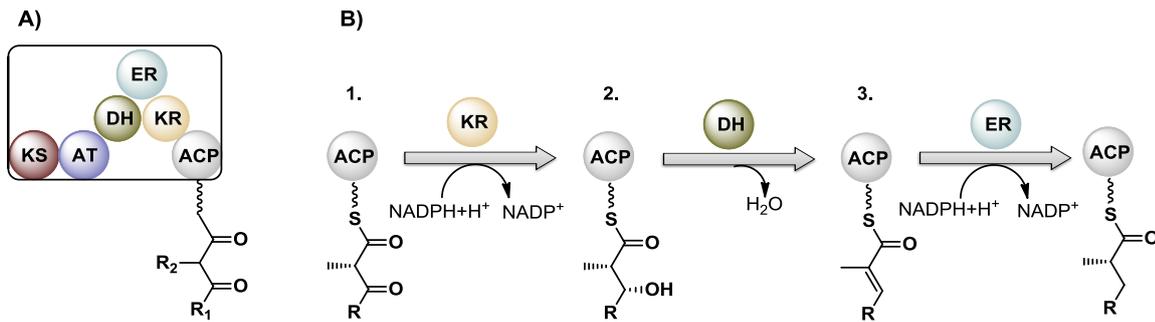
in die komplexe Funktionsweise der PKS ermöglicht.^[13, 23] Die Polyketide und deren Derivate mit denen sich die folgende Arbeit beschäftigt, werden von bakteriellen Typ-I-PKS katalysiert. Dazu soll im Folgenden auf die Biosynthese und die Funktion der einzelnen Module der Typ-I-PKS eingegangen werden. Bakterielle Typ-I-PKS gehören durch ihre modulare Struktur zu den größten bekannten Enzymen. Zunächst werden die einzelnen Polyketidbausteine unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) in die entsprechenden Coenzym A-Ester (CoA-Ester) überführt. Die CoA-aktivierten Polyketidbausteine und die heranwachsende Polyketidkette sind dabei fortwährend als Thioester an einem Acylcarrierprotein (ACP) gebunden.^[19, 24, 25] Für die Polyketidketten-verlängerung sind mehrere Schritte notwendig, die ohne Berücksichtigung anschließender reduktiver Schritte in Schema 2 wiedergegeben werden. Die Acyltransferase (AT) des Startmoduls wählt ein Acetyl-CoA-Derivat und überträgt dieses auf das ACP₁ (Schema 2B). ACP₁ überträgt den Acetylrest auf die Ketosynthase (KS) des Verlängerungsmoduls. Zeitgleich wird die AT des Verlängerungsmoduls mit einer Methylmalonsäure- oder Malonsäure-CoA-Ester beladen (Schema 2C). Diese werden auf das ACP₂ des Verlängerungsmoduls übertragen. Sobald sich das mit der Malonsäure beladene ACP₂ in räumliche Nähe befindet, katalysiert die KS der Verlängerungseinheit eine decarboxylierende Claisen-Kondensation und verknüpft somit den Acylrest mit der Malonsäure (Schema 2D).^[12] Das so entstehende, um eine Methylgruppe verlängerte Ketid, befindet sich am ACP₂ und kann nun auf ein weiteres Modul übertragen werden (Schema 2E).^[26]



Schema 2:Grundlagen der Polyketidkettenverlängerung. Es existieren verschiedene Architekturen des Startmoduls, die häufigste ist hier dargestellt. Gezeigt wird wie Acetyl über eine decarboxylierende Claisen-Kondensation mit Malonyl verknüpft wird. **A:** Die Acyltransferase (AT) des Startmoduls wählt ein Acetyl-CoA-Derivat. **B:**Die AT überträgt dieses Acetyl-CoA-Derivat auf das Acylcarrierprotein 1 (ACP₁) **C:**ACP₁ überträgt den Acetylrest auf die Ketosynthase (KS) des Verlängerungsmoduls. Zeitgleich wird die AT des Verlängerungsmoduls mit einem Methylmalonsäure- oder Malonsäure-CoA-Ester (MCoA, MMCoA) beladen **D:** MCoA oder MMCoA werden auf das ACP₂ des Verlängerungsmoduls übertragen. Sobald sich das mit der Malonsäure beladene ACP₂ in räumliche Nähe befindet, katalysiert die KS der Verlängerungseinheit eine decarboxylierende Claisen-Kondensation und verknüpft somit den Acylrest mit der Malonsäure. **E:**Das um eine Methylgruppe verlängerte Ketid befindet sich am ACP₂ und kann nun auf ein weiteres Modul übertragen werden.^[26]

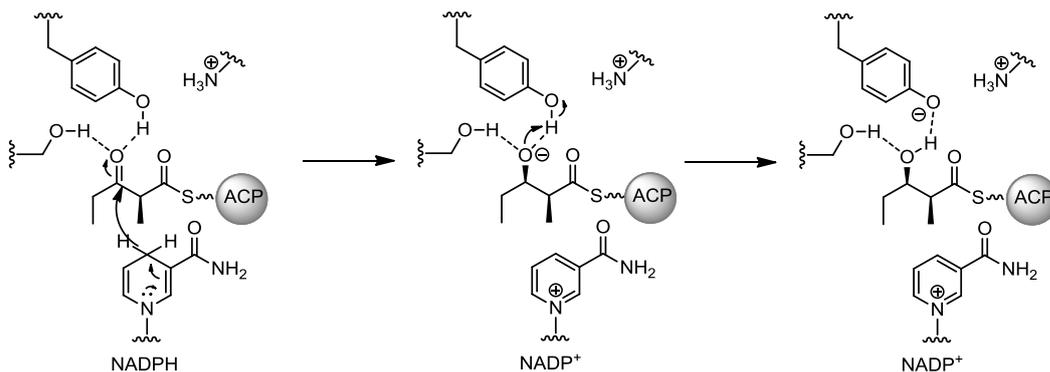
Enthalten die Module zusätzlich zu den essentiellen Domänen AT, KS, und ACP optionale reduktive Domänen, wie die Ketoreduktase (KR), Dehydratase (DH) und Enoylreduktase (ER), kann der β -Ketothioester reduziert werden (Schema 3). Somit kann das β -Carbonyl des Thioesters weiter in eine Hydroxy-, Methen-, oder Methylengruppe überführt werden. In Schema 3A wird eine vollständige reduktive Schleife gezeigt. Durch Module, die unvollständige reduktive Schleifen besitzen, z.B. nur KR und DH oder nur KR, werden weniger stark reduzierte Muster in der heranwachsenden Kette ermöglicht.

Einleitung



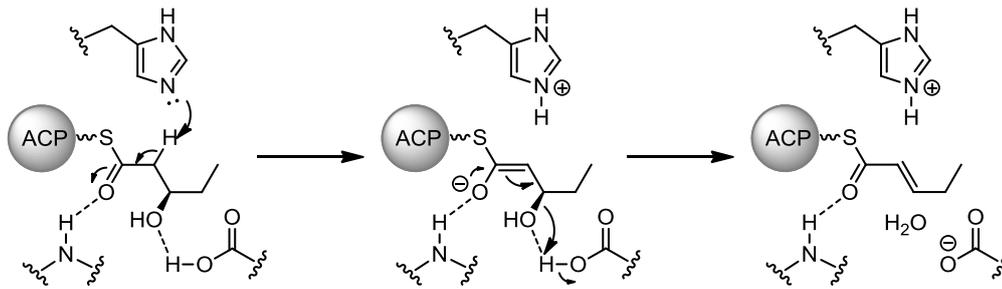
Schema 3: Ketoreduktase (KR), Dehydratase (DH) und Enyldreduktase (ER) bilden eine reduktive Schleife innerhalb einer modularen PKS. **A.** Aufbau eines Typ-I-PKS Moduls mit den reduktiven Domänen KR, DH, ER; **B.** Schritte des β -Ketothioesters durch die einzelnen reduktiven Domänen. **1:** Der β -Ketothioester wird von der KR unter $\text{NADPH} + \text{H}^+$ Verbrauch selektiv zum β -Hydroxyketothioester reduziert. **2:** Die DH bildet den α, β -ungesättigten Thioester unter Eliminierung von Wasser. **3:** Die ER bildet den vollständig gesättigten Thioester unter Verbrauch von $\text{NADPH} + \text{H}^+$.

Die Reduktion des β -Ketothioester in den β -Hydroxythioester erfolgt durch die KR-Domäne. Dabei wird das Keton selektiv zum Alkohol, mit NADPH als Co-Faktor, reduziert.^[27]



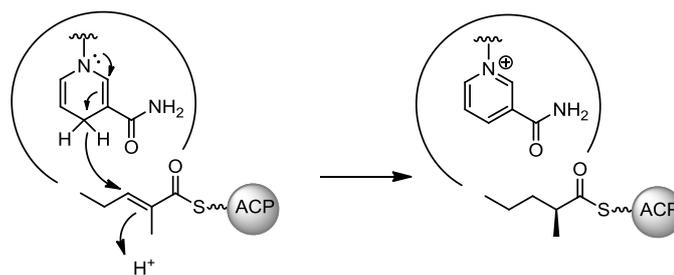
Schema 4: Vereinfachte Darstellung der selektiven Reduktion eines β -Ketothioesters zum β -Hydroxythioester.^[27]

Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen des Serin und Tyrosin mit dem β -Ketothioester, wird das Keton aktiviert und durch NADPH reduziert. Das so entstehende Alkoholat wird vom Tyrosin protoniert. Die dadurch entstehende negative Ladung wird durch eine benachbarte Amoniumgruppe eines Lysins stabilisiert (Schema 4).^[27-33] Der entstandene β -Hydroxythioester wird mit Hilfe der DH-Domäne in ein Alken überführt. Die Dehydratisierung erfolgt über eine Histidin/Asparagin-Diade (Schema 5). Histidin deprotoniert das α -C-Atom des β -Hydroxythioester. Das so gebildete Enolat wird durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit einem Amid stabilisiert.^[34]



Schema 5: Dehydratisierungsmechanismus mit vermuteten Keto-/Enol-Übergangszustand.^[34]

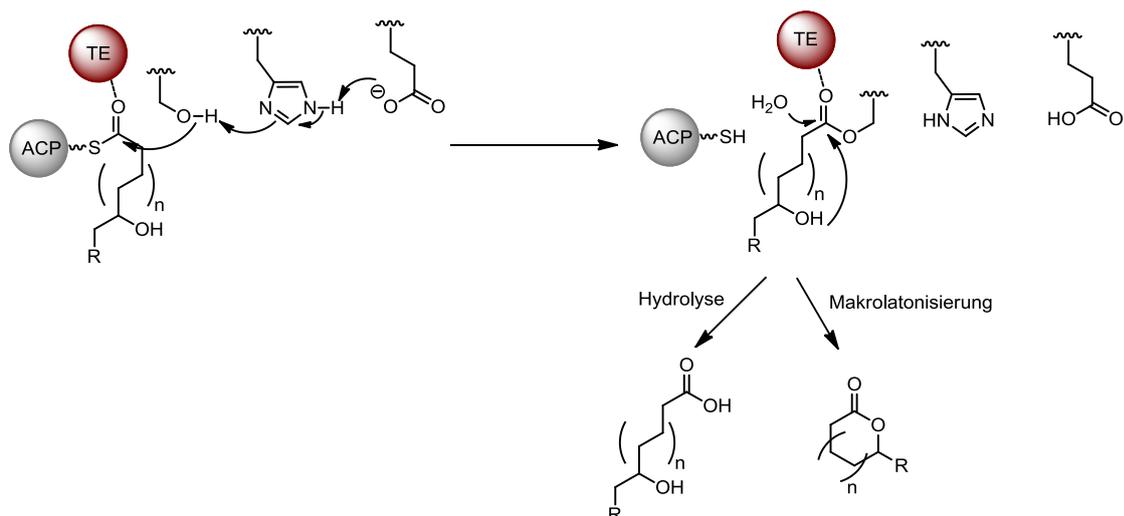
Das sich, zur β -Hydroxylgruppe, in räumlicher Nähe befindende Asparagin protoniert die Hydroxylgruppe und ermöglicht deren Eliminierung. Die daraus resultierende Doppelbindung kann durch die ER zu einer vollständig gesättigten Verlängerungseinheit führen. Hierzu dient NADPH ebenfalls als Reduktionsmittel (Schema 6). Das Rossmannmotiv der Enoylreduktase bindet dabei selektiv NADPH und bringt das Reduktionsmittel in räumlicher Nähe zur Doppelbindung.^[35, 36]



Schema 6: Vereinfachter Mechanismus der Reduktion einer Doppelbindung.

Die heranwachsende Polyketidkette bleibt während ihrer Synthese permanent in Form eines Thioesters am Multienzymkomplex gebunden. Da die Größe des Multienzymkomplexes proportional zur Länge der Polyketidkette ist, befindet sich an deren Ende eine terminale Thioesterase (TE), die je nach ihrer Beschaffenheit eine Makrolactonisierung des Polyketides oder eine Hydrolyse katalysiert (Schema 7).^[37, 38]

Einleitung



Schema 7: Die Abspaltung der Polyketidkette wird durch die terminale Thioesterase (TE) vermittelt. Je nach TE erfolgt eine Hydrolyse zur freien Carbonsäure oder eine Makrolactonisierung. Die TE (braun unterlegt) umfasst auch die Aminosäurereste der katalytischen Triade.

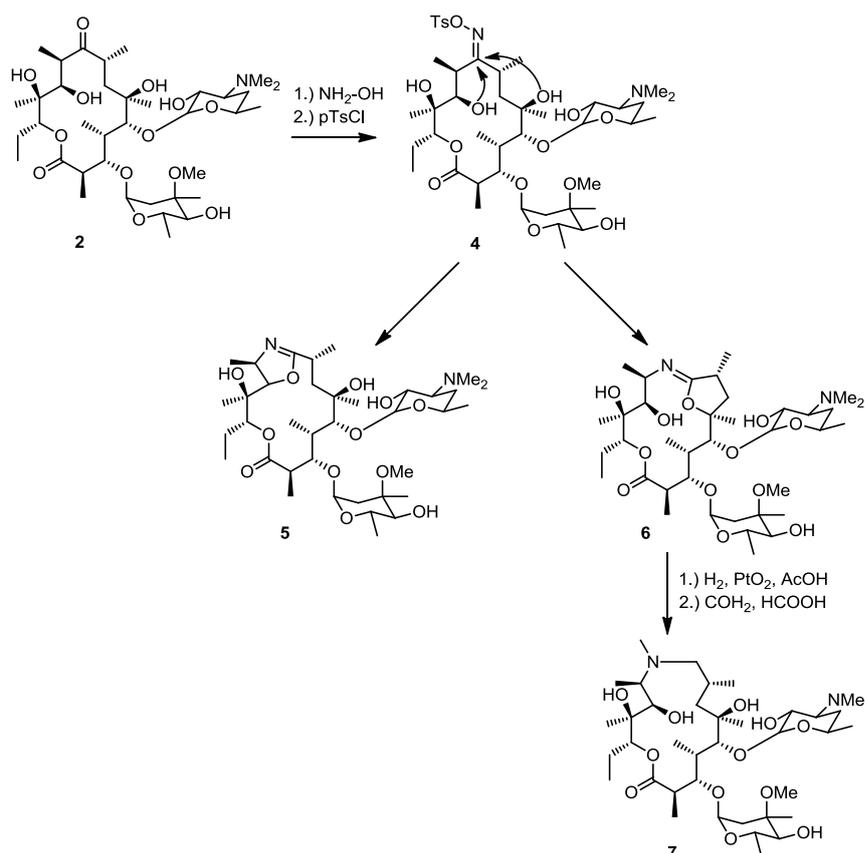
Oftmals erfolgen nach der TE-katalysierten Zyklisierung, weitere Zyklisierungsreaktionen und Umlagerungen, die neue Carbo- oder Heterozyklen ausbilden.^[8, 39] Hydroxlierungen und Glykosylierungen im Rahmen der post-PKS-Prozesse haben oft einen großen Einfluss auf die Bioaktivität von Polyketiden.^[40]

Aufgrund des hohen metabolischen Aufwands um solche PKS zu erhalten, ist jedes Modul der PKS so konstruiert, dass es nur ein bestimmtes Substrat akzeptiert und definierte, sowie stereoselektive Reduktionen durchführt.^[41] Die Gesamtzahl der Kettenverlängerung ist proportional zur Anzahl der Module einer PKS und somit genau festgelegt (Colinearitätsregel). Ebenfalls sind die post-PKS-Prozesse weitestgehend festgelegt. Durch die Zusammensetzung unterschiedlicher Module innerhalb der PKS und anschließender post-PKS-Prozesse, kann eine sehr große Vielfalt an unterschiedlichen Polyketiden ermöglicht werden.

2.3 Derivatisierung von Polyketiden

Die große Anwendbarkeit von Polyketiden und deren Derivaten in der Human- und Veterinärmedizin machen Polyketide zu einer unerlässlichen Substanzklasse.^[8, 10-12] Der polyfunktionelle Charakter zahlreicher Polyketide erschwert insbesondere die Partialsynthese erheblich. Um Polyketide für die moderne Pharmazie nutzbar zu machen, ist jedoch eine Derivatisierung meist unumgänglich.^[6] Ein Beispiel ist die semisynthetische Umsetzung von Erythromycin (**2**) in Azithromycin (**7**), um neue Makrolaktamantibiotika zu erhalten (Schema 8).^[42] In Erythromycin ist die einzige Position, die direkt

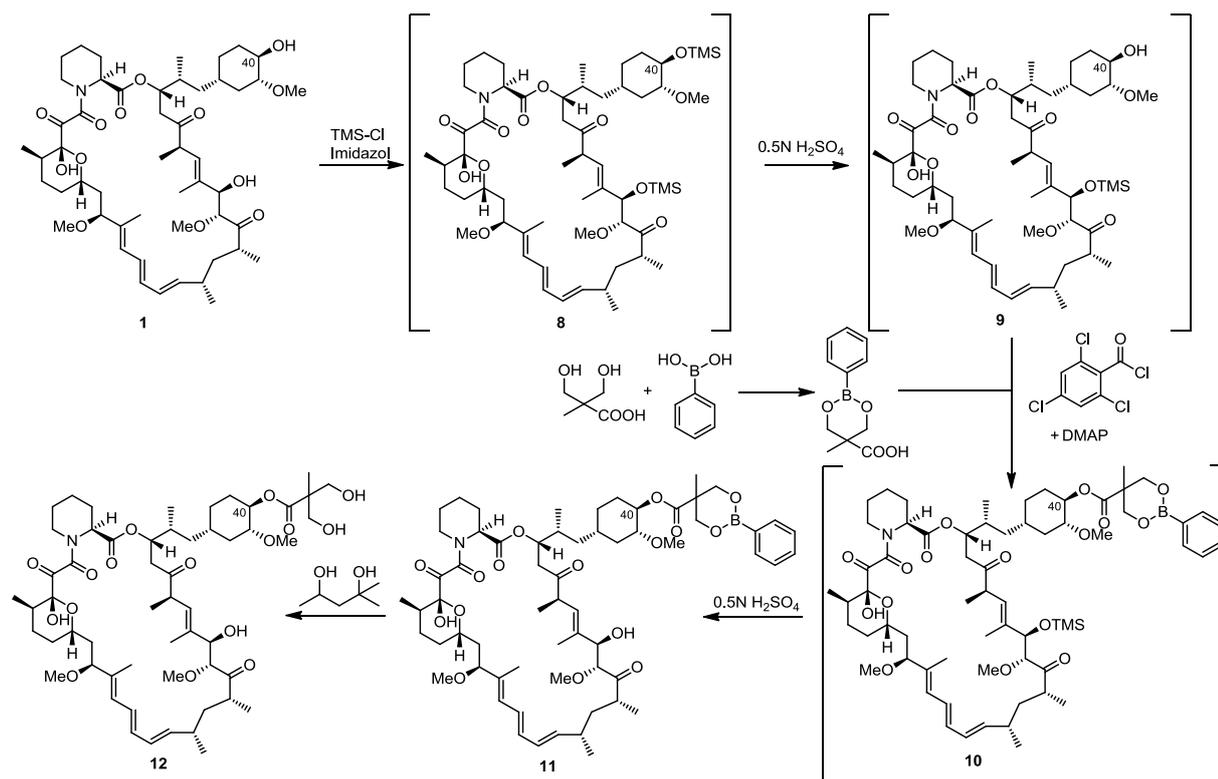
chemoselektivmodifiziert werden kann, das Keton. Durch Oximbildung und anschließende Umsetzung mit Tosylchlorid erhält man Verbindung **4**. Die darauffolgende Beckmann-Umlagerung ergibt zwei neue Produkte **5** und **6**, von denen nur **6** für die weitere Synthese nützlich ist. Verbindung **6** wird im weiteren Verlauf reduziert und in die bioaktive Verbindung **7** überführt. Diese Synthese steht exemplarisch für eine Vielzahl an semisynthetischen Derivaten.



Schema 8: Die regioselektive Modifikation des Ketons des Erythromycin ermöglicht den Zugang zu neuen Erythromycinderivaten.^[42]

Im Falle von Erythromycin (**2**) ermöglicht die Ketofunktion eine chemoselektive Derivatisierung, dies ist in anderen Fällen ohne aufwendige Schutzgruppenchemie nicht möglich. In vielen Fällen müssen die Polyketide chemoselektiv, regioselektiv und stereoselektiv modifiziert werden. Das bedarf es häufig eine gutdurchdachte Schutzgruppenchemie, sowie zum Teil auch innovative Syntheserouten. Das Rapamycinderivat CCI-779 (**12**) ist ein Beispiel um den großen Syntheseaufwand zu zeigen, der nötig ist, um eine vermeintlich einfache selektive Veresterung zu gewährleisten (Schema 9).^[43]

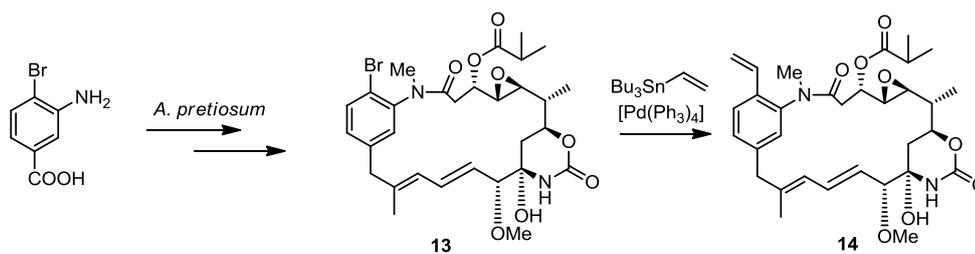
Einleitung



Schema 9: Syntheseroute zur Darstellung des Rapamycinderivates CCI-779 (12).^[43] Die Syntheseschritte der Verbindungen **8**, **9** und **10** verlaufen ohne Isolierung der Zwischenprodukte.

Rapamycin (**1**) gehört zu den Polyenpolyketiden und ist sehr empfindlich gegenüber Säuren, Basen, Licht und hohen Temperaturen. Damit die Position C40 verestert werden kann, müssen zunächst die beiden sekundären Alkohole geschützt werden (Verbindung **8**). Nach selektiver Entschützung an Position C40 erfolgt eine Veresterung mit einem Borsäureester zu Verbindung **10**. Durch anschließende Entfernung der TMS-Schutzgruppe und des Borsäureesters erhält man das gewünschte Derivat **12**. Dieser hohe Aufwand kann reduziert werden, wenn orthogonal funktionalisierte nicht-native Start- oder Verlängerungseinheiten in das Polyketid integriert werden. Die dadurch entstehenden neuen Polyketidderivate können selektiv modifiziert werden, idealerweise ohne ein komplexes Gemisch an Regioisomeren zu erhalten (Schema 10).

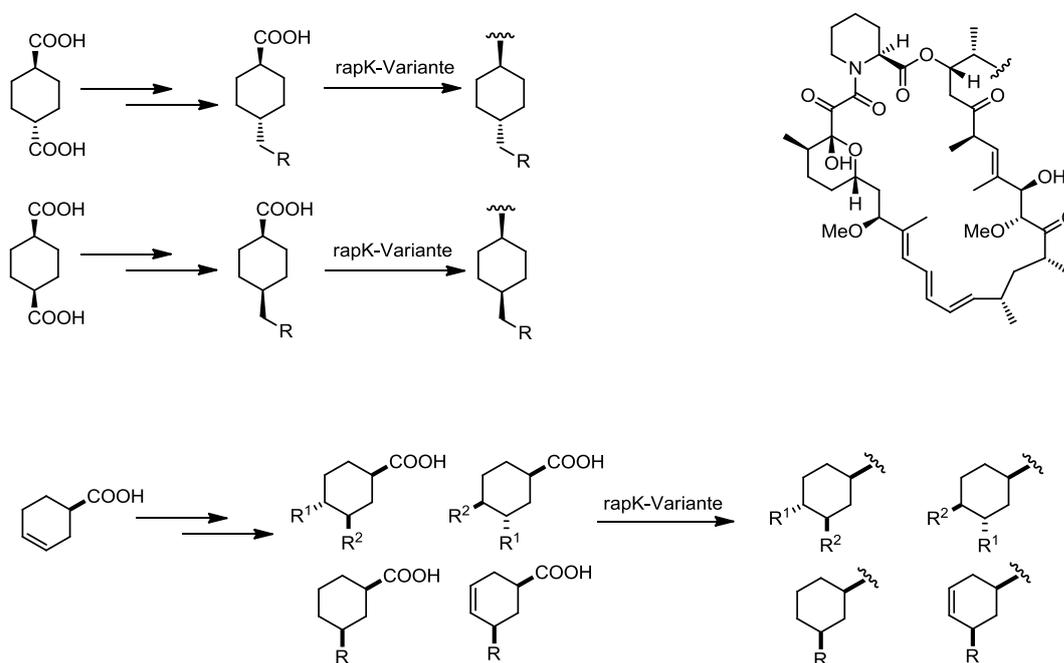
Ein Beispiel hierfür ist die Erzeugung neuer Ansamitocinderivate. Dazu wurden zu einer *A. pretiosum*-Variante nicht-native halogenierte Benzoessäurederivate gefüttert (Schema 10).^[44] Diese AHBA-Blockmutante akzeptierte den neuen Baustein und man erhielt ein halogeniertes Ansamitocinderivat **13**. Dieses Derivat konnte anschließend mittels Stille-Kupplung selektiv modifiziert werden (Verbindung **14**).^[44]



Schema 10: Chemoselektive Synthese eines Ansamitocinderivates. Nach der Fütterung einer halogenierten Benzoesäure zu einer AHBA-Blockmutante erfolgte eine Stille-Kupplung.^[44]

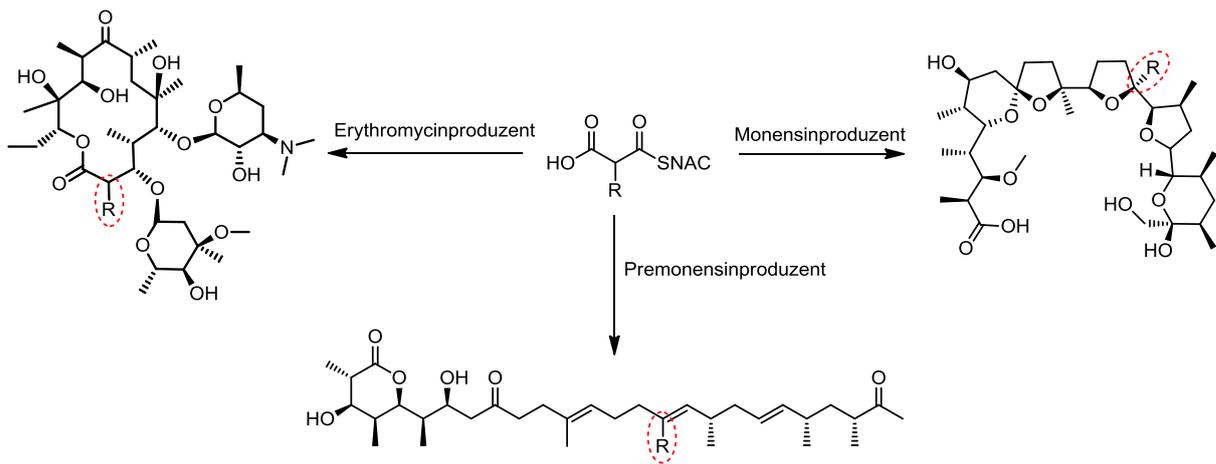
3 Zielsetzung

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, synthetische Bausteine in Polyketidbiosynthesewege einzuschleusen. Dies soll nach Möglichkeit vorhersagbar, gezielt und flexibel geschehen. Des Weiteren werden partialsynthetische Derivatisierungen von Naturstoffen untersucht. Etablierte Strategien zur Einführung künstlicher Substrate in Polyketide sind die vorläuferdirigierte Biosynthese und die Mutasythese. In denen werden Analoga der jeweiligen Starteinheit durch Fütterung eingeschleust. Diese Ansätze sollen zur Erzeugung orthogonal funktionalisierter Rapamycinderivate genutzt werden (Schema 11).



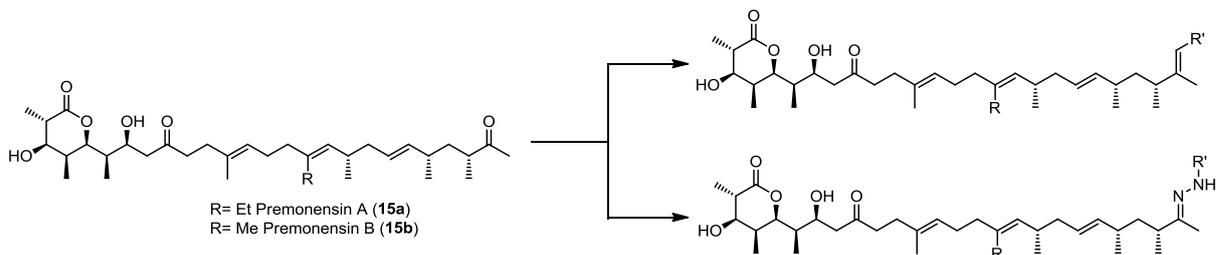
Schema 11: Verallgemeinertes Syntheschema zur Darstellung von Analoga der Rapamycinstarteinheit. Diese Analoga werden in Fütterungsexperimenten der RapK-Variante hinzugefügt, um neuartige Rapamycinderivate zu erzeugen. Die jeweiligen Reste sind hier nicht genauer definiert und werden in den entsprechenden Kapiteln genauer beschrieben.

Zur Flexibilisierung der Mutasythese werden Untersuchungen von Acyltransferasen in Polyketidsynthasen angestrebt, die synthetischen Malonsäurederivate als Verlängerungseinheiten in verschiedenen Polyketiden einfügen sollen. Dieses Vorhaben soll auf mehreren möglichen Wegen erreicht werden (Schema 12).



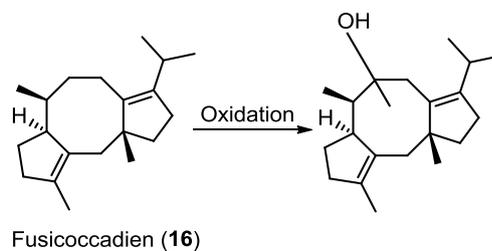
Schema 12: Verallgemeinertes Schema zur Darstellung neuer Naturstoffderivate durch den Einsatz von nicht-nativen Malonaten. Der Rest R ist hier nicht genauer definiert.

In den Partialsynthesen soll Premonensin (**15**), ein fermentativ herzustellendes aber nicht-natives Polyketid, modifiziert werden. Dadurch sollen Struktur-Wirkungs-Beziehungen dieser bioaktiven Verbindung erleichtert werden (Schema 13).



Schema 13: Verallgemeinertes Schema zur Darstellung neuer Premonensinderivate. Der Rest R ist hier nicht genauer definiert.

Des Weiteren soll nach Wegen gesucht werden, das Diterpen Fusicoccadien (**16**) oxidativ zu funktionalisieren (Schema 14).

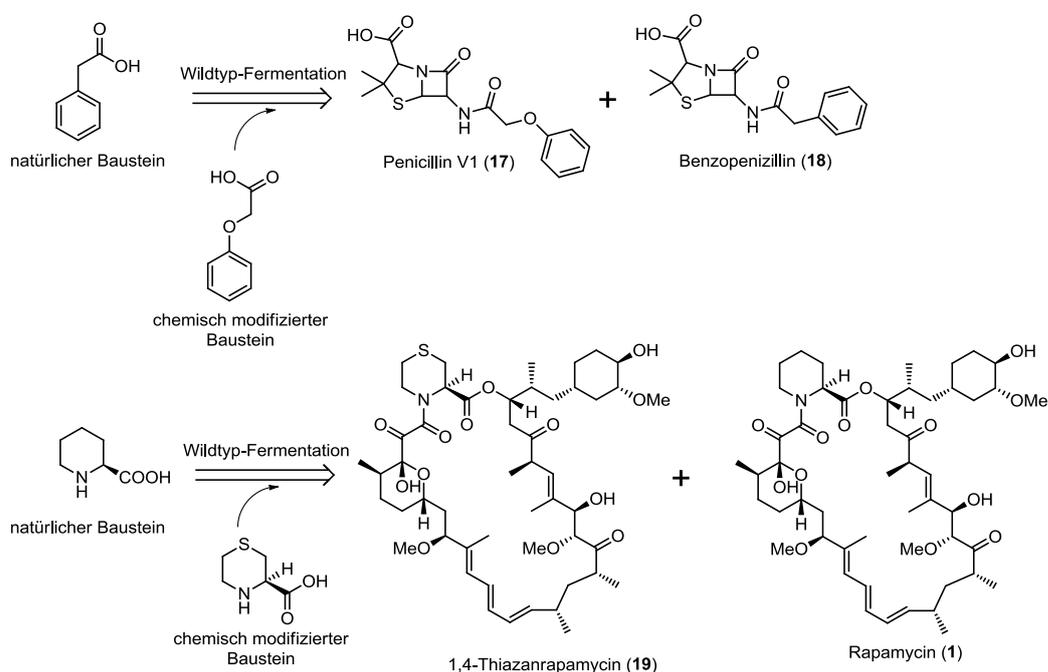


Schema 14: Allgemeines Schema zur Oxidation von Fusicoccadien.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Generierung neuartiger Polyketide mittels vorläuferdirigierte Biosynthese

Die vorläuferdirigierte Biosynthese (engl.: *precursor-directed biosynthesis*, kurz: PDB) ist eines der frühen Beispiele in denen chemisches und biologisches Wissen zur Generierung neuer Naturstoffe führt.^[45] Im einfachsten Fall führt die Fütterung eines Bausteinanalogon zur Produktion eines neuen Naturstoffderivates. Diese Herangehensweise kann sehr effektiv zur Erzeugung neuartiger Naturstoffderivate sein, vorausgesetzt die Biosynthesemaschinerie des Mikroorganismus akzeptiert das Bausteinanalogon. Dies ist dadurch möglich, da die Enzyme des Sekundärmetabolismus weniger selektiv sind, als Enzyme des durch Evolutionsdruck optimierten Primärmetabolismus.^[46] Beispiele in dem es mittels PDB gelungen ist ein neues Naturstoffderivat zu erhalten, sind die Synthese von Penicillin V (**17**)^[47] und 1,4-Thiazarapamycin (**19**) (Schema 15).^[48, 49] Penicillin V (**17**) ist eines der wenigen Beispiele dafür, dass die PDB in den Anfängen der Penicillinproduktion auch in industriellen Maßstäben angewandt wurde.^[50] Eine Übersicht durch PDB erhaltene Naturstoffderivate sind in dem Artikel von R. Thiericke und J. Rohr zu finden.^[45]

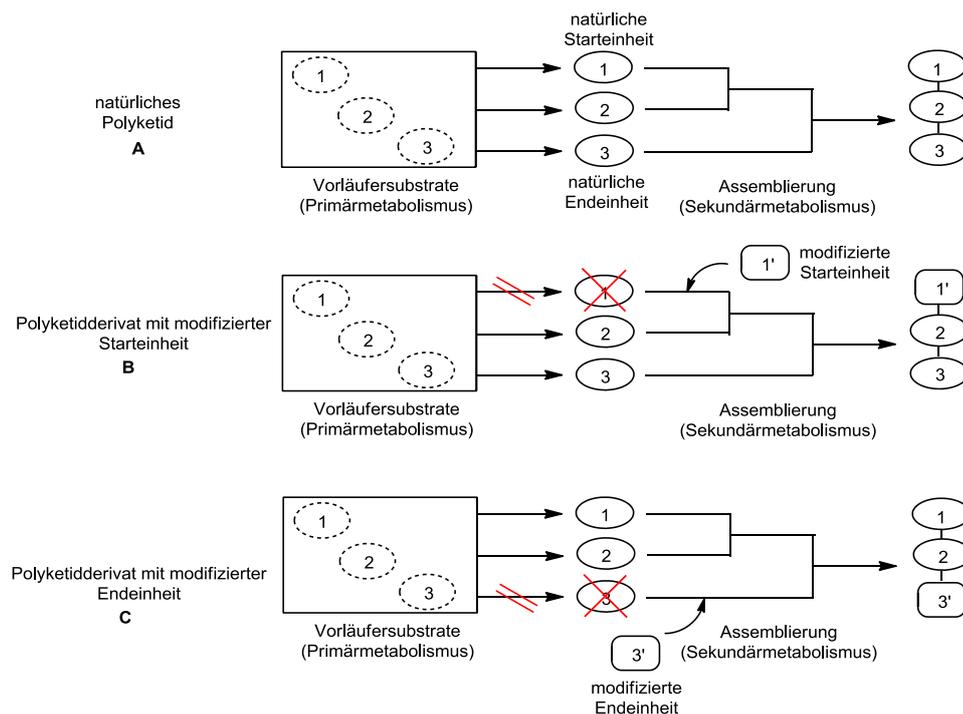


Schema 15: Prinzip der vorläuferdirigierten Biosynthese (PDB) anhand zweier ausgewählter Beispiele. Durch das Füttern zusätzlicher modifizierter Bausteine erhält man Produktgemische, bestehend aus dem Wildtypprodukt und dem Derivat.^[47-49]

Ein wesentliches Problem dieser Methode ist, dass neben dem gewünschten Naturstoffderivat auch immer noch der natürliche Naturstoff produziert wird. Dies erschwert zum Teil erheblich die Aufreinigung und erfordert andernfalls hohe Konzentrationen des Bausteinanalogon im Fermentationsmedium, um präparative Mengen des gewünschten Naturstoffderivats zu erhalten. Zum anderen ist die Substratbreite häufig nicht sehr flexibel, sodass nur geringfügige Modifikationen toleriert werden.

4.2 Generierung neuartiger Polyketidderivate mittels Mutasythese

Die Mutasythese bietet einen potenziell effizienteren Ansatz zur Erhöhung der Polyketiddiversität ohne komplizierte Separierungsprozesse vom nativen Polyketid. Dieser Begriff wurde erstmals 1977 von Kenneth Rinehart verwendet.^[51] Dabei handelt es sich um eine Kombination aus organischer Synthese (meist modifizierte Start- oder Endeinheiten) und der genetischen Manipulation von Biosyntheserouten (Schema 16).



Schema 16: Prinzip der Mutasythese. Bei der Mutasythese kann die Bakterienvariante nur durch die heterologe Zufuhr eines Bausteines die Biosynthese des Polyketides komplementieren. Lediglich das neue Polyketidderivat wird bei Akzeptanz des Bausteinanalogon durch die Variante biosynthetisiert. **A:** Biosynthese des Polyketids durch den Wildtypproduzenten. **B:** Biosynthese des Polyketidderivats mit modifizierter Starteinheit. **C:** Biosynthese des Polyketidderivats mit modifizierter Endeinheit.

In den Anfängen dieser Technik wurde nicht die PKS selbst mutiert, sondern es wurden gezielt Enzyme blockiert, um die Bildung der notwendigen Vorläufer der Start- oder

Ergebnisse und Diskussion

Endeinheiten eines Polyketides zu unterbinden. Varianten, die nicht mehr die Fähigkeit besitzen, die Vorläufer der Start- oder Endeinheit eines Polyketides zu synthetisieren bezeichnet man als *knock out*-Mutanten. Als eines der ersten Beispiele für die Mutasynthese von Polyketiden konnten 1991 erstmalig 36 neue Avermectinderivate erzeugt werden.^[52] Wird der nicht-natürliche Baustein von der PKS akzeptiert, ist das resultierende Polyketid an der entsprechenden Stelle verändert. Durch den *knock-out* der Enzyme, die die Synthese der Start- oder Endeinheit katalysieren, umgeht man aber nicht das Problem der Substratspezifität der PKS. So kann es vorkommen, dass trotz einer *knock-out*-Mutante nur wenige oder gar keine Polyketidderivate gebildet werden, weil die PKS relativ substratspezifisch ist und keines der synthetisierten unnatürlichen Substrate akzeptiert. Durch den immensen Anstieg an Sequenzinformationen über viele Naturstoffbiosyntheserouten und damit auch das bessere Verständnis über den Aufbau von PKS, kann man das Selektivitätsproblem zumindest bei der Starteinheit in Einzelfällen umgehen, indem man die KS-Domäne von Modul 1 defunktionalisiert.^[14, 53] Durch das Füttern eines Di- oder Triketids, welches mit einer unnatürlichen Starteinheit versehen ist, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit dieser Substanzen von der PKS akzeptiert zu werden.^[54] Hierbei steigt jedoch der Syntheseaufwand.

4.2.1 Mutasynthese neuer Rapamycinderivate

Rapamycin wurde erstmals Anfang der 1970er Jahre aus dem grampositiven Bodenbakterium *Streptomyces hygroscopicus* sp. *hygroscopicus* NRRL 5491 isoliert^[55] und war die erste Substanz aus der Klasse der Immunophilinliganden, dessen Struktur vollständig aufgeklärt wurde (Abbildung 2).^[56, 57]

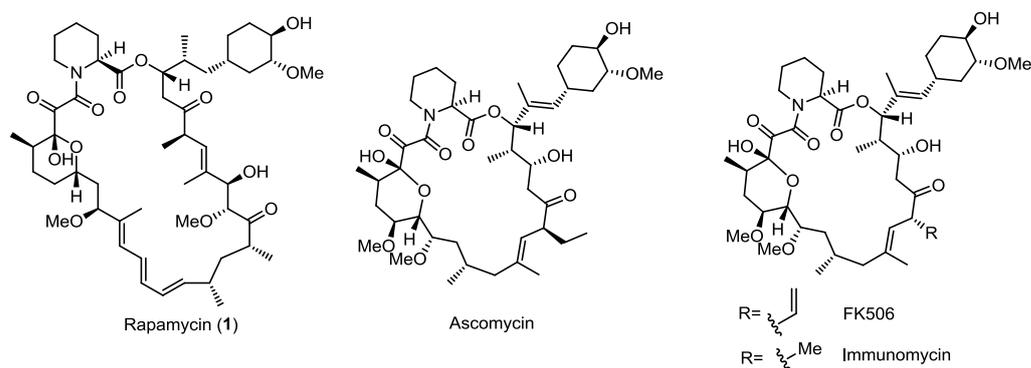
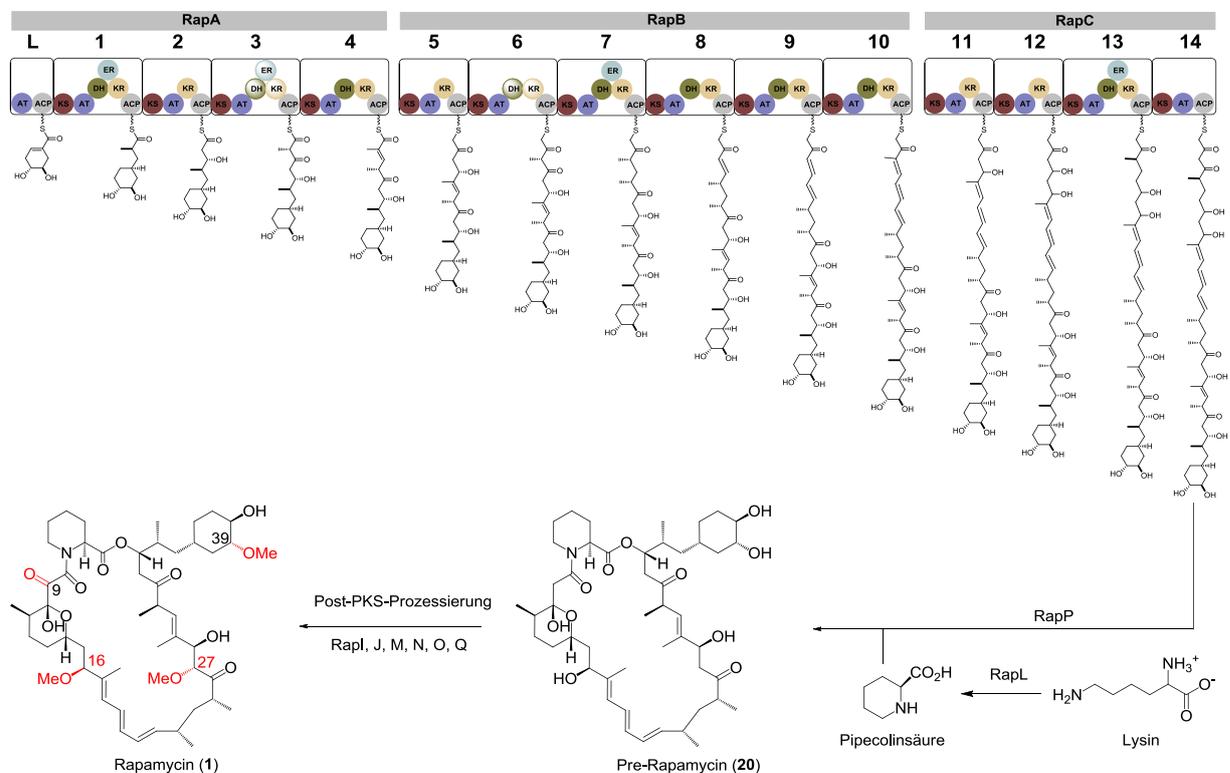


Abbildung 2: Rapamycin (1) und die strukturverwandten Polyketide Ascomycin, FK506 und Immunomycin.

Dabei handelt es sich um ein Petid-Polyketid-Hybrid, dessen Biosynthese von einer Typ-I-PKS und einer nicht-ribosomalen Peptidsynthetase (NRPS) katalysiert wird

(Schema 17).^[58, 59]Die Rapamycin Biosynthese beginnt mit dem Einbau der von RapK synthetisierten 4,5-Dihydroxycyclohex-1-encarbonsäure (DHCHC), welche aus dem Shikimisäurezyklus stammt. Es folgen 14 Kondensationschritte in denen sieben Malonyl-CoA und sieben Methylmalonyl-CoA als Kettenverlängerung dienen. Den Einbau von Pipecolinsäure katalysiert die NRPS RapP. Dieses Enzym ist auch für die Macrolactonisierung der Polyketidkette verantwortlich. Das durch die Makrolactonisierung erhaltene Pre-Rapamycin (**20**), wird durch weitere post-PKS-Prozessierungen in Rapamycin (**1**) überführt. Die an der post-PKS-Prozessierung beteiligten P₄₅₀-Monoxygenasen RapJ und RapN und die S-Adenosylmethionin-abhängigen Methyltransferasen RapI, RapM und RapQ führen Oxidationen und O-Methylierungen aus, um Rapamycin (**1**) zu erhalten (Schema 17).^[60]



Schema 17: Rapamycin Biosynthese. Start der Biosynthese ist der durch RapK synthetisierte Baustein 4,5-Dihydroxycyclohex-1-encarbonsäure DHCHC. Aus diesem entsteht durch die Enzyme RapA, B, C, L und P das Pre-Rapamycin (**20**). Nach anschließender post-PKS-Prozessierung (rot markiert) wird das Rapamycin (**1**) erhalten. Die Enzyme RapA, B und C bestehen aus 14 Modulen, bei Modul 3 und 6 sind die reduktiven Domänen inaktiv.

Rapamycin und dessen Derivate werden gegen kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und als Immunsuppressiva bei Transplantationen eingesetzt.^[61-64] Seine bedeutendste Anwendung liegt in der Tumorbehandlung. Es ist ein selektiver Inhibitor der Kinase mTOR (Mammalian Target of Rapamycin). Dadurch wird das Signal zur Zellzyklusprogression, Wachstum und Proliferation inhibiert.^[65-68] Somit bietet

Ergebnisse und Diskussion

Rapamycin eine interessante Leitstruktur für die Entwicklung neuer Derivate mit antikarzinogenen, antiinflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften. Viele der sich in der klinischen Erprobung oder klinischen Anwendung befindenden Rapamycinderivate sind semisynthetischer Natur. Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit, Bioverfügbarkeit und Stabilität von Rapamycin, wurden verschiedene Derivate mittels Semisynthese generiert. Dabei zeigte sich, dass durch Modifikationen an Position C40, d.h. der Starteinheit (DHCHC), die Stabilität und die Wasserlöslichkeit erhöhen lässt, ohne die Aktivität negativ zu beeinflussen (Abbildung 3).^[67, 69]

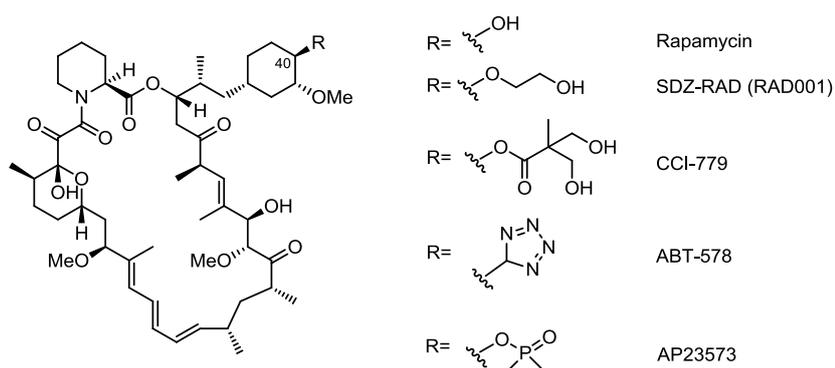


Abbildung 3: Strukturen des Rapamycins und dessen Derivate, die sich in der klinischen Testphase oder Anwendung befinden.^[69]

Der polyfunktionelle Charakter zahlreicher Polyketide insbesondere des Rapamycin erschwert die Partialsynthese erheblich. Mittels Mutasynthese kann man dieses Problem umgehen, indem man bereits chemisch modifizierte Starteinheiten zu einer *rapK*-Deletionsvariante hinzugibt.^[70, 71] Das Bakterium ist nicht mehr in der Lage den notwendigen Vorläufer DHCHC (**21**) zu synthetisieren, wodurch die Rapamycinbiosynthese nicht mehr initiiert werden kann.^[70, 72-74] Durch die Zugabe nicht-natürlicher DHCHC-Analoga kann die Rapamycinbiosynthese initiiert werden, wodurch man Zugang zu neuen Rapamycinderivaten erhält (Abbildung 4).

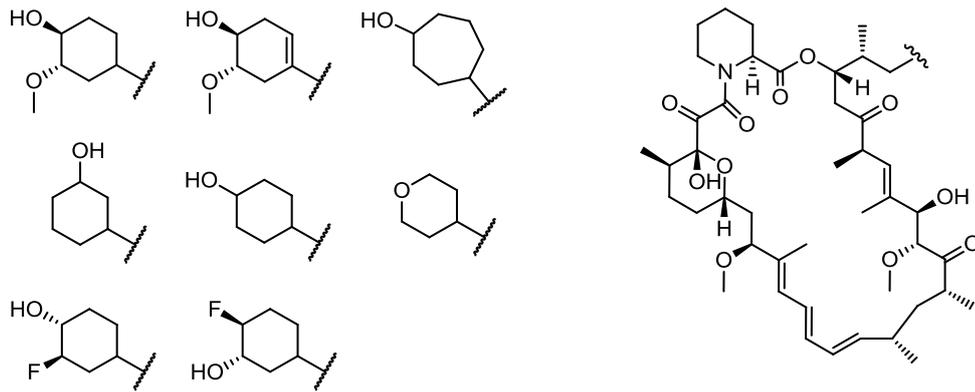
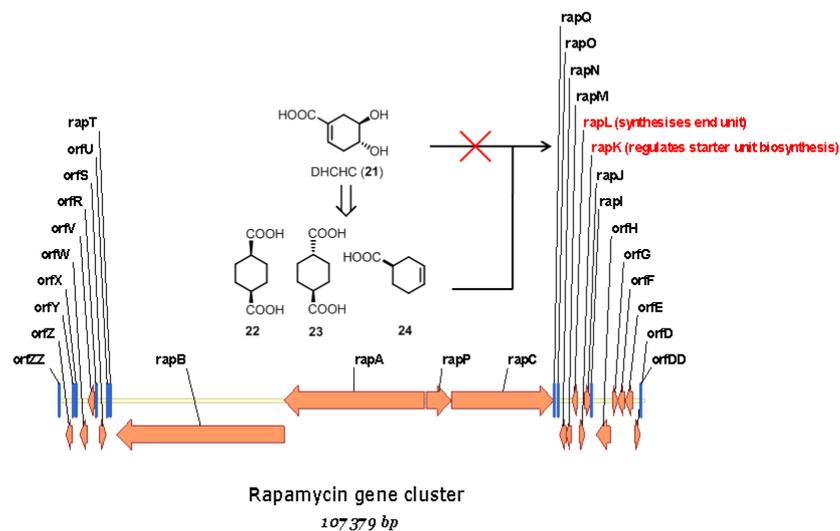


Abbildung 4: Literaturbekannte und durch Mutagenese erzeugte Rapamycinderivate.^[54, 70, 75]

Ein Problem der bis jetzt bekannten Rapamycinderivate ist, dass sie sich strukturell nur wenig von Rapamycin unterscheiden und keine Möglichkeiten bieten Rapamycin an den Positionen C40 oder C39 selektiv chemisch zu modifizieren, um dessen pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften zu verbessern (Abbildung 4). Somit sollten unter anderem neue Analoga der DHCHC (**21**) synthetisiert werden, die bioorthogonale funktionelle Gruppen enthalten.

4.2.2 rapK – Blockmutanten der Rapamycin-Starteinheit



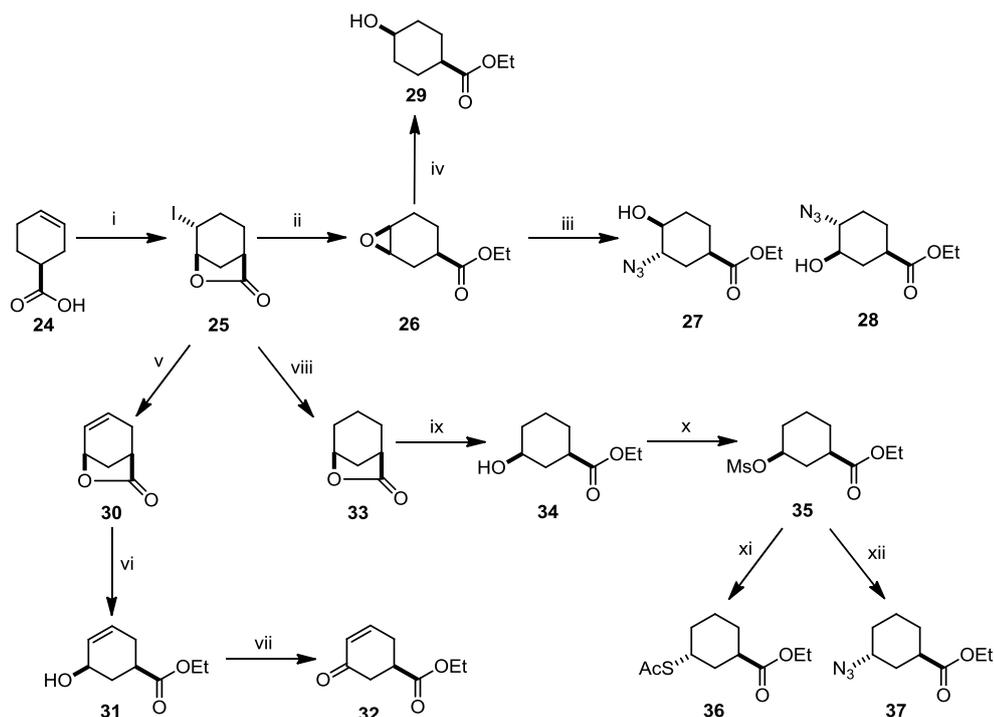
Schema 18: Gencluster der Rapamycinbiosynthese. Durch *knock-out* von RapK kann DHCHC (**21**) nicht mehr synthetisiert werden und für den Einbau bereitstehen. Anstelle dessen wird der Mangel durch das Füttern von Derivaten basierend auf *rac*-Cyclohex-3-en-carbonsäure (**24**) oder *cis*- und *trans*-Cyclohexancarbonsäure (**22**, **23**) komplementiert.

Ergebnisse und Diskussion

Die rapK-Blockmutanten wurden in Rahmen der Dissertation von Dr. U. Sundermann generiert.^[76]

4.2.3 Synthese der Cyclohexancarbonsäurederivate

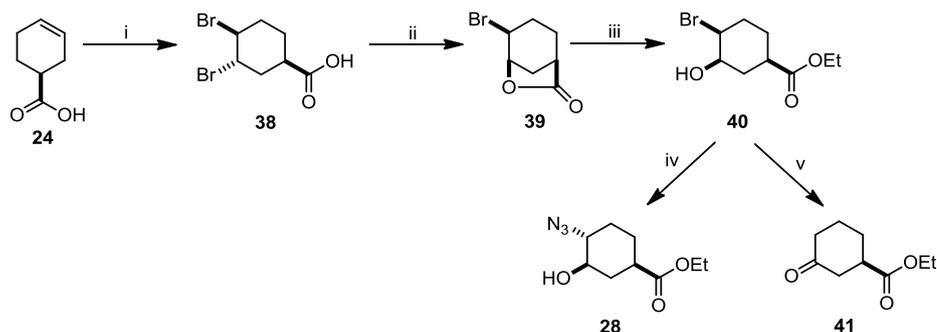
Die Fütterung nicht-natürlicher Starteinheiten setzt voraus, dass die für die Fütterungsexperimente benötigten Substanzen in präparativen Mengen zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund ist es wichtig, eine Syntheseroute zu etablieren mit der es möglich ist ohne große Veränderungen eine Vielzahl an Cyclohexancarbonsäurederivaten zu erhalten. In der Literatur sind viele Rapamycinderivate bekannt, die simple Hydroxylierungsmuster an der Starteinheit aufweisen.^[77] Auch der Einbau von fluorierten Verbindungen, sowie Cycloheptencarbonsäuren und Benzoensäuren als künstliche Starteinheiten wurden beschrieben.^[75, 78] Da deren Einbau aber stark von dem Substitutionsmuster abhing, sollten möglichst viele Derivate synthetisiert werden, um die Substratbreite der AT zu erfassen. Im Gegensatz zu den bereits literaturbekannten Derivaten sollten die zu synthetisierenden Substanzen im Idealfall eine Azid- oder Alkinmodifikation besitzen, sodass man in der Lage wäre im weiteren Verlauf selektiv chemische Modifikationen durchzuführen. Diese Substrate sollten in der Ausrichtung der Stereozentren primär der DHCHC (**21**) angepasst werden und in ihren funktionellen Gruppen stark variieren (Schema 19, Schema 20, Schema 21, Schema 22).



Schema 19: Syntheseroute zur Darstellung diverser Cyclohexancarbonsäurederivate ausgehend von *rac*-Cyclohex-3-en-carbonsäure. i) 1.8 eq. I₂, 5.3 eq. KI, 2.6 eq. NaHCO₃, H₂O, RT, 18h, 98%; ii) 1.2 eq. NaOH, EtOH, RT, 1h, 88%; iii) 3.0 eq. NaN₃, DMF, 60°C, 18h, 92%; iv) 1.3 eq. NaBH₄, EtOH, 18h, 24%; v) 3.0 eq. DBU, Toluol, 70°C, 3h, 95%; vi) 0.5 eq. Na₂CO₃, EtOH, RT, 18h, 82%; vii) 1.3 eq. DMP, DCM, RT, 3h, 58%; viii) 1.3 eq. Bu₃SnH, 0.05 eq. AIBN, THF, reflux, 45min, 98%; ix) 1.0 eq. Na₂CO₃, EtOH, RT, 18h, 95%; x) 2.0 eq. MsCl, 2.5 eq. NEt₃, DCM, RT, 18h, 98%; xi) 1.3 eq. KSAc, DMF, 70°C, 20h, 81%; xii) 3.0 eq. NaN₃, DMF, 70°C, 20 h, 56%.

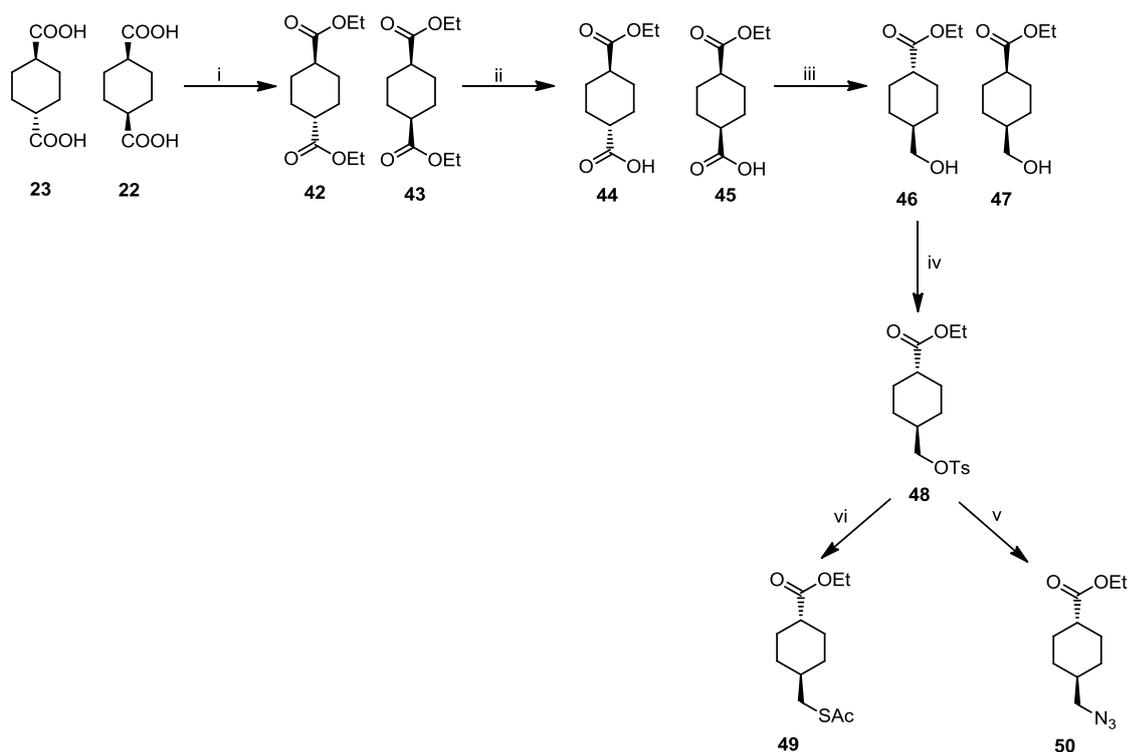
So wurden, basierend auf der bereits während meiner Masterarbeit entwickelten Syntheseroute für Verbindung **27**^[79], ausgehend von *rac*-Cyclohex-3-encarbonsäure (**24**) weitere Cyclohexancarbonsäurederivate synthetisiert (Schema 19). Durch Dehalogenierung mittels radikalischer Substitution der Verbindung **33** erhält man Zugang zu den 3-substituierten Cyclohexancarbonsäurederivaten **36** und **37**. Durch Eliminierung des Iods mit DBU von Verbindung **33**, gefolgt von einer anschließenden Lactonöffnung und DMP-Oxidation der Verbindung **31**, erhält man den Michaelakzeptor **32**. Mittels reduktiver Epoxidöffnung erhält man Verbindung **26**, ausgehend von **29**. Die Ausbeute war mit 23% sehr gering, sodass vorerst von weiteren in 4-Position substituierten Cyclohexancarbonsäurederivaten abgesehen wurde.

Ergebnisse und Diskussion



Schema 20: Syntheseroute zur Darstellung diverser Cyclohexancarbonsäurederivate ausgehend von *rac*-Cyclohex-3-en-carbonsäure. i) 1.1 eq. Br₂, CHCl₃, 0°C, 2 h, 88%; ii) 2.5 eq. NaHCO₃, DMF, 60°C, 3 h, 96%; iii) 0.8 eq. Na₂CO₃, EtOH, RT, 18 h, 99%; iv) 4.0 eq. NaN₃, 2.0 eq. Dibenzo-18-krone-6-ether, DMF, 40°C, 24 h, 66%; v) 1.3 eq. DBU, DMSO, 50°C, 18 h, 51%.

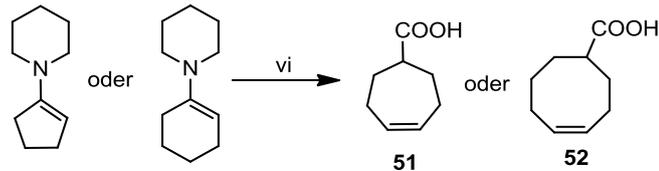
Basierend auf der in meiner Masterarbeit entwickelten Syntheseroute für Verbindung **28**^[79] konnte zusätzlich Verbindung **41** erhalten werden (Schema 20). Die Verbindungen **46,47,49** und **50** wurden Analog zu der in der Masterarbeit beschriebenen Methode synthetisiert (Schema 21).^[79]



Schema 21: Syntheseroute zur Darstellung möglichst vieler Cyclohexandicarbonsäurederivate ausgehend von *trans*-oder*cis*-1,4-Cyclohexancarbonsäure. i) 2.5 eq. SOCl₂, EtOH, RT, 18h, 94%; ii) 1.1 eq. NaOH, EtOH, RT, 18h, 65%; iii) 1.) 1.1 eq. NMM, 1.1 eq. *iso*-Butylchloroformat, THF, 2.) 3.0 eq. NaBH₄, MeOH, 5h, 84%; iv) 2.0 eq. pTsCl, Pyridin, RT, 18h, 95%; v) 5.1 eq. NaN₃, DMF; 70°C, 18h, 89%; vi) 1.3 eq. KSAc, EtOH, 70°C, 18h, 78%.

Im Gegensatz zu der in der Arbeit beschriebenen *n*-Butylmonoveresterung von *trans*-1,4-Cyclohexandicarbonsäure, erwies es sich als wesentlich effektiver, zu erst einen Diester (**42**, **43**) zu synthetisieren und diesen anschließend mittels Verseifung in den Monoester (**44**, **45**) zu überführen (Schema 21).

Des Weiteren wurden Cyclohexencarbonsäure (**51**) und Cyclooctencarbonsäure (**52**) synthetisiert^[80, 81] um die Substratbreite in Abhängigkeit der Ringgröße zu erfassen (Schema 22).



Schema 22: Syntheschema der Cyclohepten- und Cyclooctencarbonsäure. i) 1.) 1.01 eq. Acrolein, Et₂O, RT, 18h; 2.) 1.1 eq. MeI, MeOH, 45min reflux, dann RT, 18h; 3.) 40% aq. KOH, 25%.

4.2.4 Fermentation von NRRL 5491 und der rapK-Blockmutanten

Damit eine zuverlässige und reproduzierbare Analyse der Fermentationsextrakte mittels HPLC-ESI-MS möglich war, wurden zur Etablierung der Analytik, Analysen mit kommerziell erhältlichem Rapamycin durchgeführt. Rapamycin war im Negativionenmodus gut ionisierbar und konnte mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis (*m/z*) von 912 ([M-H]⁻) detektiert werden. Die simultane Detektion mittels UV bei 280 nm ermöglicht eine sensitive Detektion (Abbildung 5). Als Laufmittel wurde ein Gradient aus Acetonitril/H₂O auf der CC12514 Nucleodur C18 Gravity Säule verwendet. Die Elutionszeit von Rapamycin betrug 1,5 min bei RT und konnte auf knapp 60 sec verkürzt werden, indem beidemselben Laufmittelgradienten eine Temperatur von 60°C verwendet wurde.

Ergebnisse und Diskussion

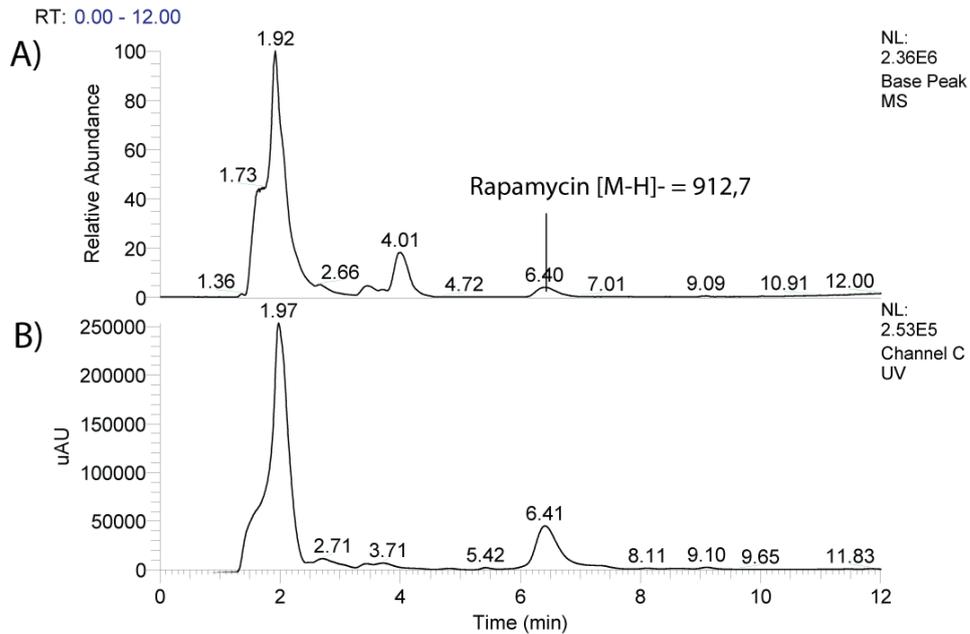
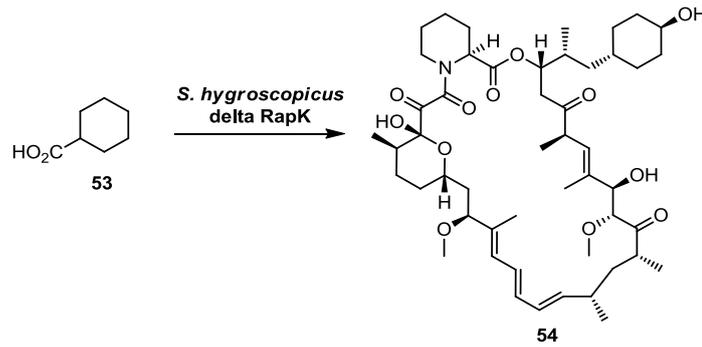


Abbildung 5: HPLC-Chromatogramm von dem Methanolextrakt einer Wildtypfermentation. **A:** Massenspur; **B:** UV-Spur bei 280 nm. Abbildung stammt aus der Dissertation von Dr. U. Sundermann S.135.^[76]

Um zu verifizieren, dass die von Dr. U. Sundermann generierten rapK-Blockmutanten auch in der Lage sind Rapamycinderivate zu produzieren, wurden Fütterungen mit Cyclohexancarbonsäure (**53**) durchgeführt. 2004 konnte die Arbeitsgruppe um P. F. Leadlay das in Schema 23gezeigte Rapamycinderivat 39-Desmethoxyrapamycin (**54**), durch die Zugabe von Cyclohexancarbonsäure an eine rapK-Blockmutante, fermentieren.^[82] Dieser Einbau sollte für die nächsten Fütterungsversuche als Positivkontrolle verwendet werden. Cyclohexancarbonsäure wurde von Dr. U. Sundermann sowohl an den rapK-Blockmutanten, als auch am Wildtyp getestet. Die einzelnen Methanolrohextrakte wurden mittels HPCL/ESI-MS untersucht. Die Chromatogramme wurden nur in einem Zeitintervall von 2,5 min bis 12 min betrachtet, um ein intensiveres Signal darstellen zu können. Die Medienbestandteile (vor 2 min) wurden bei der späteren Analyse außer Acht gelassen.



Schema 23: Struktur von 39-Desmethoxyrapamycin (**54**), resultiert durch den Einbau von Cyclohexancarbonsäure als Starteinheit. Die Hydroxylierung an Position 4 der Cyclohexancarbonsäure geschieht intrazellulär, bevor diese in das Polyketid eingebaut wird.^[70]

Nach Fermentation des Wildtyps und der rapK-Blockmutantenmischkultur mit Cyclohexancarbonsäure (5 mM) konnte Dr. U. Sundermann das gesuchte Masse-zu-Ladungsverhältnis des erwarteten Derivats ($[M-H]^- = 882$) neben dem des Rapamycins (**1**) aus dem Methanolrohextrakt nachweisen (Abbildung 6). Der Wildtyp baute die Cyclohexancarbonsäure nur in geringen Mengen ein. Bei der rapK-Mischkultur coeluiieren 39-Desmethoxyrapamycin und Rapamycin in einem breiten Signal, aufgrund ihrer sehr ähnlichen Struktur.

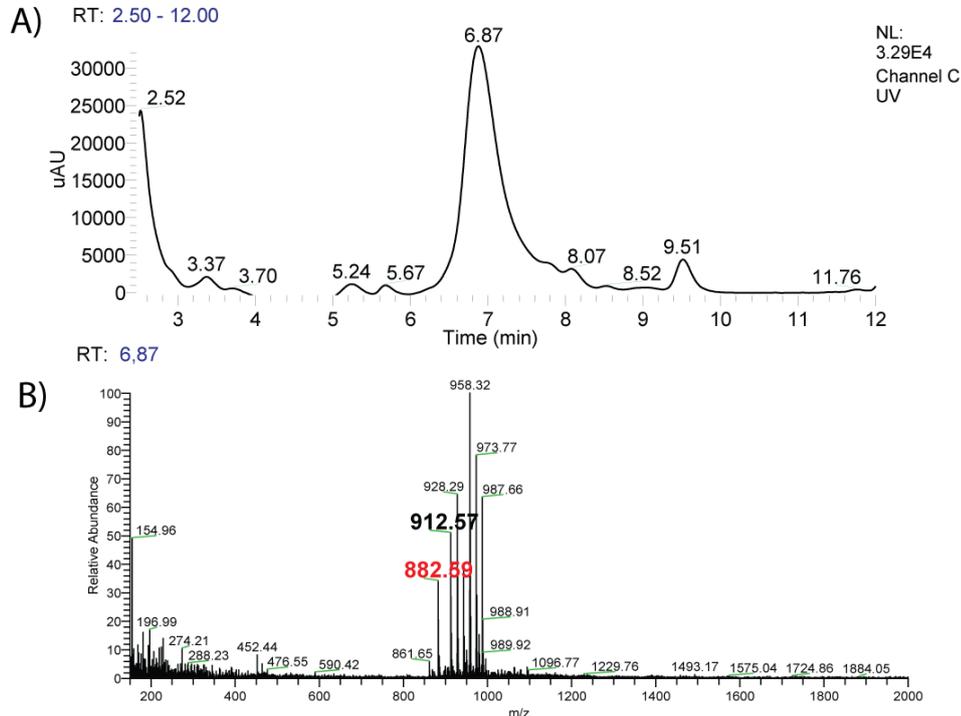


Abbildung 6: HPLC/ESI-MS des Methanolrohextrakts. Messung einer Mischkultur (rapK_9 Blockmutante von Dr. U. Sundermann). Fütterung mit 5 mM Cyclohexancarbonsäure. **A:** HPLC-Chromatogramm, **B:** zugehöriges Massenspektrum. Abbildung stammt aus der Dissertation von Dr. U. Sundermann S.137.^[76]

Ergebnisse und Diskussion

Auch wenn durch die rapK-Mischkultur ein Selektivitätsverlust zu erwarten ist, hat dies jedoch den Vorteil, dass die Bildung von Rapamycin als interner Standard benutzt werden kann. Sollte die Produktion von Rapamycin ausbleiben, so haben die Substrate einen Einfluss auf die Rapamycinbiosynthese oder auf das Wachstum der Mikroorganismen. Somit war die Plattform für das Screening von Cyclohexancarbonsäurederivatengelegt. Die Verbindungen wurden in Konzentrationen von 2 mM und 5 mM gefüttert. Abbildung 7 zeigt eine Übersicht über die synthetisierten Cyclohexancarbonsäurederivate und Analoga die für die Fütterung bereitgestellt wurden. Verbindungen **27**, **28**, **38**, **40** und **55** wurden bereits im Rahmen meiner Masterarbeit synthetisiert.^[79] Abbildung 8 zeigt die kommerziell erhältlichen getesteten Substanzen. Die Substanzen **38**, **40** und **50** zeigten bereits bei Konzentrationen von 2 mM ein reduziertes Wachstum. In keiner der Methanolextrakte konnte Rapamycin nachgewiesen werden. Wurde Verbindung **28** in Konzentrationen von 5 mM eingesetzt, zeigte sich ein stark reduziertes Zellwachstum und es konnten keinerlei Spuren von Rapamycin im Extrakt nachgewiesen werden. Die Fütterungen mit den kommerziell erhältlichen Säuren zeigte ebenfalls keine Bildung neuer Rapaloga.

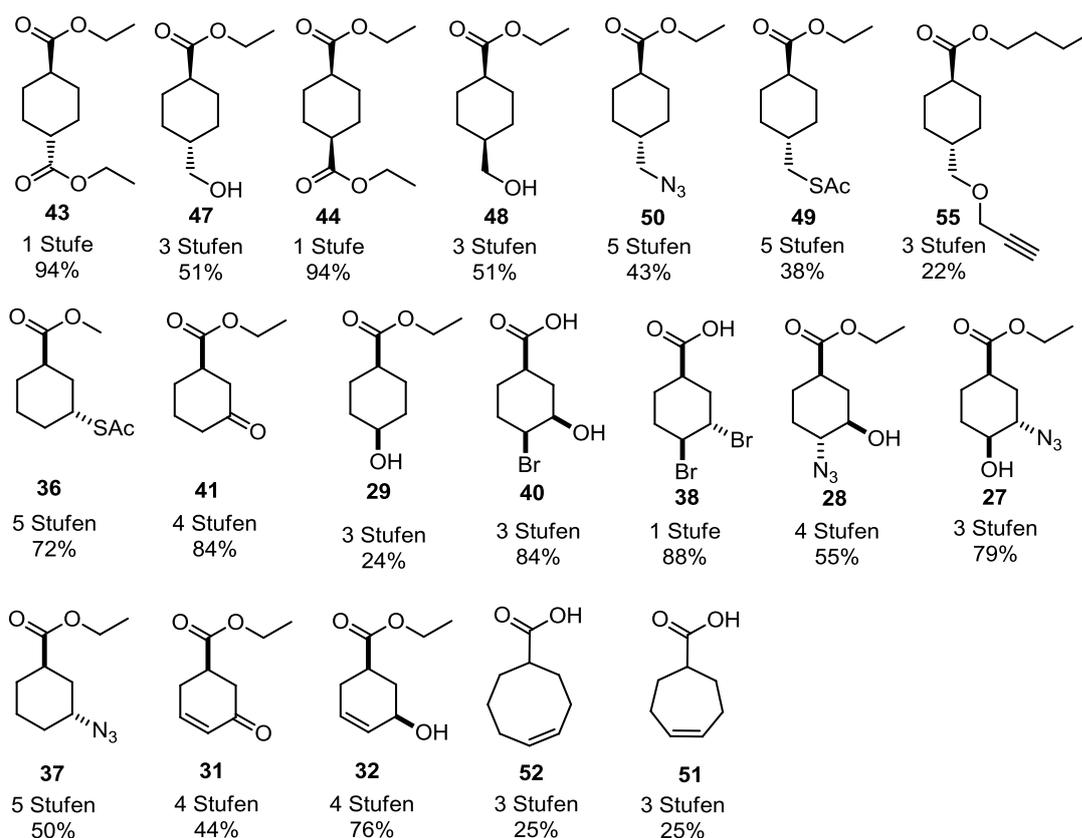


Abbildung 7: Getestete synthetisierte künstliche Bausteine für die Fermentation der rapK-Mischkulturen. Verbindungen **27**, **28**, **38**, **40** und **55** wurden bereits im Rahmen der Masterarbeit synthetisiert.^[79]

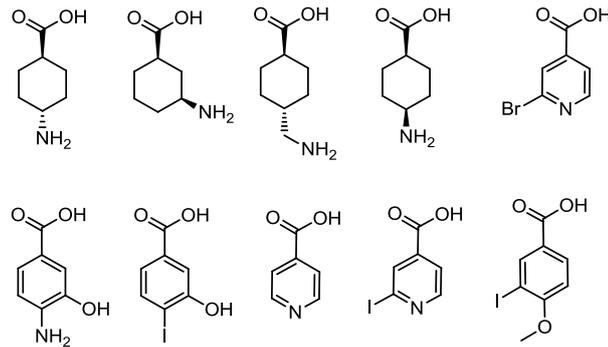


Abbildung 8: Getestete kommerziell erhältliche künstliche Bausteine für die Fermentation der rapK-Mischkulturen.

Fütterungsexperimente der rapK-Blockmutante zeigten nur beim Methanolextrakt von **29** und **27** ein neues Signalmuster. Im Falle von **29** war dies nicht überraschend, da es sich hierbei um die 4-Hydroxycyclohexancarbonsäure handelt, von der man weiß, dass diese als Substrat akzeptiert wird.^[70, 82] Bei der Fütterung von 5 mM **27** gibt es zwei zusätzliche Signale mit Retentionszeiten von 7,36 min und 8,07 min (Abbildung 9).

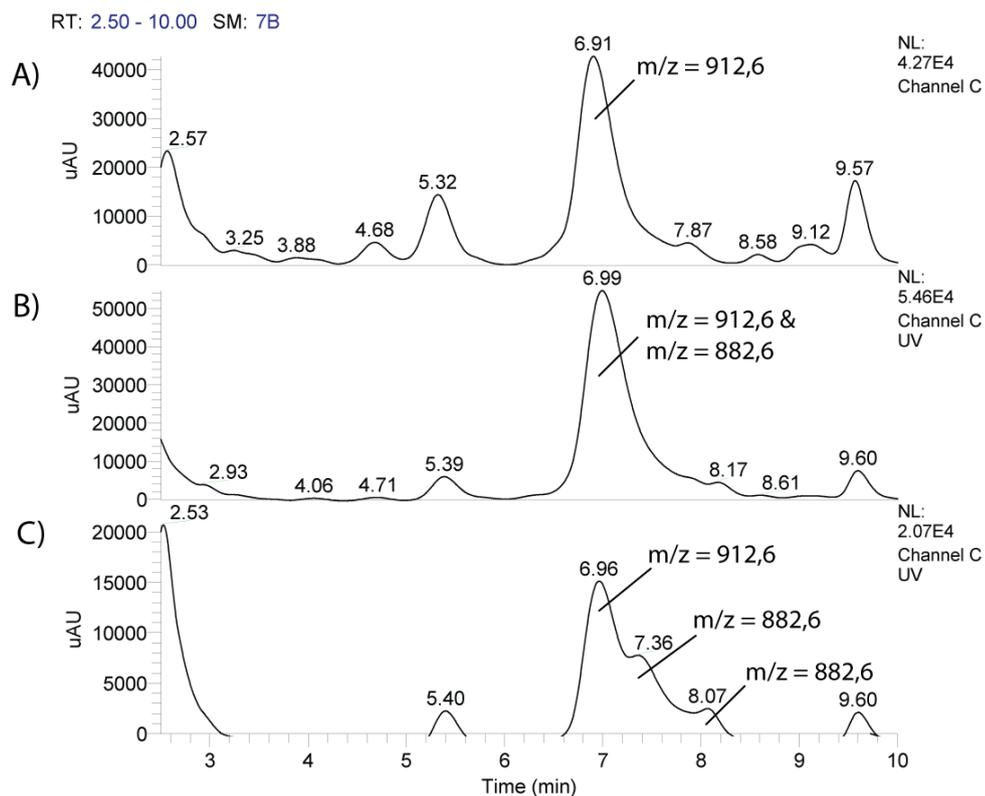


Abbildung 9: HPLC-Chromatogramme der Methanolextrakte der rapK-Mutanten im Negativmodus. Hier zu sehen sind die Chromatogramme bei 280nm. **A:** Ohne synthetischen Baustein; **B:** Cyclohexancarbonsäure [5 mM], **C:** **27** [5 mM]. Abbildung stammt aus der Dissertation von Dr. U. Sundermann S.139.^[76]

Ergebnisse und Diskussion

Die Signale zeigten jedoch das durch den Einbau von Cyclohexansäure bekannte Masse-zu-Ladungsverhältnis von 882 [M-H]⁻ und nicht wie erwartet ein Masse-zu-Ladungsverhältnis von 923 [M-H]⁻ oder das der zum Amid reduzierten Variante ([M-H]⁻ = 897) auf. Aufgrund der unterschiedlichen Retentionszeiten konnte Dr. U. Sundermann eine Verwechslung mit den Extrakten der Fütterung von Cyclohexancarbonsäure ausschließen. Die beiden Retentionszeiten mit identischen Masse-zu-Ladungsverhältnissen deuten auf die Bildung zweier Epimere hin. Um die Substanz weiter zu charakterisieren wurden HRMS-Messungen, sowie MS/MS-Analysen der drei Substanzen (Rapamycin, 39-Desmethoxyrapamycin und das neue Derivat) durchgeführt. Die Messungen wurden im Positivionenmodus unter Verwendung eines Acetonitril-/Wasser-Gemisches bestimmt. Dabei sind die zu erwartenden Masse-zu-Ladungsverhältnisse der Natriumaddukte: 936 [M+Na]⁺ für Rapamycin (**1**) und 906 [M+Na]⁺, welches sowohl für 39-Desmethoxyrapamycin (**54**) als auch für die durch Fütterung von **27** erzeugte Substanz. Die charakteristische Fragmentierung von Rapamycin ist literaturbekannt^[70, 83, 84] und bildet die Grundlage dieser Auswertung (Abbildung 10, Tabelle 1). Die Unterschiede in der Masse der einzelnen Fragmente kann so Aufschluss darüber geben, an welcher Position eine Veränderung des mit **27** gefütterten Derivats im Gegensatz zum Rapamycin oder 39-Desmethoxyrapamycin auftritt.

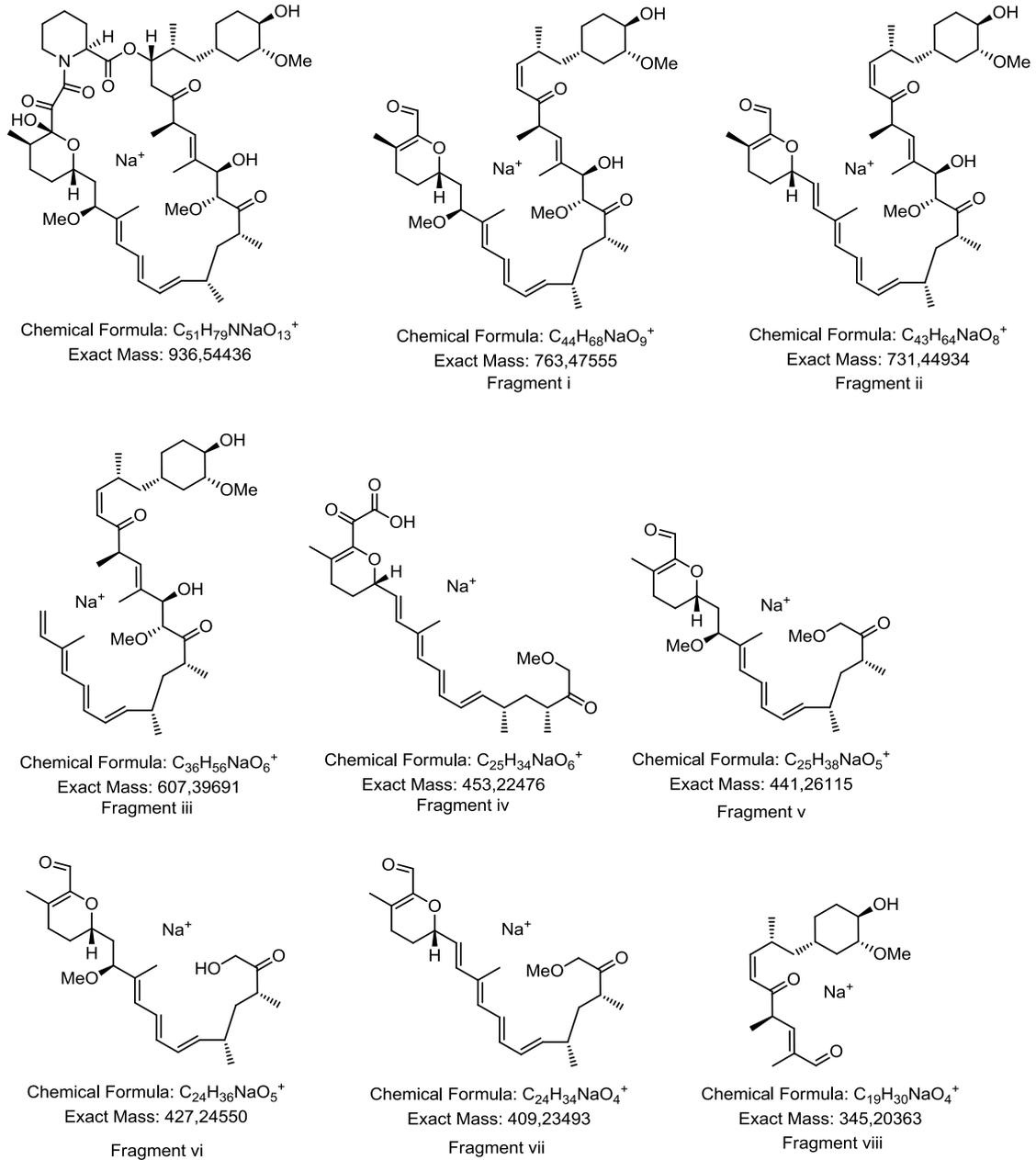
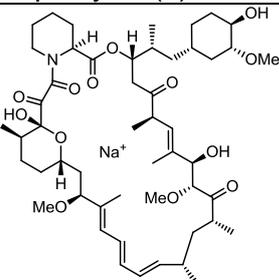


Abbildung 10: Hauptfragmente von Rapamycin bei der MS/MS Analyse. [70, 83, 84]

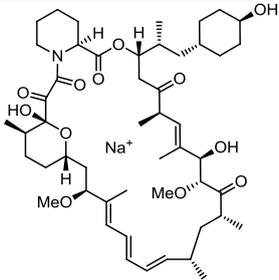
Tabelle 1: MS/MS-Fragmentierung von Rapamycin.

| Rapamycin (1) | Fragment | Theor. berechnet | Exp. gefunden |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------|---------------|
|  | $C_{51}H_{79}NNaO_{13}^+$ | 936,54436 | 936,54405 |
| | $C_{44}H_{68}NaO_9^+$ (i) | 763,47555 | 763,4734 |
| | $C_{43}H_{64}NaO_8^+$ (ii) | 731,44934 | 731,4473 |
| | $C_{36}H_{56}NaO_6^+$ (iii) | 607,39691 | 607,3950 |
| | $C_{25}H_{34}NaO_6^+$ (iv) | 453,22476 | 453,2235 |
| | $C_{25}H_{38}NaO_5^+$ (v) | 441,26115 | 441,2599 |
| | $C_{24}H_{36}NaO_5^+$ (vi) | 427,24550 | 427,2443 |
| | $C_{24}H_{34}NaO_4^+$ (vii) | 409,23493 | 409,2341 |
| | $C_{19}H_{30}NaO_4^+$ (viii) | 345,20363 | 345,2029 |

Ergebnisse und Diskussion

Das Fragmentierungsmuster von 39-Desmethoxyrapamycin (**54**) entspricht ebenfalls dem Fragmentierungsmuster (Tabelle 2).

Tabelle 2: MS/MS-Fragmentierung von 39-Desmethoxyrapamycin.

| 39-Desmethoxyrapamycin(54) | Fragment | Theor. berechnet | Exp. gefunden |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------|---------------|
|  | $C_{50}H_{77}NNaO_{12}^+$ | 906,53380 | 906,5321 |
| | $C_{43}H_{66}NaO_8^+$ | 733,46499 | 733,4623 |
| | $C_{42}H_{62}NaO_7^+$ | 701,43878 | 701,4362 |
| | $C_{35}H_{54}NaO_5^+$ | 577,38635 | 577,3840 |
| | $C_{25}H_{34}NaO_6^+$ | 453,22476 | 453,2231 |
| | $C_{25}H_{38}NaO_5^+$ | 441,26115 | 441,2595 |
| | $C_{24}H_{36}NaO_5^+$ | 427,24550 | 427,2440 |
| | $C_{24}H_{34}NaO_4^+$ | 409,23493 | 409,2336 |
| | $C_{18}H_{28}NaO_3^+$ | 315,19307 | 315,1921 |

Basierend auf dem Vergleich der MS/MS-Fragmente von Rapamycin und 39-Desmethoxyrapamycin mit dem MS/MS-Fragmentierungsmuster des neuen Rapamycinderivates (Tabelle 3) und unter Berücksichtigung der Biosyntheselogik^[54, 59]sowie post-translationalen Modifikation in der Rapamycinbiosynthese^[60] konnte eine Struktur postuliert werden (Abbildung 11, Tabelle 4).

Tabelle 3: Gegenüberstellung der MS/MS-Fragmente von Rapamycin, 39-Desmethoxyrapamycin und des neuen Rapamycinderivat.

| Fragment | Rapamycin (exp.) | 39-Desmethoxyrapamycin (exp.) | Neues Derivat (exp.) |
|----------|------------------|-------------------------------|----------------------|
| i | 763,4734 | 733,4623 | 733,4622 |
| ii | 731,4473 | 701,4362 | 701,4360 |
| iii | 607,3950 | 577,3840 | 577,3838 |
| iv | 453,2235 | 453,2231 | 423,2425 |
| v | 441,2599 | 441,2595 | 411,2489 |
| vi | 427,2440 | 427,2440 | - |
| vii | 409,2336 | 409,2336 | 379,2231 |
| viii | 345,2029 | 315,1921 | 345,2025 |

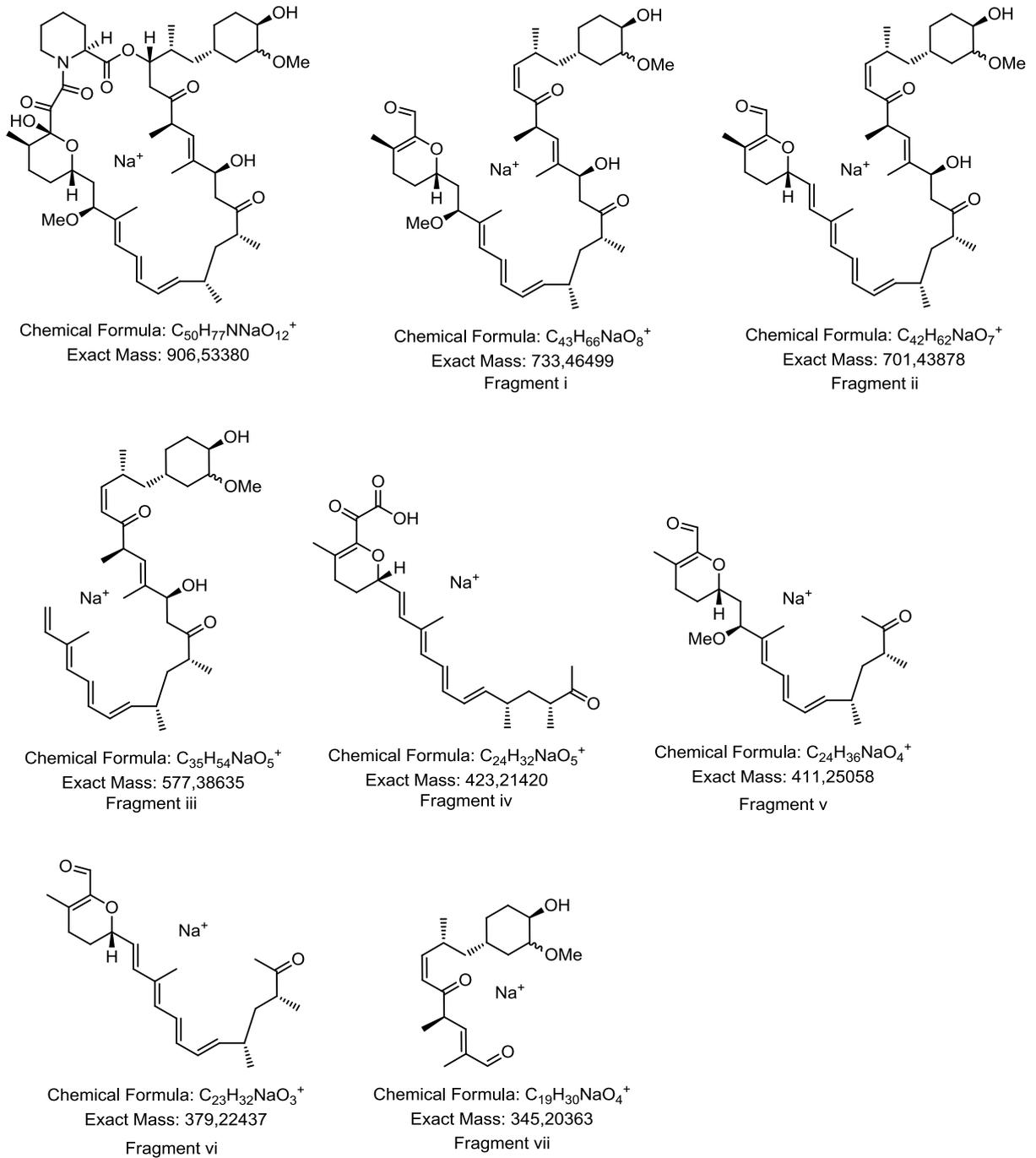
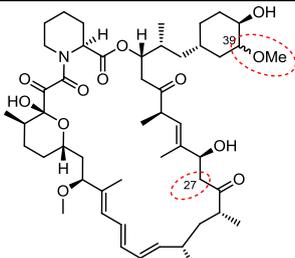


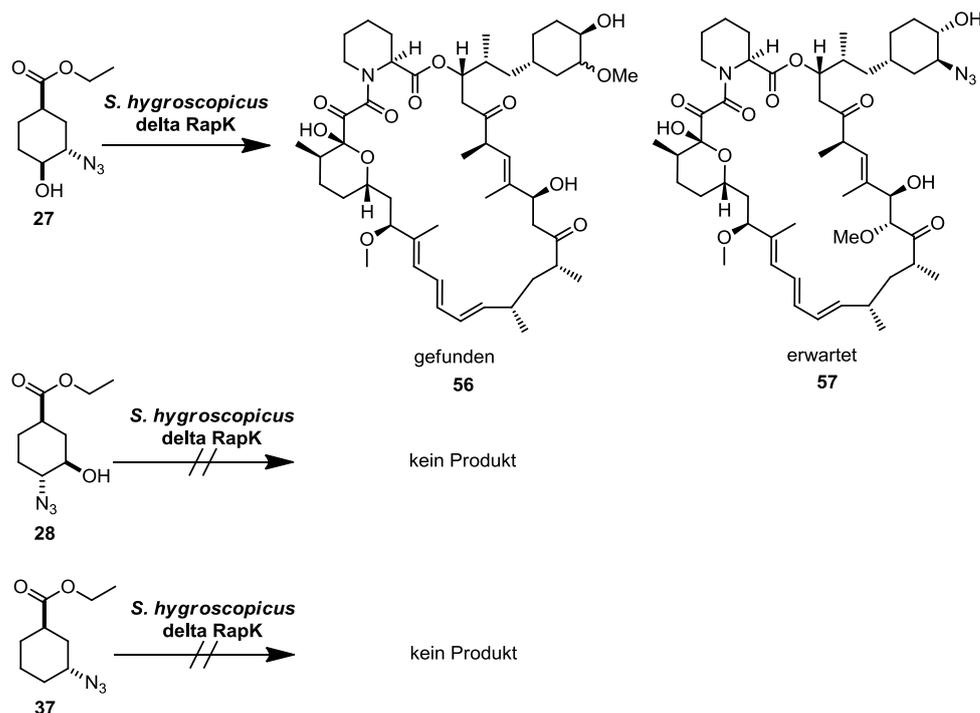
Abbildung 11: Hauptfragmente des neuen Rapamycinderivates bei der MS/MS Analyse.

Die experimentellen Befunde der MS/MS-Analyse stimmen mit den theoretischen Fragmentierungsmuster überein (Tabelle 4).

Tabelle 4: MS/MS-Fragmentierung von 27-Desmethoxyrapamycin.

| 27-Desmethoxyrapamycin (54) | Fragment | Theor. berechnet | Exp. gefunden |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|------------------|---------------|
|  | $C_{50}H_{77}NNaO_{12}^+$ | 906,53380 | 906,5321 |
| | $C_{43}H_{66}NaO_8^+$ (i) | 733,46499 | 733,4622 |
| | $C_{42}H_{62}NaO_7^+$ (ii) | 701,43878 | 701,4360 |
| | $C_{35}H_{54}NaO_5^+$ (iii) | 577,38635 | 577,3838 |
| | $C_{24}H_{32}NaO_5^+$ (iv) | 423,21420 | 423,2425 |
| | $C_{24}H_{36}NaO_4^+$ (v) | 411,25058 | 411,2489 |
| | $C_{23}H_{32}NaO_3^+$ (vi) | 379,22437 | 379,2231 |
| | $C_{19}H_{30}NaO_4^+$ (vii) | 345,20363 | 345,2025 |

Aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich bei den neuen Rapamycinderivat aus der Fütterung von **27** um das 27-Desmethoxyrapamycin (**56**). Es besitzt wie das Rapamycin an Position C39 eine Methoxygruppe, jedoch keine Methoxygruppe an Position 27, wie durch die MS/MS-Analyse deutlich wurde. Interessanterweise zeigen die Fütterungsexperimente mit dem Regioisomer **28** und der *cis*-3-Azidocyclohexancarbonsäure **37** keinen Einbau. Diese Substanzen haben einen negativen Effekt auf die Rapamycinproduktion (Schema 24).



Schema 24: Zeigt die Regioisomere **27** und **28** und Verbindung **37**. Nur **27** führte zur Bildung eines neuen Rapamycinderivats.

Das Ergebnis ist überraschend, da Azide in der Bioorganischenchemie verwendet werden, weil sie weitgehend bioorthogonal sind. Dies hätte normalerweise zur Bildung des 39-Azidorapamycins (**57**) (Schema 24) geführt und nicht zur Bildung des 27-Desmethoxyrapamycins. Allenfalls wurde in der Planung des Experiments mit einer Reduktion zum Aminderivat gerechnet. Des Weiteren stellt sich die Frage wie ein

postuliertes Azid an Position C39 in eine Methoxygruppe umgewandelt wird und warum an Position C27 eine Methoxygruppe fehlt. Ebenfalls weist das LC-ESI-MS Chromatogramm (Abbildung 9) zwei Signale der gleichen Masse-zu-Ladungsverhältnis mit unterschiedlichen Retentionszeiten auf, was auf zwei Diastereomere hindeutet. Bei Rapamycin wird die Position C27 durch post-PKS-Prozesse modifiziert, bei der die Cytochrom-P₄₅₀-Monooxygenase RapN die Hydroxylierung selektiv katalysiert und diese anschließend durch die O-Methyltransferase RapQ methyliert wird.^[60, 71] Durch Zugabe von **27** wird dieser Mechanismus gestört.

Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Kirschning berichteten 2013 über eine ähnliche Beobachtung bei der Mutasynthese zur Generierung neuer Ansamitocinderivate.^[85] Bei der Fütterung von Azidobenzoensäuren zu einer Variante von *Actinosynnema pretiosum* erhielten sie Derivate, bei denen die Azidfunktion zu einem Amin reduziert wurde (Abbildung 12).

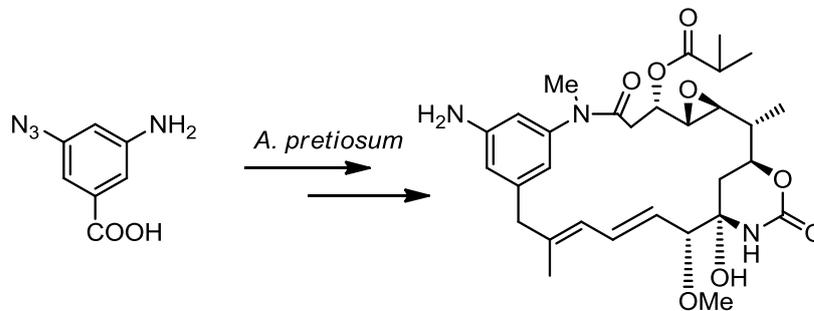


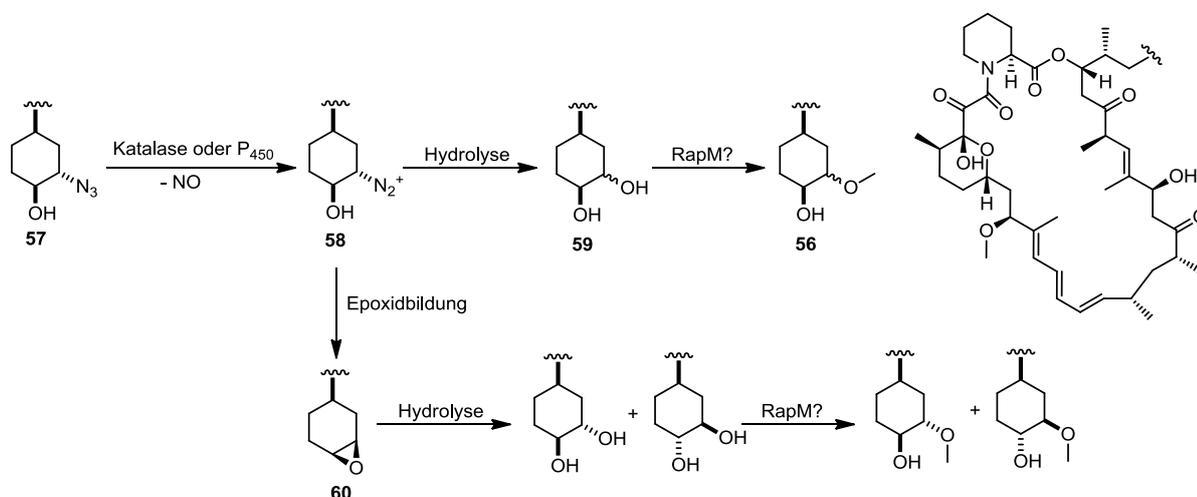
Abbildung 12: Fütterung von Azidobenzoensäure zu einer AHBA(-)-Blockmutante von *A. pretiosum*.^[85]

Bis dato ist bekannt, dass einige Nitrogenasen, die ursprünglich für die N₂-Fixierung in einigen Bakterien und Archaea verantwortlich sind, Azidanionen unter Bildung von N₂ und NH₃ reduzieren können.^[85-87] Dies erklärt jedoch nicht die Beobachtung in unserem Fall. Bei der Bildung des 27-Desmethoxyrapamycins (**56**) wurde auch nach dem reduzierten Azidderivat gesucht, jedoch nicht gefunden. Dies bedeutet, dass in unserem Fall das Azid nicht zum Amin reduziert wird, sondern vollständig aus dem Cyclohexangrundgerüst entfernt wird. In einem Übersichtsartikel von Roger J. Griffin wird ausführlich auf die biologische Aktivität von Aziden eingegangen. In diesem Artikel wird hervorgehoben, dass Natriumazid ein weitverbreiteter Inhibitor von Häm-Enzymen und anderen metallabhängigen Enzymen ist.^[88] Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Alkylaziden (wie Cyclohexylazid) diese Enzyme in mM-Konzentrationen reversibel inhibieren können. Der exakte Mechanismus der Azid-Toxikologie *in vivo* ist größtenteils noch unbekannt, es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Biotransformation von Aziden zu Stickstoffmonoxid (NO) stark daran beteiligt ist.^[89] Das Enzym Katalase, sowie eine Vielzahl von Peroxidasen sind in der Lage Azide in Gegenwart von H₂O₂ unter der Bildung von NO zu oxidieren.^[90] Das

Ergebnisse und Diskussion

gebildete NO interagiert mit Thiolen und Hämproteinen und beeinflusst somit verschiedene Stoffwechselprozesse.^[91-97]

Aufgrund dieser Ergebnisse ist es möglich, dass der Baustein **27** nicht nur Vorläufer in der Rapamycinbiosynthese verwendet wurde, sondern auch als Inhibitor der RapN Cytochrom-P₄₅₀-Monooxygenase gewirkt hat, wodurch eine Hydroxylierung und anschließende Methylierung an Position C27 nicht möglich war. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Azid intrazellulär zu NO oxidiert wurde. Die resultierende Diazoniumspezies (**58**) am verbleibenden Kohlenstoffgerüst kann in wässriger Umgebung hydrolysieren (**59**), was die Bildung von Stereoisomeren zur Folge hätte (Schema 25).



Schema 25: Möglicher Mechanismus zum oxidativen Abbau von Aziden. Das Azid kann intrazellulär zu NO oxidiert werden. Die resultierende Diazoniumspezies **58** kann direkt durch H₂O substituiert werden, oder es erfolgt eine Epoxidbildung unter anschließender Hydrolyse und Methylierung.

Ob das Diazoniumion direkt durch H₂O substituiert wird, oder erst eine Epoxidbildung erfolgt, unter anschließender Hydrolyse ist derzeit nicht eindeutig bekannt. Das Epoxid (**60**) konnte jedoch durch LC/MS-Analysen nicht gefunden werden. Ob diese mögliche Abbaureaktion vor, während oder nach dem Einbau stattfindet ist nach dem derzeitigen Wissenstand noch völlig unklar. Die Methylierung dieser Position kann dann durch RapM erfolgen. Unter anderem ist bekannt, dass die post-PKS-Maschinerie durch den Einbau nicht-nativer Bausteine gestört werden kann, sodass die Bildung des Stereoisomerengemisches dafür sorgt, dass RapN das Rapamycinderivat nicht mehr als natürliches Substrat erkennt und somit auch nicht mehr an Position C27 hydroxyliert. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das gebildete NO RapN inhibiert und somit zur fehlenden Hydroxylierung an Position C27 führt. Warum spezifisch RapN inhibiert wird und nicht auch RapJ, welches für die Oxidation an Position C9 verantwortlich ist, bleibt fraglich. Dies ist nur eine mögliche Erklärung für die beobachteten Ergebnisse der Fütterung von **27**, **28** und **37** hingegen waren zelltoxisch (Schema 24).

Um eine eventuelle Oxidation des Azidbausteins zu vermeiden, wurden verschiedene Literaturbekannte P_{450} -Inhibitoren verwendet (Abbildung 13). Im Idealfall haben diese Inhibitoren nur Einfluss auf die post-PKS-Prozessierung von Rapamycin und führen zu verschiedenen Rapamycinderivaten mit unterschiedlichen Redox- und Substitutionsmustern. Im schlechtesten Fall würde eine Verwendung dieser Inhibitoren zum Tod des Bakteriums führen, da die P_{450} -Enzyme essentiell im bakteriellen Metabolismus sind und die Inhibitoren keine Spezifität aufweisen.

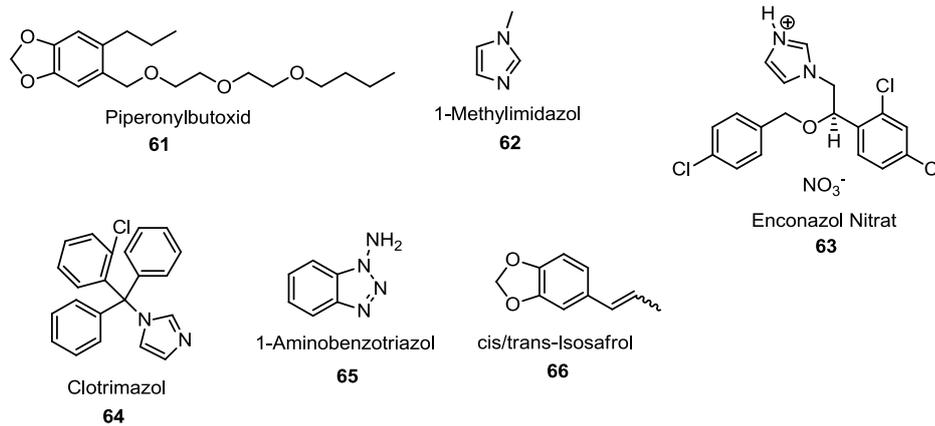
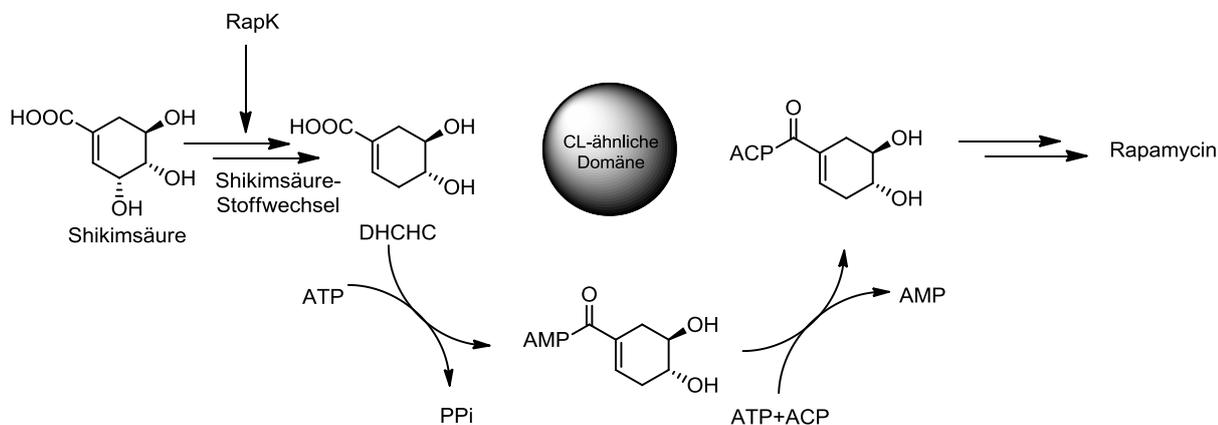


Abbildung 13: Verwendete P_{450} -Inhibitoren.

So wurden von Dr. U. Sundermann die verschiedenen P_{450} -Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen gefüttert. Dabei wurde zunächst die maximale Konzentration an Inhibitor ausgetestet, bei der immer noch Rapamycin gebildet wurde. Piperonylbutoxid (**61**), 1-Methylimidazol (**62**), cis/trans-Isosafrol (**66**) zeigten bis zu einer Konzentration von 40 mM keinen nennenswerten Effekt und eignen sich daher nicht als effektiver Inhibitor. Enconazol-Nitrat (**63**) zeigte ab Konzentrationen von 300 μM eine Inhibition der Rapamycinbildung. Clotrimazol (**64**) zeigte eine Inhibition der Rapamycinproduktion im Bereich von 4,3 μM bis 12,5 μM . Verwendung höherer Konzentrationen führte zu toxischen Effekten. Der Einsatz der in Abbildung 13 gezeigten P_{450} -Inhibitoren zeigte jedoch nicht die gewünschte Wirkung. Die Fermentationen führten zu schwer auswertbaren Produktgemischen ohne präparativen Nutzen.

4.3 Fazit und Diskussion

Ein Grund für die geringe Akzeptanz diverser Cyclohexancarbonsäurederivate könnte die hohe Substratspezifität der PKS-Starteinheit im Lademodul sein (Schema 26).



Schema 26: Vermuteter Reaktionsweg zur Aktivierung und Beladung der Rapamycin-PKS. Im Lademodul befindet sich eine CL-Domäne die nur Cyclohexancarbonsäurederivate akzeptiert; ACP= Acylcarrierprotein, ATP= Adenosintriphosphat, AMP= Adenosinmonophosphat, CL= Carbonsäureligase, PP_i= Pyrophosphat.

Die Auswahl und Aktivierung der Cyclohexancarbonsäuren erfolgt im Lademodul der Rapamycin-PKS durch eine Carbonsäureligase.^[70] Möglicherweise ist die Substratspezifität der CL-Domäne limitierend. Dies würde auch die unterschiedlichen Einbauraten der Cyclohexancarbonsäurederivate erklären die an unterschiedlicher Position hydroxyliert oder fluoriniert sind.^[75, 77] Desweiteren gelang der Einbau von Fluorverbindungen, jedoch ist deren Einbau stark abhängig von der Stereochemie und der Position (Abbildung 14).

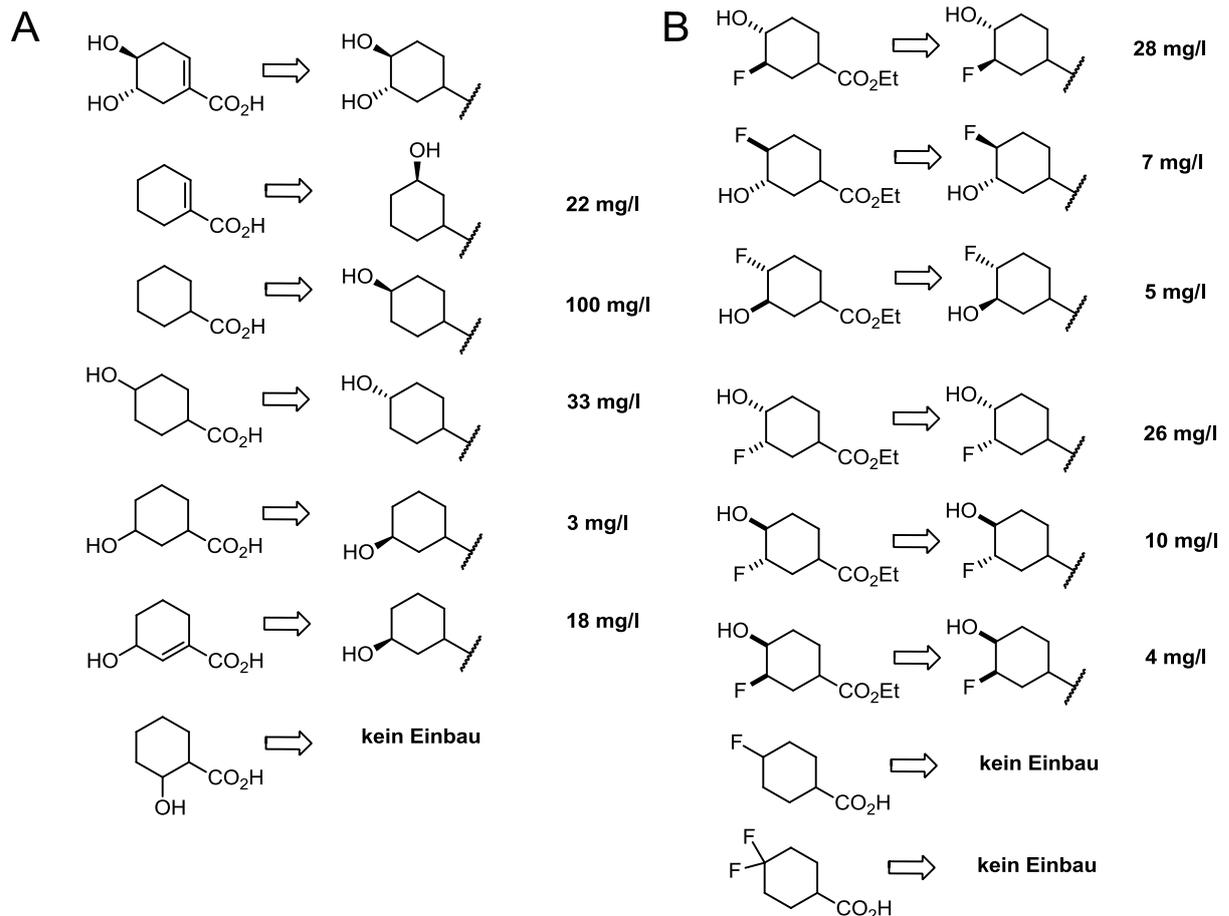


Abbildung 14: Verschiedene Cyclohexancarbonsäurederivate, deren Einbau und deren produzierten Mengen pro Liter. **A:** Einbau von Hydroxycyclohexancarbonsäuren in einer *S. hygroscopicus* MG2-10-Variante^[77]; **B:** Einbau von Fluorocyclohexancarbonsäuren.^[75]

Wie aus Abbildung 14A deutlich wird, hat bereits die Position der Hydroxygruppe einen großen Effekt auf die Einbauraten, sodass nur Verbindungen akzeptiert werden bei denen sich die Hydroxygruppe in Position 4 befindet. Dies und die Tatsache, dass Fluor bereits einen großen Einfluss auf den Einbau zu haben scheint, zeigt, dass die CL sehr substratspezifisch ist und womöglich einer der Gründe sein kann, warum ein Großteil der synthetisierten Derivate aus Abbildung 7 und alle kommerziellerhältlichen Säuren aus Abbildung 8 nicht akzeptiert werden. Zusammenfassend kann man sagen, dass 29 verschiedene Cyclohexan-carbonsäurederivate an die rapK-Blockmutanten gefüttert wurden. Jedoch führte nur Verbindung **27** zu einem neuen Rapamycinderivat **56**, das aber keine Möglichkeit bietet selektiv weitere chemische Modifikationen durchzuführen. Ebenfalls scheiterte der Versuch die Azidfunktion von Verbindung **27** zu erhalten, indem der Fermentation nichtspezifische P₄₅₀-Inhibitoren hinzugefügt wurde. Verdeutlicht wird hier auch ein Nachteil der „klassischen Mutasynthese“. So ist es häufig nicht möglich rationale Derivate eines Polyketides mittels *knock out* von Enzymen zu erhalten, die für die Synthese

Ergebnisse und Diskussion

der Start- oder Endeinheiten verantwortlich sind. Da für einen rationalen Ansatz keine ausreichende Informationsbasis zur Verfügung steht, müssen eine Vielzahl an Derivaten synthetisiert und getestet werden, um das Substratprofil abzutasten, wobei häufig nur Derivate akzeptiert werden, welche dem natürlichen Substrat sehr ähneln.

Um das Problem der Substratspezifität zu umgehen, könnte man das Lademodul, sowie die KS-Domäne des ersten Verlängerungsmoduls inaktivieren, wie es bereits bei einzelnen PKS angewandt wurde.^[14, 53, 54] Durch die Inaktivierung der KS in Modul1 kann die Biosynthese erst komplementiert werden, wenn das gewünschte Cyclohexancarbonsäurederivat als Di- oder Triketid gefüttert wird (Abbildung 15). Der Syntheseaufwand (abhängig von den Resten R¹ und R²) wäre wesentlich größer. Eine mögliche Syntheseroute zur Synthese eines solchen Diketides ist in Schema 27 dargestellt. Die Synthese ist analog zur Totalsynthese von Rapamycin nach D. Romo *et al.*^[98]

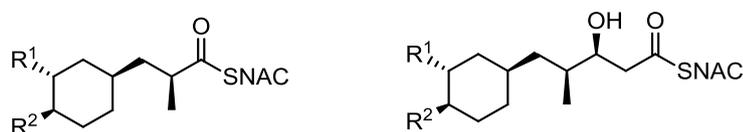
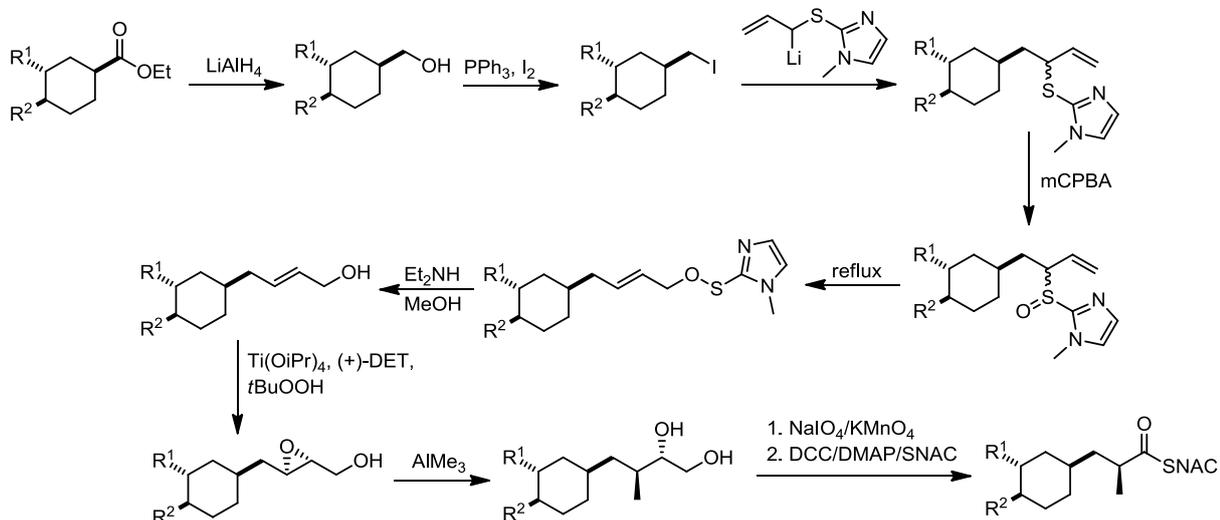


Abbildung 15: Allgemeine Struktur der Ketide für den Einbau in KS₀- und KS₁-Deletionsmutanten. Die Reste R¹ und R² sind hier nicht genauer definiert und können beliebige funktionelle Gruppen sein.



Schema 27: Synthese des Diketides nach D. Romo *et al.*^[98] Die Reste R¹ und R² sind nicht genauer definiert. Als Ausgangspunkt der Syntheseroute könnten die Verbindungen aus Abbildung 7 und Abbildung 8 verwendet werden, sofern sie mit der Reaktionssequenz kompatibel sind.

Desweiteren ist die Handhabung der Rapamycinvarianten fordernd. So stellte sich heraus, dass nach jedem Verwenden der rapK-Blockmutanten der Anteil an Rapamycinwildtypproduzenten zunahm und die Lagerstabilität dieser Bakterienvarianten nicht hinreichend ist,

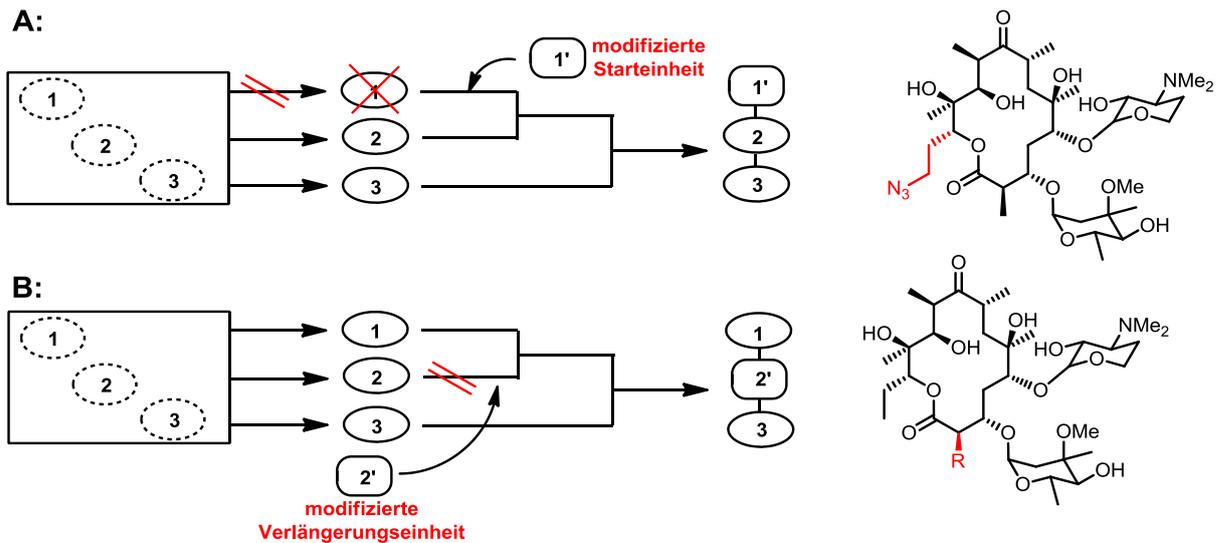
verglichen mit dem molekularbiologischen Aufwand der betrieben werden muss, um diese rapK-Blockmutanten zu generieren.^[76]

4.4 Die Entwicklung einer enzymgerichteten Mutasyntese am Beispiel des Erythromycins

Die Mutasyntese erfordert einen sehr hohen molekularbiologischen und chemischen Aufwand, um neue Polyketidderivate aus nicht-natürlichen Start- oder Endeinheiten zu erhalten. Oftmals ist deren Einbau nicht planbar. Daher stellt sich die Frage, ob es nicht möglich ist, einen wesentlich rationaleren Weg einzuschlagen, der es ermöglicht einen selektiven Einbau zu gewährleisten. Dazu müsste die Substratspezifität einer einzigen Acyltransferase (AT) innerhalb einer PKS geändert werden, was detaillierte Kenntnisse und möglichst viele Daten über die Polyketidsynthese (PKS) erfordert. Dieses Konzept wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit, sowie der Dissertation von Dr. U. Sundermann als enzymgeleitete Mutasyntese vorgeschlagen. Aus diesem Grund wurden die Studien zur Substratspezifität an einer der bestuntersuchteten PKS durchgeführt; der Erythromycin-PKS 6-Deoxyerythronolid B Synthase (DEBS).

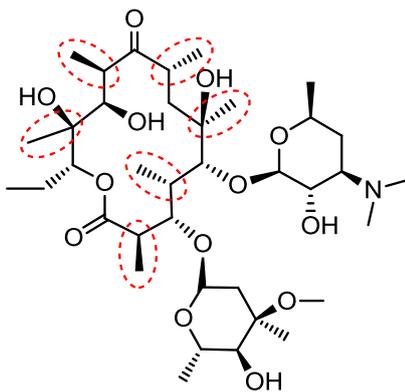
4.4.1 Chemomikrobieller Einbau von artifiziellen Malonaten in Erythromycin

Erythromycin, dessen Grundgerüst von DEBS synthetisiert wird, ist seit mehr als 50 Jahren als Antibiotikum unverzichtbar. Betrachtet man das Polyketid Erythromycin genauer, so kann nur an der Ketofunktionalität an Position 9 eine direkte orthogonale Derivatisierung durchgeführt werden.^[99] Mittels Partialsynthese erfolgte die Modifikation des Ketons zu verbesserten Erythromycinderivaten, die Einsatz in der Klinik finden.^[99-101] Des Weiteren gelang es eine Vielzahl an Derivate zu synthetisieren, deren Ausgangsmaterial Erythromycin ist.^[102] Mittels vorläuferdirigierte Biosynthese (engl.: *precursor-directed biosynthesis*, kurz: PDB) ist es einer Vielzahl von Arbeitsgruppen gelungen Derivate des Erythromycins zu erhalten, die in der Region der Starteinheit modifiziert sind.^[103-106] Hierbei wurden heterolog zugeführte synthetische Starteinheiten, meist synthetische Di- oder Triketide in das Polyketid eingebaut.^[107] So konnte auch N. Pryk im Rahmen seiner Masterarbeit mittels PDB Erythromycinderivate gewinnen (Schema 28A).^[108]



Schema 28: **A:** Prinzip der Mutasynthese. Durch *knock out* des Beladungsmoduls können nicht-natürliche Di- oder Triketide eingebaut werden.^[103-108] **B:** Prinzip der enzymgeleiteten Mutasynthese. Die Änderung der Substratspezifität einer AT innerhalb der PKS ermöglicht den Einbau von modifizierten Verlängerungseinheiten.

Derzeit erlaubt die vorläuferdirigierte Biosynthese (Kapitel 4.2) nur den Einbau nicht-natürlicher Start- und gelegentlich Endeinheiten in ein Polyketid, häufig nur mit einem begrenzten und nicht manipulierbaren Substratspektrum (Abbildung 14). Für die Semisynthese von Naturstoffen hätte die gezielte Modifikation einer AT-Domäne und damit eine Änderung in ihrer Substratspezifität enormes Potenzial. Dadurch wäre man in der Lage, nicht-natürliche Verlängerungseinheiten mit bioorthogonaler Funktionalität in ein Polyketid zu integrieren. Durch die Mutation von AT-Domänen wäre man theoretisch in der Lage an jedem zweiten Kohlenstoffatom innerhalb des Polyketides eine Modifikation vorzunehmen (Abbildung 16).



Erythromycin A (2)

Abbildung 16: Struktur von Erythromycin A (2), rot hervorgehoben sind jene Positionen die geändert werden können, wenn man das Substratspektrum der entsprechenden AT ändert.

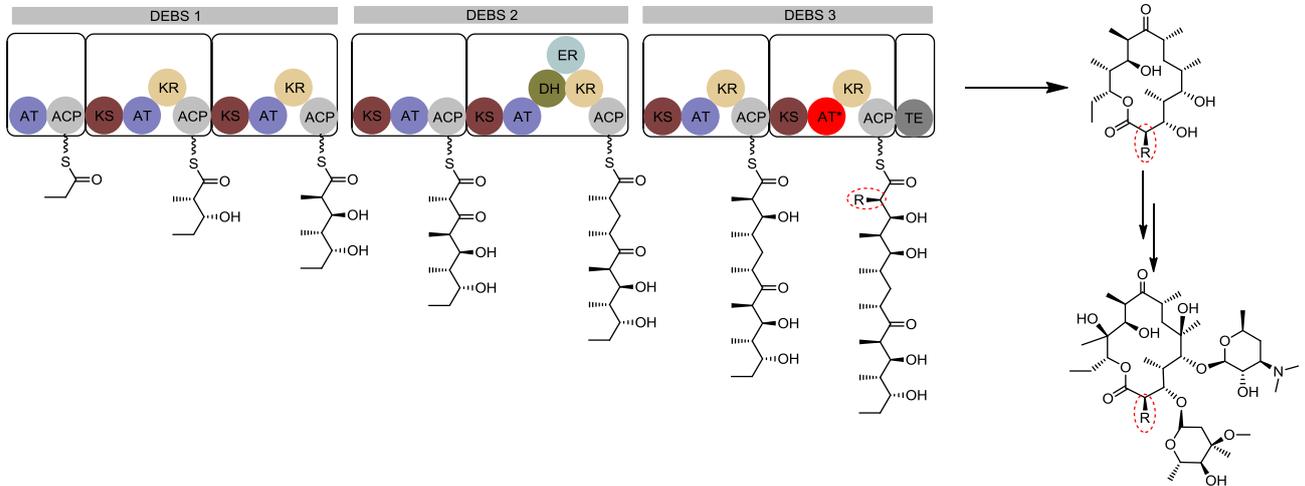
4.5 Studien zur Substratspezifität von *cis*- und *trans*-agierenden Acyltransferasen

Natürliche strukturelle Vielfalt wird sowohl durch die Variation im Redoxmuster als auch durch die Stereochemie und die Wahl der biosynthetischen Bausteine innerhalb der Polyketide erreicht.^[8, 109] In Anbetracht der Komplexität dieser Polyketide ist deren Redoxvariation nur auf die Reduktion der zunächst entstehenden β -Ketothioester beschränkt. Eine wesentlich größere Vielfalt, angefangen vom einfachen Wasserstoff über lange Alkylketten, bis hinzu primären Aminen, wird durch den Einbau verschiedener natürlicher Malonate in dem sich bildenden Polyketid erzielt.^[8, 110] Entscheidend für die enzymgerichtete Mutagenese von Polyketidderivaten ist eine verallgemeinerbare Strategie, um die Vielfalt der Verlängerungseinheit zu beeinflussen.^[111-115] Nach derzeitigem Kenntnissstand über die Enzymologie der PKS liegt die Kontrolle über die Auswahl der Verlängerungseinheiten hauptsächlich bei den AT Domänen, welche die Acylierung der *Acyl Carrier Proteine* (ACP) katalysieren.^[11] Auf proteinchemischer Ebene wird zwischen den *cis*-AT und den *trans*-AT unterschieden. Somit gibt es zwei unterschiedliche Möglichkeiten die Substratspezifität solcher AT zu verändern und den Einbau eines möglichen nicht-natürlichen Malonates zu gewährleisten.

4.5.1 *cis*-AT-Ansatz

Die Substratspezifität kann innerhalb einer PKS verändert werden, indem man AT-Domänen aus anderen PKS transplantiert.^[116-118] Jedoch führt dieses *domainswapping* in den meisten Fällen zu inaktiven Hybridenzymen. Im Besonderen für AT-Domänen führte das *swapping* zur Beeinträchtigung der Proteinfaltung.^[119-121] Eine wesentlich effizientere Alternative ist die

direkte Manipulation der AT-Domäne innerhalb der PKS selbst. Durch Austausch einzelner Aminosäuren in der AT-Domäne kann das Substratspektrum geändert werden, ohne die gesamte katalytische Domäne zu verändern (Schema 29).^[122, 123]



Schema 29: Schematischer Überblick der modifizierten Biosynthese zur Synthese von 2-Erythromycinderivaten. Durch gezielte Punktmutation der AT_{DEBS} (rot markiert) aus DEBS3 kann sich das Substratspektrum dieser AT-Domäne verändern und somit den Einbau nicht-natürlicher Malonate ermöglichen.

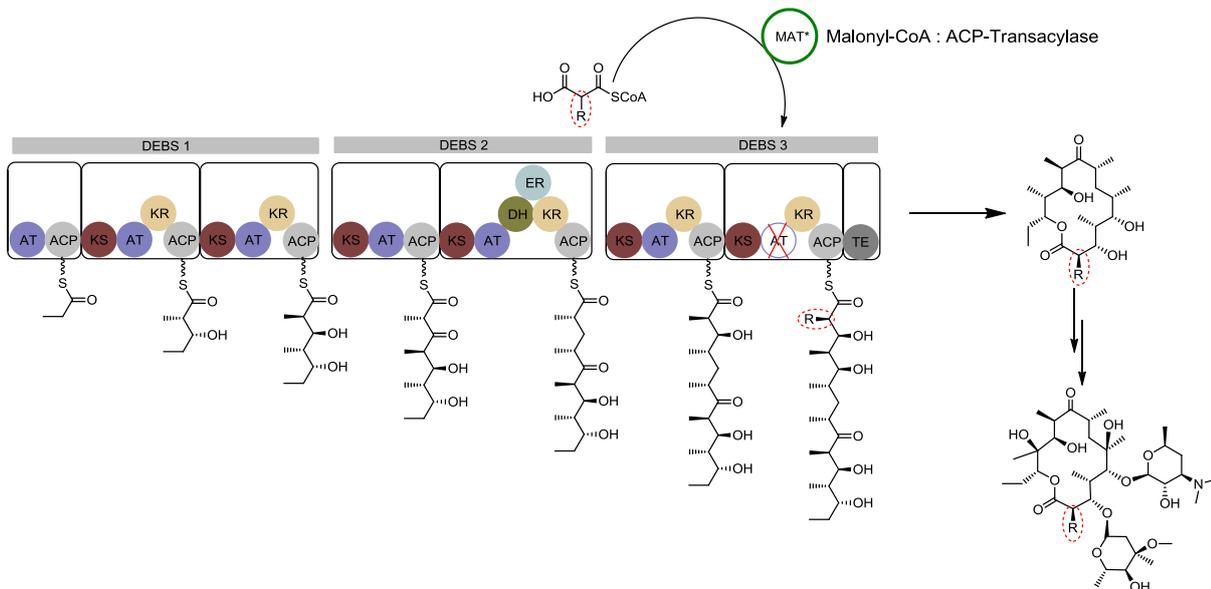
Die Komplexität der PKS und das derzeit mangelnde Verständnis der Substratspezifität der AT machen die direkte Mutagenese von AT-Domänen besonders anspruchsvoll. Ihre synthetische Nutzung hat Potenzial.^[53] Jedoch stellt die Größe der Gencluster von Typ-I-PKS den Experimentator vor enorme Herausforderungen. Zum einem ist der Umgang mit den MDa großen Enzymen nicht trivial und zum anderen muss die Mutation der AT rational und gezielt erfolgen, damit in naher Zukunft zuverlässige Ergebnisse ermöglicht werden. Da jede Mutante einzeln mit einem Substrat getestet werden muss, eignet sich diese Methode nicht für ein Hochdurchsatz-Screening, sondern erfordert ein detailliertes Verständnis über Aufbau und Funktion der einzelnen Domänen innerhalb einer PKS.

4.5.2 *trans*-AT-Ansatz

Einige bakterielle Typ-I-PKS verwenden ein Modul mehrmals,^[124, 125] oder überspringen Module vollständig.^[126-128] Das hat zur Folge, dass in einigen Fällen die Struktur des entstehenden Metaboliten nicht mit der Struktur des Moduls übereinstimmt.^[8, 15] Dies tritt vor allem in der Klasse der *trans*-AT-PKS auf, in denen AT-Domänen fehlen.^[129-131] Hierbei werden die PKS durch freistehende, sprich transagierende, Acyltransferasen beladen. Dieses Prinzip der *trans*-AT-PKS ermöglicht einen anderen Weg strukturelle Vielfalt in die

Ergebnisse und Diskussion

Polyketidbiosynthese zu bringen. Durch den Einbau einer solchen freistehenden Acyltransferase in ein *cis*-AT-PKS-System, bei der eine der vorhandenen *cis*-AT inaktiviert wurde, bietet wohlmöglich einen einfacheren Zugang zu einer hohen Polyketiddiversität. Für die Änderung der Substratspezifität muss nur die verhältnismäßig kleine *trans*-AT mutiert werden und nicht die gesamte MDa große PKS (Schema 30).



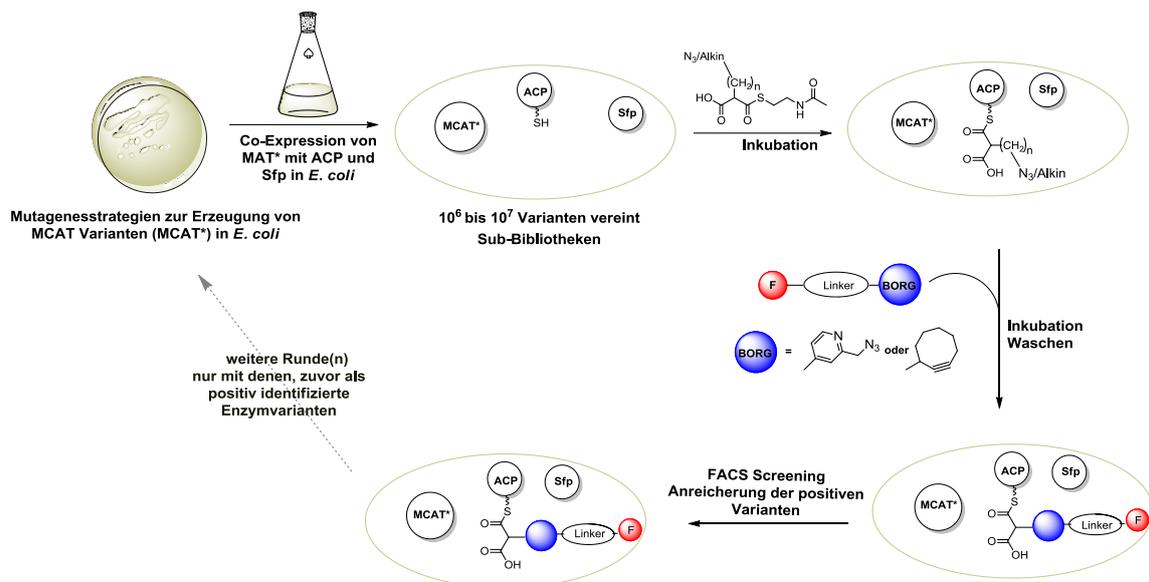
Schema 30: Schematischer Überblick der modifizierten Biosynthese zur Synthese von 2-Erythromycinderivaten. Die AT₆_{DEBS}-Domäne aus DEBS3 wurde durch zielgerichtete Mutagenese inaktiviert. Eine heterolog exprimierte und mutierte *trans*-AT* (grün umrandet) überträgt die nicht-native Verlängerungseinheit auf die KS₆_{DEBS} der PKS.

Diese Methode ist experimentell einfacher handhabbar, da die *trans*-AT wesentlich kleiner ist (~35 kDa). Zudem ermöglicht dieser Ansatz potenziell ein Hochdurchsatzscreening, da eine Arbeit in *E. coli* möglich ist. Somit kann eine riesige Enzymvariantenbibliothek generiert werden, da in erster Linie nicht die PKS selbst mutiert werden muss, sondern in einem separaten Verfahren die *trans*-AT mutiert wird.

4.6 Analyseplattform für die gerichtete Evolution einer *trans*-AT

Als Startpunkt der Arbeiten zur *trans*-agierenden AT wurde eine thermostabile *Malonyl-CoA Acyl Carrier Protein Transacylase* (MCAT) aus *Thermobifida fusca* gewählt. Eine MCAT ist ein Enzym aus der bakteriellen Fettsäurebiosynthese und spielt eine mit *cis*-agierenden AT-Domänen vergleichbare Rolle. Allerdings sind alle bekannten Mitglieder der Enzymfamilie strikt MMCoA spezifisch. Die MCAT aus *T. fusca* wurde von Dr. U. Sundermann in ihrer Dissertation über eine BLAST-Suche entdeckt.^[76] Das Ziel war es, dieses Enzym mit geeigneten Methoden zu mutieren und im Rahmen einer gerichteten Evolution seine

Substratspezifität zu verschieben. Ein limitierender Faktor in einer gerichteten Evolution ist immer die Identifikation verbesserter Enzymvarianten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die chemische Grundlage für ein Hochdurchsatzscreening mit *fluorescence activated cellsortingscreening* (FACS) auf eine veränderte Substratspezifität gelegt. Das Screening sollte in *E. coli* erfolgen, mit dem Ziel, einen *E. coli* Klon mit einer erfolgreichen Variante des Enzyms selektiv für die Erkennung in FACS aufzuklären. Die Makierung muss *in vivo* erfolgen ohne die Vitalität der betreffenden Zellen einzuschränken. Es muss also eine bioorthogonale Funktionalisierung erfolgen. Idealerweise sollte sich mit dieser Methode herausfinden lassen, ob ein ACP als Akzeptor des Malonats mit dem synthetischen Molekül versehen wurde. Die MCAT in Richtung der Akzeptanz nicht-natürlicher Substrate zu verschieben, war Teil der Dissertation von Dr. U. Sundermann.^[76] Die von ihrer damaligen Master Studentin K. Koopmans erzeugten Bibliotheken sollten mittels FACS analysiert werden (Schema 31).



Schema 31: Schematischer Versuchsaufbau zur gerichteten Evolution der *Malonyl-CoA Acyl Carrier Protein Transacylase* (MCAT) aus *T. fusca*. Zur Makierung sollte die ringspannungsinduzierte Kupferfreie [3+2]-dipolare Cycloaddition, bzw. eine Variante mit sehr geringer Cu-Konzentration eingesetzt werden. Abkürzungen: Fluorophor (F), Bioorthogonale reaktive Gruppe (BORG), Phosphopantetheinyltransferase (Sfp).

Durch verschiedene Mutagenesestrategien sollten die MCAT-Varianten in Bibliotheken unterteilt und mit Sfp, einer PPTase zur Aktivierung der MCAT und ACP6 aus DEBS in *E. coli* coexprimiert werden.^[76] Die so erzeugten Bibliotheken sollten durch Inkubation mit Alkin- oder Azidmodifizierten Malonsäurederivat gescreent werden, um die Varianten zu finden, die in der Lage sind diese nicht-natürlichen Substrate einzubauen. Nach Waschschritten sollte eine Inkubation mit einem Reporter-molekül erfolgen. Durch eine 1,3-

Ergebnisse und Diskussion

dipolare Cycloaddition zwischen dem Reportermolekül und dem auf das ACP übertragenen Malonat innerhalb der Zellen, kann mittels FACS-Screening eine Anreicherung der positiven Enzymvarianten, die das alkin- oder azidmodifizierte-Malonsäurederivat akzeptiert haben, erfolgen. Weitere Mutagenese- und Screeningrunden sollten erfolgen um so die Substratspezifität weiter für das nicht-natürliche Malonat zu erhöhen. Damit sollten diese Experimente den Start für eine gerichtete Evolution einer MCAT^[132-134] bilden, um anschließend den Einbau von nicht-natürlichen Verlängerungseinheiten in die Polyketidbiosynthese zu ermöglichen.

4.6.1 Aufbau der Malonsäurederivate und Reportermoleküle

Die Malonsäurederivate gegen die MCAT-Mutantenbibliothek gescreent werden sollte, sollen entweder Azid- oder Alkinmodifikationen tragen (Abbildung 17).

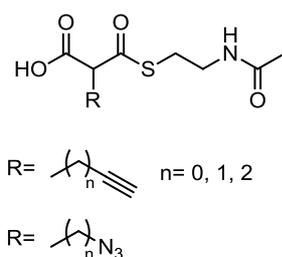
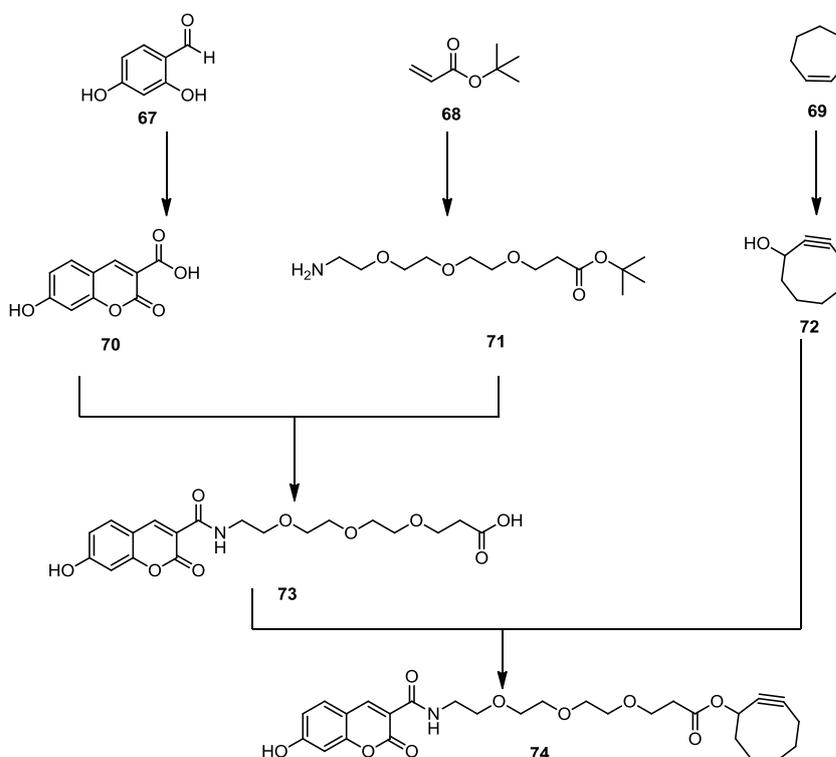


Abbildung 17: Angestrebte Malonsäurederivate für das *trans*-AT-Projekt.

Auf die Synthese der Malonsäurederivate wird ausführlich in Kapitel 4.7.2 eingegangen. Das Hauptaugenmerk der Synthese eines geeigneten Reportermoleküls lag zunächst auf der Kompatibilität zu Azido-Malonsäuren. Hierbei sollte die 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen Reportermolekül und Azidomalonat mittels ringspannungsinduzierter Cycloaddition ablaufen.^[135-138] Der Vorteil dieser Variante ist, dass für die 1,3-dipolare Cycloaddition auf das zelltoxische Kupfer(I), welches häufig schon in geringen Konzentrationen giftig ist^[139], verzichtet werden kann, während bei einem Alkinmalonat und einem Azido-Reportermolekül die Reaktion Kupfer(I)-katalysiert ablaufen muss.^[140, 141] C. Uttamapinant *et al.*^[142] berichteten über ein Azido-Reportermolekül, das es erlaubt Kupfer(I)-Salze nur in μM -Mengen in lebenden Zellen einzusetzen. Dadurch sollte ein möglichst flexibles Reportermolekül synthetisiert werden. Die angestrebten Reportermoleküle für Azidomalonate und Alkinmalonate sollten ein zellpermeables Fluorophor besitzen. Dazu wurde sich für das Cumarinmotiv entschieden, von denen berichtet wird, dass dieser Farbstoff zellpermeabel sei.^[143-145]

4.6.2 Syntheseplanung des Reportermoleküls für Azidomalonate

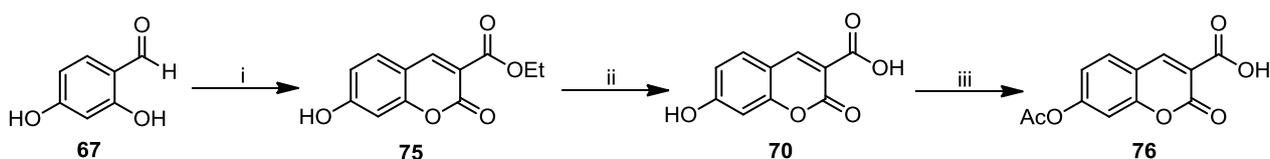
Die Synthese des Reportermoleküls **74** sollte dabei folgendermaßen stattfinden (Schema 32). Das Cumarin **70**, sollte ausgehend von 2,4-Dihydroxybenzaldehyd (**67**) synthetisiert werden und der *tert.*-Butyllinker **71** ausgehend von *tert.*-Butylacrylat (**68**). Nach anschließender Amidkupplung sollte der *tert.*-Butylester mittels Trifluoressigsäure (TFA) gespalten werden, um so Zugang zur Verbindung **73** zu erhalten. Verbindung **73** sollte im Anschluss mit dem Cyclooctin **72** verestert werden, um so Verbindung **74** zu erhalten. Das Cyclooctin **72** sollte ausgehend von Cyclohepten (**69**) nach einer Methode von Neef *et al.* und Plass *et al.* synthetisiert werden.^[146, 147]



Schema 32: Syntheseplanung für das Reportermolekül **74** ausgehend von 2,4-Dihydroxybenzaldehyd (**67**), *tert.*-Butylacrylat (**68**) und Cyclohepten (**69**).

4.6.3 Synthese von 7-Hydroxycumarinsäure (70) und 7-Acetoxy-cumarinsäure (76)

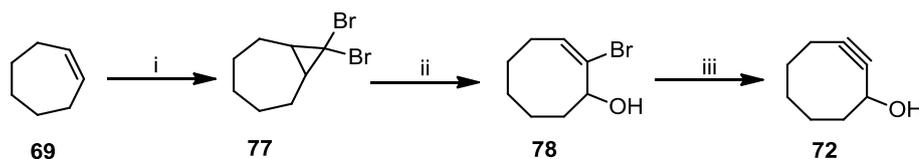
7-Hydroxycumarinsäure (**70**) wurde ausgehend von 2,4-Dihydroxybenzaldehyd (**67**) in zwei Stufen mit einer Gesamtausbeute von 55% erhalten (Schema 33). Zusätzlich wurde noch das 7-Acetoxy-cumarin (**76**) synthetisiert. Dies sollte eine Alternative zur Verbindung **70** darstellen, da bekannt ist, dass Carbonsäuren an elektronenreichen Aromaten relativ reaktionsträge sind. Um dieses eventuell auftretende Problem zu umgehen, wurde nach E. Koller und O. S. Wolfbeis^[148] ein elektronenziehender Substituent angebracht.



Schema 33: Syntheschema der Verbindungen **70** und **76**. i) 1,0 eq. Diethylmalonat, 1,1 eq. Piperidin, EtOH, 60°C, 18h, 82%; ii) 3,0 eq. LiOH·H₂O, THF/H₂O 8:2, RT, 18h, 67%; iii) 20,0 eq. Ac₂O, Dioxan, 70°C, 4h, 70%.

4.6.4 Synthese des Cyclooctin (72)

Die Synthese des Cyclooctin **72** verlief nach Neef *et al.* und Plass *et al.*^[146, 147] in drei Stufen mit einer Ausbeute von 48% (Schema 34). Der Schlüsselschritt dieser Reaktion ist die Ag(I) vermittelte Ringerweiterung aus Dibromo-Carbenaddukten des Cyclohepten **77**, um mittelgroße Ringsysteme zu generieren.^[149-153]

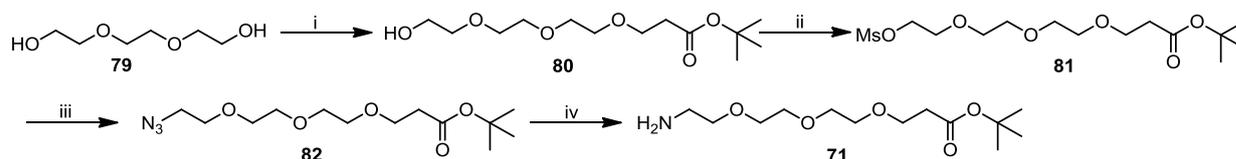


Schema 34: Synthese der Verbindung **72** nach Neef *et al.* und Plass *et al.*^[146, 147] i) 3,0 eq. CHBr₃, 3,0 eq. *t*BuOK, *n*-Pentan, Ar, RT, 18h, 97%; ii) 2,0 eq. AgClO₄·H₂O, Aceton/H₂O 5% v/v, RT, 1h, Ar, 54%; iii) 10,0 eq. DBU, DMSO, 60°C, 18h, 91%.

Durch anschließende Eliminierung mit DBU erhält man Verbindung **72** in Ausbeuten von 91%. Das Cyclooctin ist nur in verdünnten Lösungen stabil. Durch Aufkonzentrieren ist es nur wenige Minuten bei Raumtemperatur stabil, bevor es beginnt zu polymerisieren. Wird es hingegen direkt nach der Aufreinigung in Chloroform überführt (2 ml/100 mg), ist es bei -20°C ohne weiteres lagerfähig.

4.6.5 Synthese des Polyethylenlinker (71)

Der Carboxylaminlinker **71** konnte ausgehend von Triethylenglykol **79** über vier Stufen mit einer Gesamtausbeute von 20% synthetisiert werden (Schema 35). Die Michael-Addition von *tert.*-Butylacrylat mit Triethylenglycol lieferte Verbindung **80** in Ausbeuten von 34%. Die anschließende Mesitylierung lieferte Verbindung **81** in Ausbeuten von 89%.

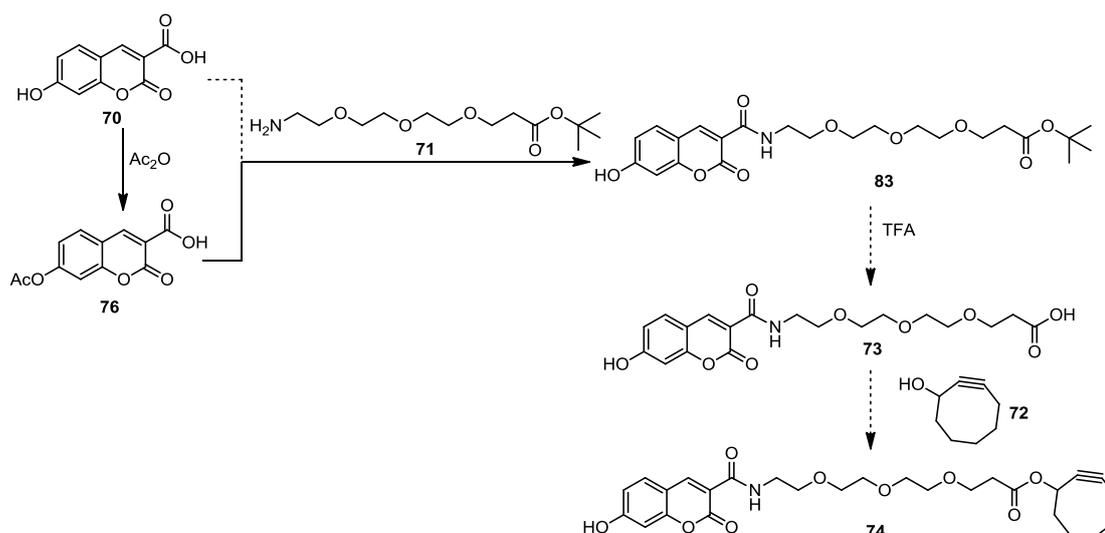


Schema 35: Synthese der Verbindung **71**. i) 1.0 eq. *tert.*-Butylacrylat, 0.03 eq. Natrium, THF, RT, 18 h, Ar, 34%; ii) 2.5 eq. NEt₃, 1.5 eq. MsCl, DCM, RT, 18h, Ar, 89%; iii) 2.0 eq. NaN₃, DMF, 70°C, 18 h, 73%; iv) 1.5 eq. PPh₃, Dioxan/H₂O 9:1, 18h, RT, 92%.

Die Substitution mit Natriumazid lieferte Verbindung **82** mit Ausbeuten von 73%. Durch die Reduktion des Azides mit Triphenylphosphin erhält man den gewünschten Linker **71** in Ausbeuten von 92% ausgehend von Verbindung **82**.

4.6.6 Syntheseveruche zur Darstellung des Reportermoleküls (74)

Die Synthese des Reportermoleküls **74** sollte ursprünglich wie in Schema 36 gezeigt erfolgen. Das 7-Hydroxycumarin (**70**) bzw. das 7-Acetoxy-cumarin (**76**) sollten in Verbindung **81** überführt werden. Durch anschließende TFA-Entschützung sollte **73** mit Verbindung **72** umgesetzt werden um das Reportermolekül **74** zu erhalten.



Schema 36: Syntheschema zur Darstellung des Reportermoleküls (**74**).

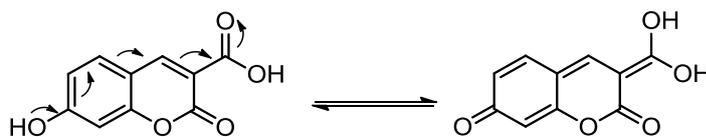
Ergebnisse und Diskussion

Jedoch erwies sich die vermeintlich einfache Kupplung von 7-Hydroxycumarin (**70**) mit Verbindung **71** als problematisch. In der Literatur sind Kupplungsbedingungen zur Bildung von 7-Hydroxycumarinestern und Amiden beschrieben, jedoch führte keine dieser Reaktionsbedingungen zum Erfolg.^[143, 145, 154] Die für die Amidbildung von 7-Hydroxycumarin (**70**) und dem Aminlinker **71** verwendeten Kupplungsreagenzien sind in Tabelle 5 gelistet.

Tabelle 5: Kupplungsbedingungen für die Reaktion von Verbindung **70** mit Verbindung **71**.

| Eintrag | Kupplungsreagenz | Lösemittel | Bemerkung |
|---------|-----------------------------------------|------------|-------------|
| 1 | 1,3 eq. DCC/ 0,3 eq. DMAP | DMF | kein Umsatz |
| 2 | 1,3 eq. DIC/ 2,0 eq. NHS/ 0,3 eq. DMAP | DMF | kein Umsatz |
| 3 | 1,3 eq. DIC/ 2,0 eq. HOBt/ 0,3 eq. DMAP | DMF | kein Umsatz |
| 4 | 1,3 eq. HBTU | DMF | kein Umsatz |
| 5 | 1,3 eq. HATU | DMF | kein Umsatz |

Eine mögliche Ursache für die Reaktionsträgheit könnte der elektronenschiebende Effekt der Hydroxygruppe sein, die in Konjugation mit der Carbonylposition steht (Schema 37).



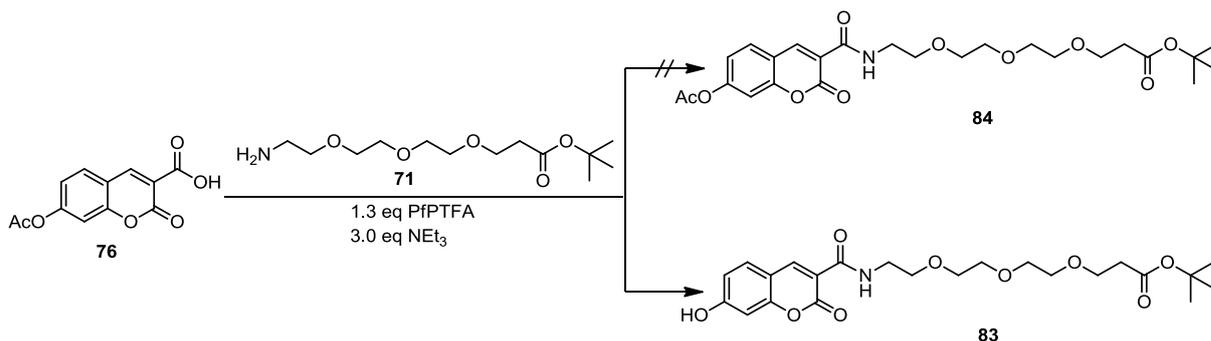
Schema 37: Tautomer des 7-Hydroxycumarin

Diesen Effekt machten sich R. Weinstain *et al.* zunutze, um Cumarinreportermoleküle zu synthetisieren.^[155] Aus diesem Grund wurden weitere Kupplungsversuche mit 7-Acetylcumarin durchgeführt. Der elektronenziehende Effekt der Acetoxy-Gruppe sollte die Konjugation mit der Carbonylgruppe vermindern, sodass diese elektrophiler wird. Die Kupplungsversuche von 7-Acetylcumarin (**76**) mit dem Aminlinker **71** sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Kupplungsbedingungen für die Reaktion von Verbindung **76** mit Verbindung **71**

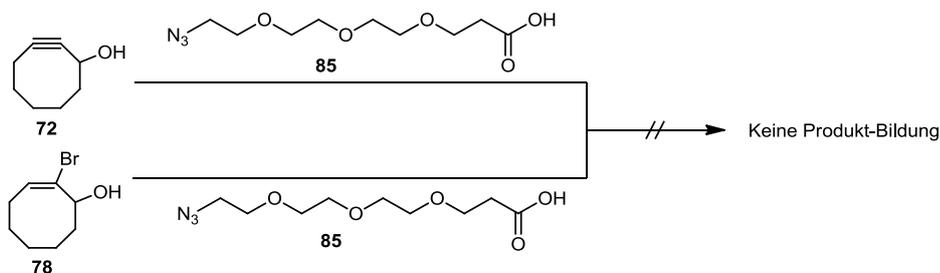
| Eintrag | Kupplungsreagenz | Lösemittel | Bemerkung |
|---------|------------------------------------------|------------|--------------|
| 1 | 1,3 eq. DCC/ 0,3 eq. DMAP | DMF | kein Umsatz |
| 2 | 1,3 eq. DIC/ 2,0 eq. NHS/ 0,3 eq. DMAP | DMF | kein Umsatz |
| 3 | 1,3 eq. DIC/ 2,0 eq. HOBt/ 0,3 eq. DMAP | DMF | kein Umsatz |
| 4 | 1,3 eq. HBTU | DMF | kein Umsatz |
| 5 | 1,3 eq. HATU | DMF | kein Umsatz |
| 6 | 1,3 eq. SOCl ₂ | DMF | kein Umsatz |
| 7 | 1,3 eq. PyBOP | DMF | kein Umsatz |
| 8 | 1,3 eq. PyBrOP | DMF | kein Umsatz |
| 9 | 1,3 eq. PfPTFA, 3,0 eq. NEt ₃ | DMF | 10% Ausbeute |

Einzig mit Pentafluorphenoltrifluoressigsäure (PfPTFA) fand ein Umsatz statt, mit einer Ausbeute von 10%. Interessanterweise erhielt man nicht wie zu erwarten den 7-Acetoxylinker **84**, sondern direkt Verbindung **83** (Schema 38).



Schema 38: Synthese von Verbindung **83**. Die Reaktion von Verbindung **76** mit Verbindung **71** führte zur Bildung von Verbindung **83**.

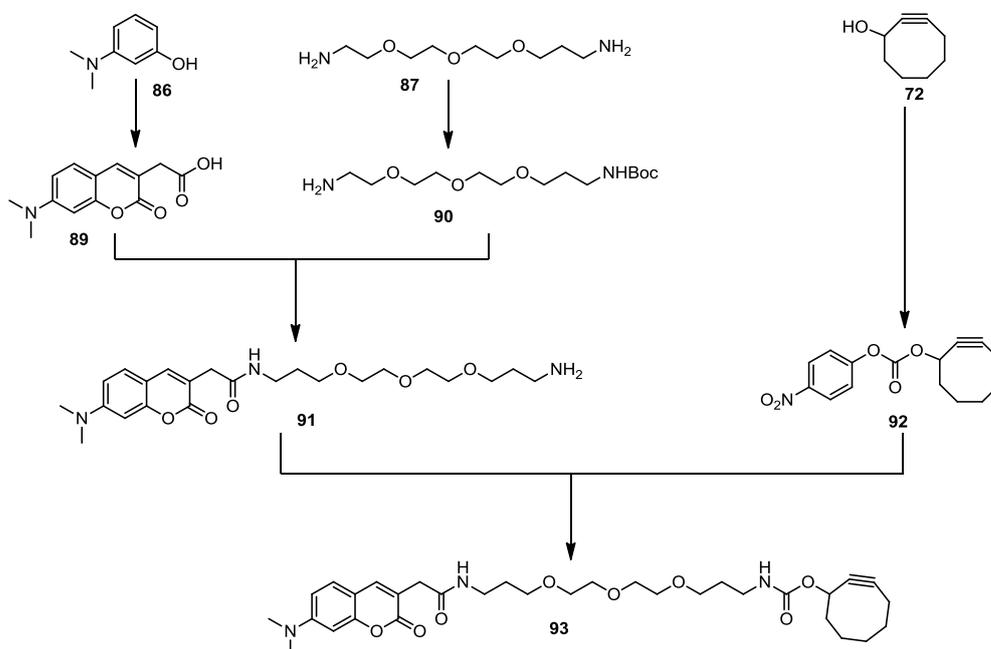
Die weiteren geplanten Syntheseschritte ausgehend von Verbindung **83**, sowie Testkupplungen der Verbindungen **72** und **78** mit **85**, schlugen fehl (Schema 39).^[156]



Schema 39: Versuche zur Kupplung der Verbindungen **72** und **78** mit **85**. SOCl₂, HATU und HBTU wurden als Kupplungsreagenzien von C. Nöcker getestet.^[156]

4.6.7 Design und Synthese eines alternativen Cyclooctin/Cumarin-Linkers

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das Design des Reportermoleküls geändert (Schema 40). Für das Fluorophor wurde ein Cumarinderivat **89** verwendet, welches zwischen dem aromatischen System und der Carbonsäure eine Methylengruppe besitzt. Durch das Ausbleiben der Konjugation mit dem Aromaten, sollte die Carbonylfunktion leichter aktivierbar sein. Dieses Cumarinderivat **89** wurde ausgehend von 3-Hydroxydimethylanilin (**86**) und Acetoaceton-diethylester nach P. Portonovo *et al.* synthetisiert.^[157] Für die Kupplung des Fluorophors mit dem Cyclooctin wurde sich für ein Diaminlinker **87** entschieden. Das Hydroxycyclooctin **72** sollte als *para*-Nitrophenolcarboxylat **92**^[146, 147] mit Verbindung **91** umgesetzt werden, um das Carbamat **93** zu bilden.

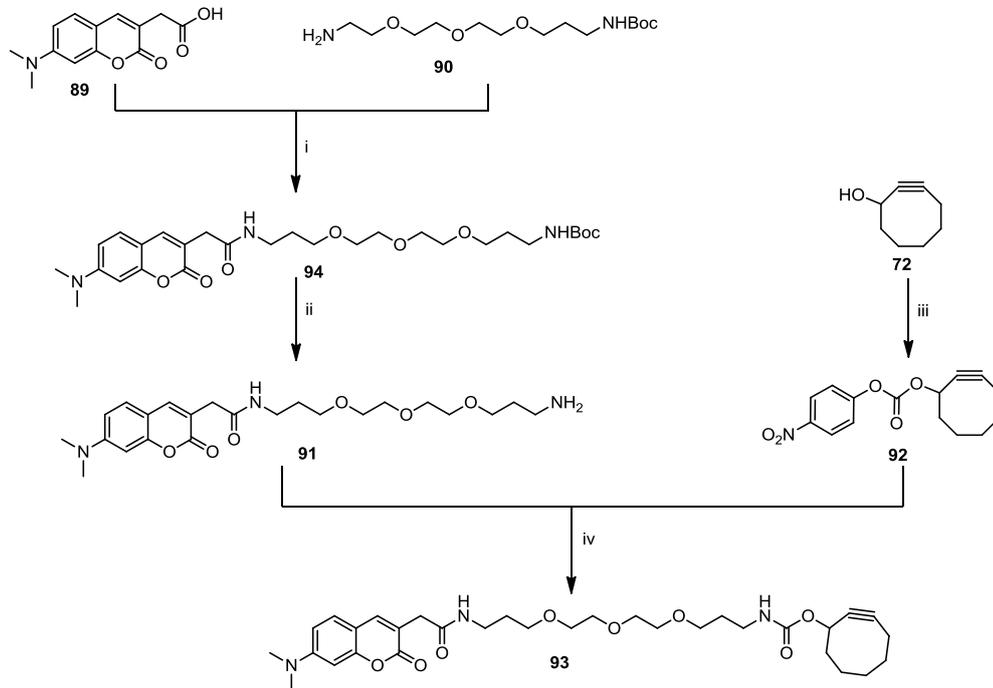


Schema 40: Planung der Synthese des Reportermoleküls **93** ausgehend von 3-Hydroxydimethylanilin (**86**), dem Diaminlinker **87** und Hydroxycyclooctin (**72**).

4.6.8 Synthese des Reportermoleküls (93)

Das Cumarin **89** wurde ausgehend von 3-Hydroxydimethylanilin nach der Methode von P. Portonovo *et al.* in zwei Stufen mit einer Gesamtausbeute von 39% erhalten.^[157] Die Amidkupplung von **89** mit **90**^[156] zu **91** verlief mit einer 68%igen Ausbeute (Schema 41). Nach der *N*-Boc-Entschützung mittels Trifluoressigsäure/Dichlormethan (1:1), konnte Verbindung **91** nach Aufarbeitung ohne säulenchromatographische Reinigung mit 99% Ausbeute erhalten werden. Die Reaktion von **91** mit **92** zum Reportermolekül **93** verlief mit einer

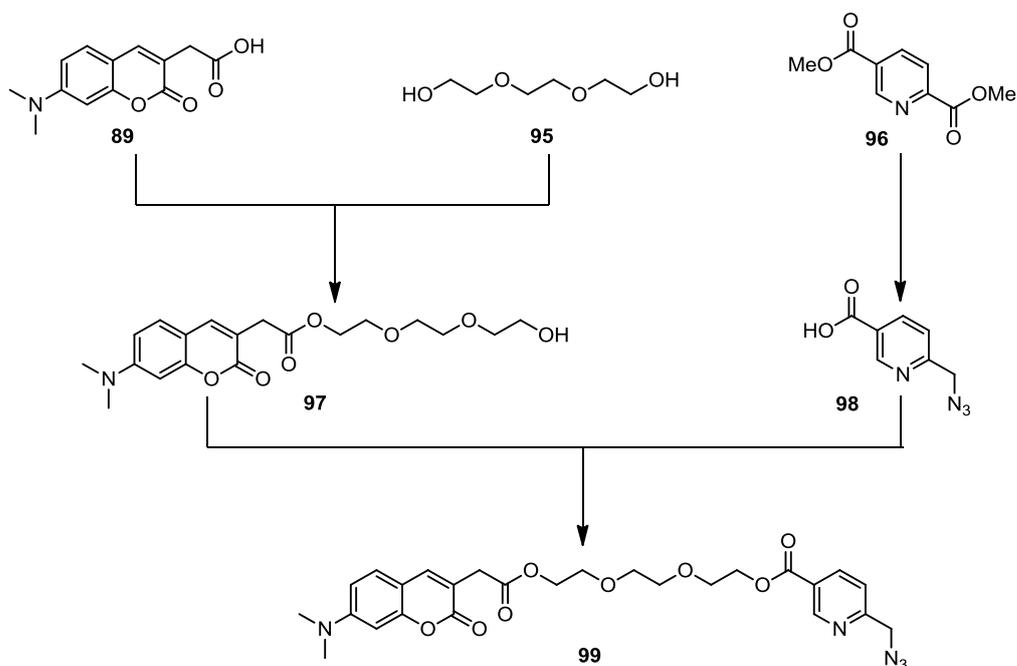
Ausbeute von 80%. Die Synthese von **92**^[146, 147] erfolgte ausgehend von 2-Hydroxycyclooctin (**72**) mit einer Ausbeute von 84% und wurde sofort mit **91** umgesetzt. Dadurch konnte Verbindung **93** in 80%iger Ausbeute ausgehend von **91** und **92** erhalten werden.



Schema 41: Synthese des Reportermoleküls **93**. i) 4.0 eq. Verbindung **90**, 2.0 eq. DIC, 1.0 eq. HOBt, DMF, 18h, RT, 68%; ii) DCM/TFA 1:1, 18h, RT, 99%; iii) 5.0 eq. pNP-Chloroformiat, 1.2 eq. NEt₃, THF, Ar, 18h, 84%; iv) 1.3 eq. Verbindung **92**, Pyridin, Ar, 18h, RT, 80%.

4.6.9 Syntheseplanung des Reportermoleküls für Alkinmalonate

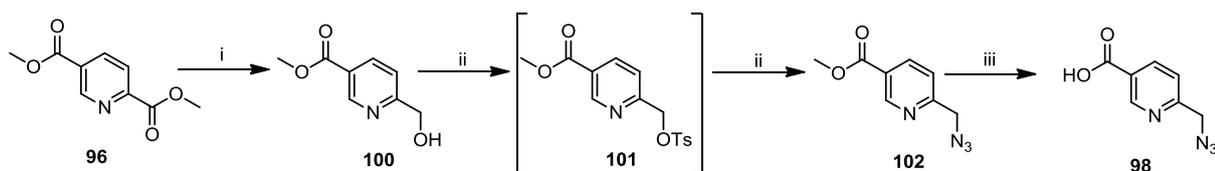
Die Synthese des Reportermoleküls **99** sollte dabei wie folgt durchgeführt werden (Schema 42). Anstelle des zuerst vorgesehenen 7-Hydroxycumarins (**70**) sollte ebenfalls 7-Diaminomethylcumarin (**89**) verwendet werden.^[157] Nach anschließender Veresterung von Triethylglycol (**95**) mit **89**, sollte der Cumarinlinker **97** mit dem Azidopyridin **98** zum Reportermolekül **99** umgesetzt werden. Das Azidopyridin **98** sollte ausgehend von der kommerziell erhältlichen Verbindung **96** nach der Methode von C. Uttamapinat *et al.*^[142] synthetisiert werden.



Schema 42: Syntheseansatz des Reportermoleküls **99** ausgehend von 7-Dimethylaminocumarin (**89**), Triethylenglykol (**95**) und Dimethyl-2,5-pyridincarboxylat (**96**).

4.6.10 Synthese des Azidomethylpyridin (**98**)

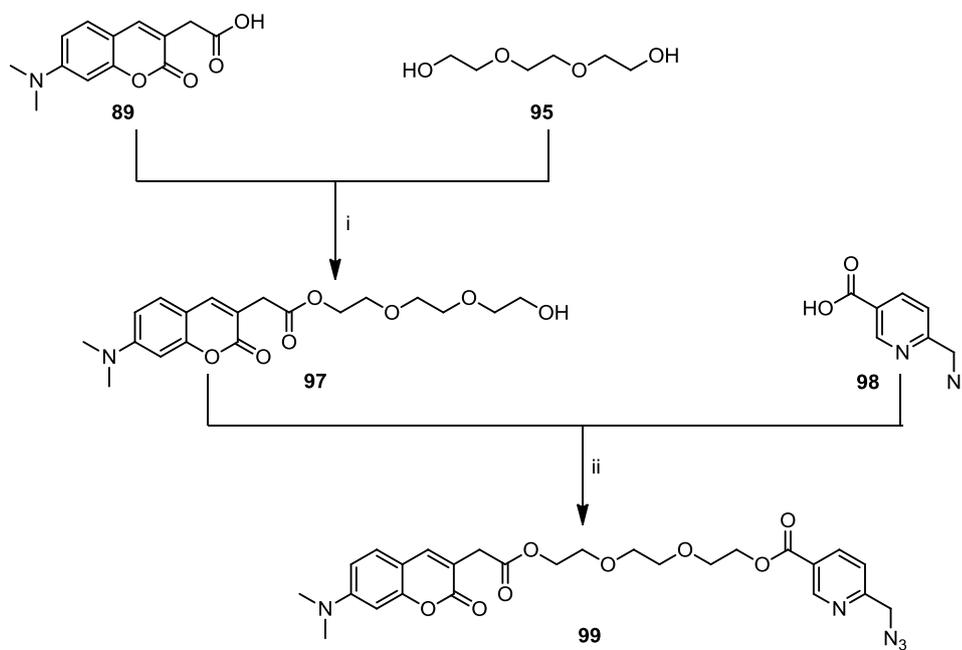
Die Synthese beginnt mit der regioselektiven Reduktion des Pyridindicarbonsäureesters **96** mittels Natriumborhydrid in Gegenwart von Calciumchlorid mit Ausbeuten von 70% für Ansätze in der Größenordnung von 10 g (Schema 43). Die Überführung des Alkohols **100** in das Azid **102** erwies sich als problematisch. So wurde festgestellt, dass das dazu verwendete Tosylat **101** zur Zersetzung neigt und eine Isolierung keinen präparativen Nutzen besitzt. Durch den Umsatz des Tosylates direkt nach Aufarbeitung mit Natriumazid, konnte Verbindung **102** ausgehend von Verbindung **100** in 62% Ausbeute erhalten werden. Nach anschließender Verseifung mit Lithiumhydroxid konnte Verbindung **98** mit einer Ausbeute von 74% und einer Gesamtausbeute von 32% über drei Stufen erhalten werden.



Schema 43: Synthese von Azidopyridin **98** nach C. Uttamapinat *et al.*^[142]: i.) 2.5 eq. NaBH₄, 4.0 eq. CaCl₂, EtOH, 0°C, 3h, 70%; ii) 1) 1.3 eq. pTsCl, 2.0 eq. NEt₃, Ar, DCM, RT, 3h, 2) 10.0 eq. NaN₃, Aceton, RT, 24h, 62%; iii) 1.0 eq. LiOH·H₂O, MeOH/H₂O 1:1, RT, 18h, 74%.

4.6.11 Synthese des Reportermoleküls (99)

Die Veresterung von **89**^[157] und **95** zu **97** verlief mit einer Ausbeute von 60% (Schema 44). Die weitere Veresterung von **97** mit **98** ergab das gewünschte Reportermolekül **99** mit einer Ausbeute von 15%.



Schema 44: Syntheschema des Reportermoleküls (**99**) ausgehend von **89**. i) 1.3 eq. DIC, 4.0 eq. Triethylglykol, 0.5 eq. HOBt, Pyridin, RT, Ar, 18h, 60%; ii) 1.2 eq. **98**, 1.2 eq. DIC, Pyridin, RT, 18h, 15%.

4.6.12 Diskussion

Nach Optimierung der Syntheserouten konnten nun folgende Reportermoleküle im präparativen Maßstab synthetisiert werden (Abbildung 18).

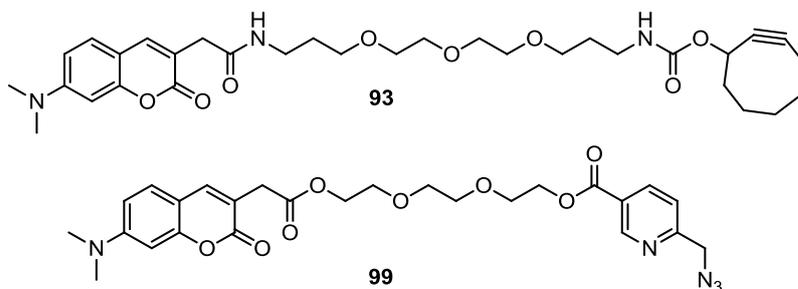


Abbildung 18: Struktur der Reportermoleküle **93** und **99**.

Ergebnisse und Diskussion

Die Synthese von **93** erwies sich als aufwendig. Zudem ist die Verbindung bedingt durch das Cyclooctinmotiv in konzentrierter Form nicht lagerstabil. Verdünnte Lösungen können für ein paar Wochen bei -20°C gelagert werden. Es zeigte sich schon im frühen Entwicklungsstadium des Reportermoleküls eine begrenzte Einsatzmöglichkeit, basierend auf den erheblichen Problemen bei der Synthese der azidhaltigen Malonsäurederivate Azidomethyl-MSNAC oder Azidoethyl-MSNAC, welche in Kap.4.7.2.6 im Detail beschrieben werden. Aus diesem Grund lag der Fokus auf dem Reportermolekül **99**, das verwendet werden sollte, um die Substratspezifität der MCAT-Mutanten gegenüber Propargyl-MSNAC zu überprüfen. Jedoch sorgte der rasante Fortschritt im *cis*-AT-Projekt (Kap.4.7.3) dafür, dass das *trans*-AT-Projekt und somit auch die Notwendigkeit der Reportermoleküle, zunächst eingestellt wurden.

4.7 Chemomikrobieller Einbau nicht-nativer Malonate durch „enzymgeleitete Mutasyntese“ (*cis*-AT-Projekt)

Es ist ein fundamentales Verständnis über Aufbau und Substratspezifität der AT-Domänen erforderlich, um diese durch gerichtete Punktmutationen so zu modifizieren, dass sie ein nicht-natürliches Malonat akzeptieren. Den enzymologischen und mikrobiologischen Aspekten dieser Problematik widmete sich Dr. U. Sundermann in ihrer Dissertation.^[76] *Cis*-agierende Acyltransferasen sind innerhalb des molekularen Fließbandes einer PKS integriert. Die bis *dato* bestuntersuchtete PKS ist die 6-Desoxyerythronolid B Synthase (DEBS). Bevor damit begonnen werden sollte, nicht-natürliche Malonate an modifizierte AT-Varianten zu testen, sollten Vorexperimente zeigen, wie hoch die benötigten Konzentrationen an SNAC-aktivierten Malonsäurederivaten tatsächlich sein müssen, um einen Einbau zu gewährleisten.

4.7.1 Quantifizierung der Einbauraten von *N*-Acetylcysteamin aktivierten Methylmalonat in der Biosynthese von Polyketiden

In dem folgenden Kapitel werden Versuche zur Quantifizierung von Einbauraten aktivierter Methylmalonate beschrieben. Diese Ergebnisse wurden zusammen mit Dr. U. Sundermann erarbeitet und sind Teil der Veröffentlichung aus Klopries *et al.*^[158]

AT-Domänen akzeptieren nur thioesteraktivierte Malonsäuren. Jedoch stellen die natürlichen Coenzym A (CoA) -aktivierten Malonsäuren den Experimentator vor einige Herausforderungen. Zum einem ist CoA-SH sehr teuer in der Anschaffung bzw. aufwendig in der Synthese, sodass ein präparativer Nutzen kaum möglich ist. Zum anderen erfolgt die Zuführung der aktivierten Malonsäurederivate exogen. CoA-aktivierte Verbindungen sind jedoch nicht zellpermeabel und können somit auch nicht von der Zelle aufgenommen werden, wenn diese dem Kulturmedium zugesetzt wurden. Eine effektive Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, ist die Verwendung von *N*-Acetylcysteamin (SNAC) (Abbildung 19), welches seit 1975 als CoA-Mimetikum verwendet wird.^[159-170]

Ergebnisse und Diskussion

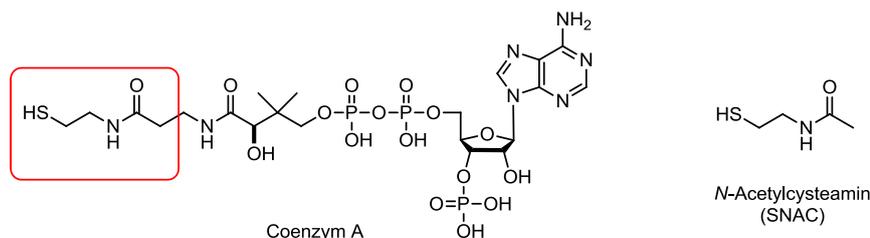


Abbildung 19: Vergleich der Strukturen von CoASH (links) und *N*-Acetylcysteamin (rechts).

Durch SNAC-Aktivierung können nicht-natürliche Synthesebausteine für den Mikroorganismus zugänglich gemacht werden. Jedoch ist diese Art der Malonataktivierung bis zum heutigen Stand nicht ausreichend charakterisiert. Fragen bezüglich der Bioverfügbarkeit und der relativen Akzeptanz dieser SNAC-aktivierten Substrate gegenüber nativen CoA-aktivierten Substraten müssen geklärt werden. Die daraus resultierenden Ergebnisse sollen verwendet werden um möglichst effektiv weitergehende Experimente mit nicht-natürlichen Malonsäurederivaten planen und durchführen zu können.

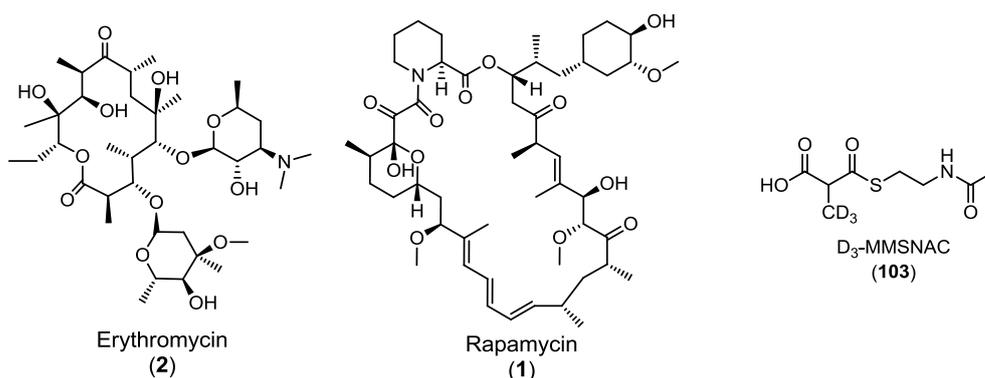


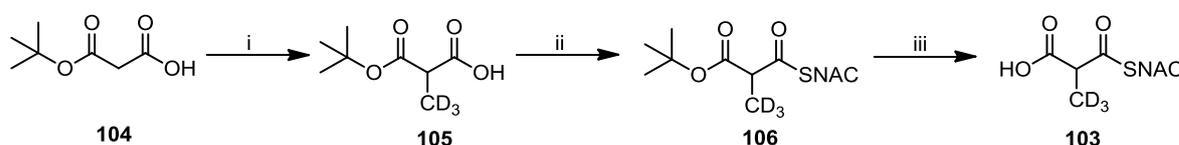
Abbildung 20: Strukturen von Erythromycin (2) und Rapamycin (1) und D₃-MMSNAC (103).

Als Modellsysteme wurden die gut untersuchten Biosynthesewege von Erythromycin^[171-173] und Rapamycin^[71] verwendet (Abbildung 20). Diese Polyketide werden von Bakterien zweier unterschiedlicher Gattungen produziert, die deutliche Unterschiede in ihrer PKS aufweisen, jedoch derselben Biosyntheselogik folgen. Dafür sollten den Kulturmedien des Erythromycinproduzenten *Saccharopolyspora erythraea* NRRL-B-24071 und des Rapamycinproduzenten *Streptomyces hygroscopicus* NRRL-5491 D₃-markierte Methylmalonsäure-SNAC-Ester (D₃-MMSNAC, **103**) (Abbildung 20) zugesetzt werden. Das D₃-MMSNAC tritt mit dem natürlichen Methylmalonyl-CoA (MMCoA) um den Einbau in die jeweiligen Polyketide in Konkurrenz. Mittels LC/ESI-MS Analyse der einzelnen Fermentationsextrakte wurden die Einbauraten anhand der Verschiebung in dem jeweiligen Isotopenverhältnis quantifiziert. Die Unterschiede in den Masse-zu-Ladungsverhältnis der

Signale der Produkte bildeten die Grundlage der Auswertungen. Alle Datenpunkte wurden dreifach bestimmt, unter zusätzlicher Berücksichtigung, dass Verbindung D₃-MMSNAC racemisch vorliegt.

4.7.1.1 Synthese von D₃-MMSNAC (103)

Um den Einbau von SNAC-aktivierten Malonaten zu gewährleisten, werden millimolare Konzentrationen in den Fermentationsmedien benötigt. Dies setzt eine zuverlässige und präparativ nutzbare Syntheseroute der SNAC-Ester voraus, die sehr flexibel ist, um eine Vielzahl an unterschiedlich substituierten Malonaten zu ermöglichen (Schema 45).



Schema 45: Synthese von D₃-MMSNAC. i) 2.1 eq. LDA, 1.0 eq. CD₃I, abs. THF, -78°C→RT, Ar, 18 h, 37%; ii) 1.3 eq. CDI, 0.3 eq. DMAP, 1.5 eq. SNAC, abs. THF, 0°C→RT, Ar, 18 h, 82%; iii) 2.5 eq. TiCl₄, DCM, Ar, 0°C→RT, 6 h, quant. (DC und ¹H-NMR).

Die Syntheseroute sah vor, einen kommerziell erhältlichen *mono*-Malonsäureester zu alkylieren, anschließend zu verestern und selektiv den Ester in Gegenwart des Thioesters zu spalten. Vorausgegangene Experimente zeigten^[174], dass die Malonsäure als Monoester vorliegen sollte, da bei der Alkylierung und späteren Thioveresterung Decarboxylierungen auftraten. Nach Optimierung schien *mono-tert*-Butylmalonsäure (**104**) der bestmögliche Startpunkt der Synthese (Schema 45) zu sein.^[175] Im Gegensatz zu den kommerziell erhältlichen *mono*-Methyl- bzw. *mono*-Ethylmalonsäuren, verhindert die sterisch anspruchsvolle *tert*-Butylgruppe von Verbindung **104** die Decarboxylierung während der Alkylierung und Thioesterbildung. Zudem gibt es mehrere Möglichkeiten einen *tert*-Butylester in Gegenwart eines Thioesters selektiv abzuspalten. Nach Alkylierung mit CD₃-I in Gegenwart von LDA erhielt man Verbindung **105**, bestenfalls in Ausbeuten von 37%, zu dem zusätzlich gebildeten dialkylierten Produkt. Nach einigen Tests zur nachfolgenden Thioveresterung mit verschiedenen Kupplungsreagenzien (SOCl₂, Oxanylchloride/DMF, DCC/DMAP, DIC/HOBt, DIC/NHS, *iso*-Butylchloroformat/NMM, HATU, HBTU, CDI/DMAP), war eine Kombination aus CDI/DMAP die einzig effektive Methode. So konnten Ausbeuten von 82% erzielt werden, jedoch nur wenn die Reaktion in THF durchgeführt wurde. Dieselben Reaktionsbedingungen in DCM führten zu keinem Umsatz. Der Einsatz von SOCl₂ oder Oxanylchlorid/DMF führte zu einer direkten Decarboxylierung des

Ergebnisse und Diskussion

Startmaterials. DCC/DMAP, DIC/HOBt, DIC/NHS, *iso*-Butylchloroformat/NMM, HATU, HBTU zeigten nur geringfügigen Umsatz mit einer Ausbeute in der Größenordnung um 10-15%.

Eine in der Literatur verbreitete Methode um *tert*-Butylmalonsäurederivate zu entschützen, ist die Verwendung von Trifluoressigsäure (TFA).^[164, 176] Jedoch zeigte sich, dass D₃-MMSNAC eine temperatur-, säure- und baseempfindliche Verbindung ist, die nur im wässrigen basischen Milieu moderat stabil und lagerfähig ist. Die Verwendung von TFA selbst bei Temperaturen um -20°C führen zur Decarboxylierung. Ebenfalls konnten Vorversuche von Dr. U. Sundermann zeigen, dass sowohl der Erythromycinproduzent *S. erythraea* NRRL-B-24071 als auch der Rapamycinproduzent *S. hygrosopicus* NRRL-5491 äußerst sensibel auf geringe Mengen TFA reagieren und dies die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erschwert. Daher wurde nach alternativen Abspaltungsmethoden für *tert*-Butylester gesucht. Zunächst fiel die Wahl auf unspezifische Esterasen, wie die Lipasen CalA und CalB, von denen man weiß, dass diese auch *tert*-Butylester spalten können.^[177] Unter den getesteten Reaktionsbedingungen (KP_i-Puffer 100 mM, pH 7,5, RT) konnte keine Decarboxylierung festgestellt werden, jedoch zeigten die enzymkatalysierten Reaktionen nur geringfügigen Umsatz und eine stärkere Tendenz zur Spaltung des Thioesters. Aus diesem Grund fiel die Wahl auf Lewis-Säurevermittelte *tert*-Butylesterspaltungen, mit ZnBr₂^[178] oder TiCl₄^[179]. Die Verwendung von ZnBr₂ zeigte nicht die gewünschten Resultate, da in Gegenwart von ZnBr₂ hauptsächlich der Thioester gespalten wurde. Singhet *al.* berichteten über die Abspaltung von *tert*-Butylestern in Gegenwart von TiCl₄.^[179] Diese Methode ist äußerst zuverlässig und führt zum vollständigen Umsatz innerhalb von 6 h und das nahezu Nebenproduktfrei. Jedoch scheiterten alle Versuche, das D₃-MMSNAC zu isolieren. Sobald das D₃-MMSNAC aufkonzentriert oder säulenchromatographisch gereinigt wird, beginnt die Verbindung zu decarboxylieren. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Reaktion mit einem NaHCO₃-Puffer (pH 8,4) vermischt und das resultierende Titandioxid als Präzipitat abfiltriert. Nach Entfernung des Dichlormethans am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur, verblieb das Produkt stabil in der basisch-wässrigen Phase und stand somit für Fütterungsexperimente bereit. Separat wurde eine Reaktion mit D₂O-NaHCO₃-Puffer durchgeführt, um NMR-Analysen zu ermöglichen. Diese zeigten, dass die *tert*-Butylentschützung unter diesen Bedingungen quantitativ und nahezu frei von Nebenprodukte verliefen (Abbildung 21). Anzumerken sei auch, dass das Protonensignal an C2 (3,88 ppm) nach wiederholtem Messen zunehmend abnimmt, was einem erhöhten H/D-Austausch zugrunde liegt und damit auch zeigt, dass eine enantioselective Syntheseroute für das reine (S)-Enantiomer nicht sinnvoll erscheint.

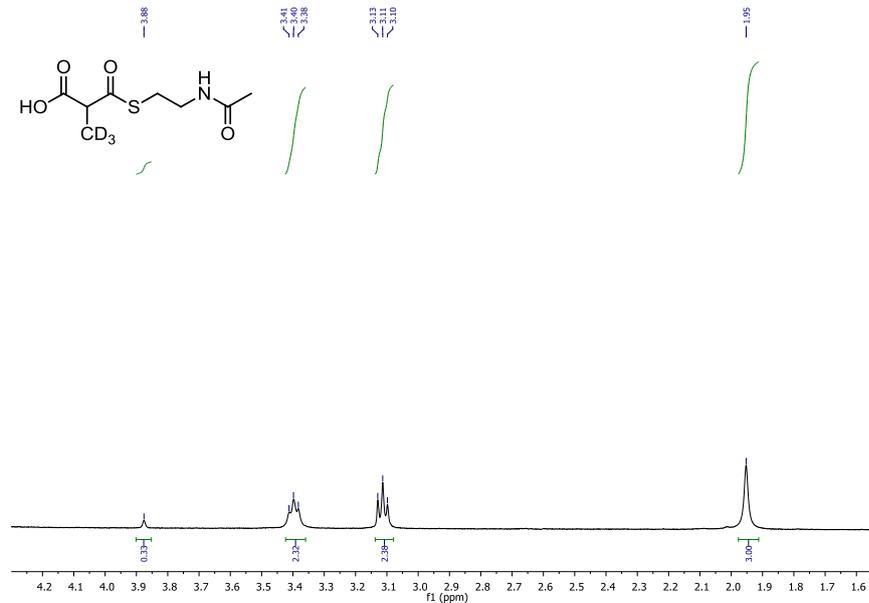


Abbildung 21: ^1H NMR-Spektrum von D_3 -MMSNAC in D_2O - NaHCO_3 -Puffer pH8,4.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Syntheseroute beginnend von *tert.*-Butylmalonat innerhalb von drei Synthesestufen zum D_3 -MMSNAC mit einer Gesamtausbeute von 30% führt. Damit konnte ausreichend D_3 -MMSNAC für die Fütterungsexperimente bereitgestellt werden. Jedoch weist die Alkylierung des *tert.*-Butylmalonats nur unzufriedenstellende Ausbeuten auf. Das Problem der Selektivität zwischen mono- und dialkyliertem Produkt ist nur schwer zu kontrollieren, sodass für die Synthese anderer Malonate im späteren Verlauf alternative Syntheserouten entwickelt werden mussten (Kapitel 4.7.2).

4.7.1.2 Fütterungsexperimente

Der Umgang mit den Erythromycin- und Rapamycinproduzenten, sowie die Fütterungsexperimente wurden von Dr. U. Sundermann durchgeführt.^[76] Für die Fütterungsexperimente wurde der Carbonatpuffer, der für die Synthese von D_3 -MMSNAC verwendet wurde, mit löslichen Medienbestandteilen versetzt und individuell für die zwei unterschiedlichen Bakterienstämme angesetzt (Kapitel 6.3). Dies soll eine zusätzliche Verdünnung des Nährmediums durch Zugabe des Substrats verhindern. Da D_3 -MMSNAC als racemische Verbindung synthetisiert wurde ist bei der Auswertung der Ergebnisse zu berücksichtigen, dass diese PKS ausschließlich (*S*)-MMSNAC akzeptieren. Dies wurde für die Biosynthese von Erythromycin gezeigt und sollte analog für homologe Systeme gelten.^[172] Dadurch beträgt die Konzentration an (*S*)- D_3 -MMSNAC die Hälfte der für die Fütterungsexperimente eingesetzten Konzentration an D_3 -MMSNAC. Um den Einbau von

Ergebnisse und Diskussion

D₃-MMSNAC in die Erythromycinbiosynthese zu analysieren, verwendete Dr. U. Sundermann für die Fermentation das Duetz-System.^[180] Dieses System ermöglichte kleine Fermentationen mit reproduzierbaren Ergebnissen in 24-well Platten.^[76] Alle Fermentationen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Im Gegensatz zum Erythromycinproduzenten, konnten für den Einbau von D₃-MMSNAC in Rapamycin nur zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden, wenn Dr. U. Sundermann die Fermentation in 50 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt hat.^[76] Ebenfalls wurden alle Fermentationen in Dreifachbestimmung durchgeführt.

4.7.1.3 Einbauraten von D₃-MMSNAC in Erythromycin

Das natürliche Isotopenmuster von Erythromycin ist m/z: 734,4685 (100,0%), 735,4724 (40,0%), 736,4758 (7,8%), 737,4767 (1,1%). Abbildung 22A zeigt deutlich, dass die detektierten Masse-zu-Ladungsverhältnisse ohne Fütterung von D₃-MMSNAC dem vorhergesagten Isotopenmuster von Erythromycin entsprechen. Durch Erhöhung der Konzentration von D₃-MMSNAC nimmt auch die Intensität des D₃-markierten Erythromycin (m/z: 737,47 [M+H]⁺) zu (Abbildung 22B-F).

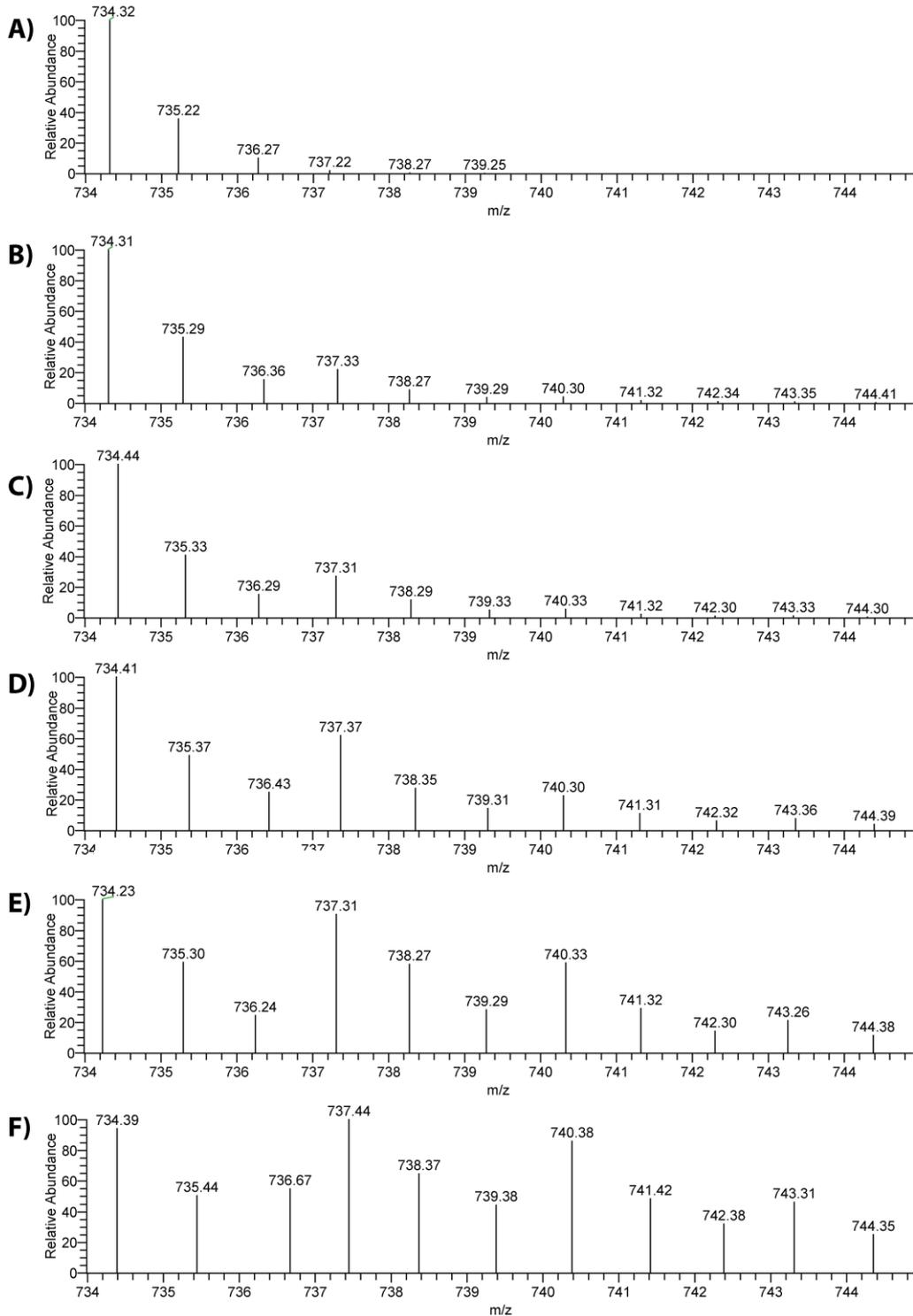


Abbildung 22: Massenspektrum des Erythromycin (m/z : 734,46 $[M+H]^+$) und CD₃-markierten Erythromycin (m/z : 737,47 $[M+H]^+$) in Abhängigkeit der Konzentration von D₃-MMSNAC. Der Einbau von D₃-MMSNAC und die Zunahme der Einbaurrate in Abhängigkeit der Fütterungskonzentration sind deutlich erkennbar. **A:** 0 mM D₃-MMSNAC, **B:** 1,25 mM D₃-MMSNAC, **C:** 2,5 mM D₃-MMSNAC, **D:** 5 mM D₃-MMSNAC, **E:** 10 mM D₃-MMSNAC und **F:** 15 mM D₃-MMSNAC. Abbildung stammt aus der Dissertation von Dr. U. Sundermann S.51.^[76]

Ergebnisse und Diskussion

Aus Abbildung 23 wird deutlich, dass durch die Zugabe von *rac*-D₃-MMSNAC bei einer Konzentration von 1,25 mM bereits einer von sechs endogenen MMCoA-Bausteinen durch das nicht-natürliche Substrat D₃-MMSNAC ersetzt wurde und damit 17% des detektierten Erythromycins eine D₃-Markierung trug. Bei einer Konzentration von 10 mM waren bereits 40% des detektierten Erythromycins isotopenmarkiert. Des Weiteren wurden bei Konzentrationen größer als 2,5 mM ein zweifacher Einbau und bei Konzentrationen größer 10 mM ein dreifacher Einbau von D₃-MMSNAC beobachtet. Bei Konzentrationen von 33 mM gab es bei ~20% des detektierten Erythromycins einen Dreifacheinbau. Es kann angenommen werden, dass der D₃-Einbau zufällig verteilt, über alle sechs Module die MMCoA akzeptieren, erfolgt.

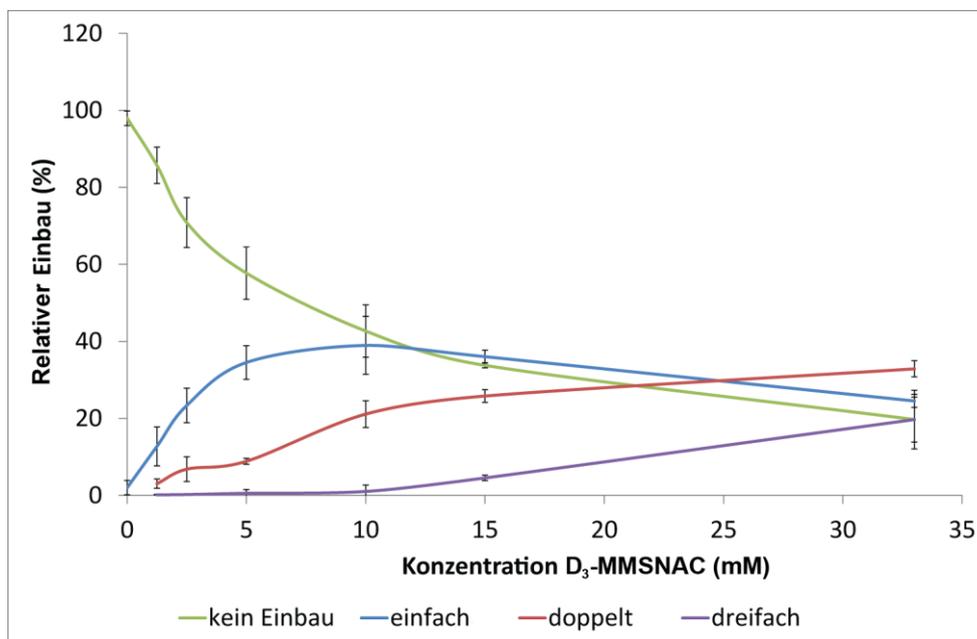


Abbildung 23: Relative Einbauraten von D₃-MMSNAC in Erythromycin. Abbildung stammt aus der Dissertation von Dr. U. Sundermann S.52.^[76]

Durch Angleichung der Messwerte an die Michaelis-Menten-Gleichung ergab sich für den halbmaximalen einfachen Einbau ein Wert von $1,06 \pm 0,15$ mM, und für den halbmaximalen doppelten Einbau ein Wert von $4,84 \pm 1,31$ mM (analog den K_M -Werten bei enzymatischen Reaktionen).

4.7.1.4 Einbauraten von D₃-MMSNAC in Rapamycin

Die Rapamycinfütterungen wurden ebenfalls bis zu einer Konzentration von 10 mM durchgeführt (Abbildung 24). Allerdings konnte bei einer Konzentration von 10 mM kein Dreifacheinbau von D₃-MMSNAC beobachtet werden. Analog zu Erythromycin wurden

die Einbauraten detektiert. Der einfacheinbau hingegen fand, ähnlich wie bei den Fütterungsstudien für die Erythromycinbiosynthese, für ~13% des detektierten Rapamycins bei einer Konzentration von 1,25 mM statt. Der einfacheinbau scheint ab einer Konzentration von ~6 mM bei 40% zu stagnieren. Zweifacheinbau fand ab Konzentrationen von 2,5 mM statt. Ebenfalls wurde der D₃-Einbau über die gesamten fünf Tage der Fermentation beobachtet. Im Fall der Rapamycinbiosynthese kann angenommen werden, dass der Einbau von D₃-MMSNAC auch zufällig verteilt über alle sieben Module der Rapamycin-PKS die MMCoA einbauen verteilt, stattfindet.

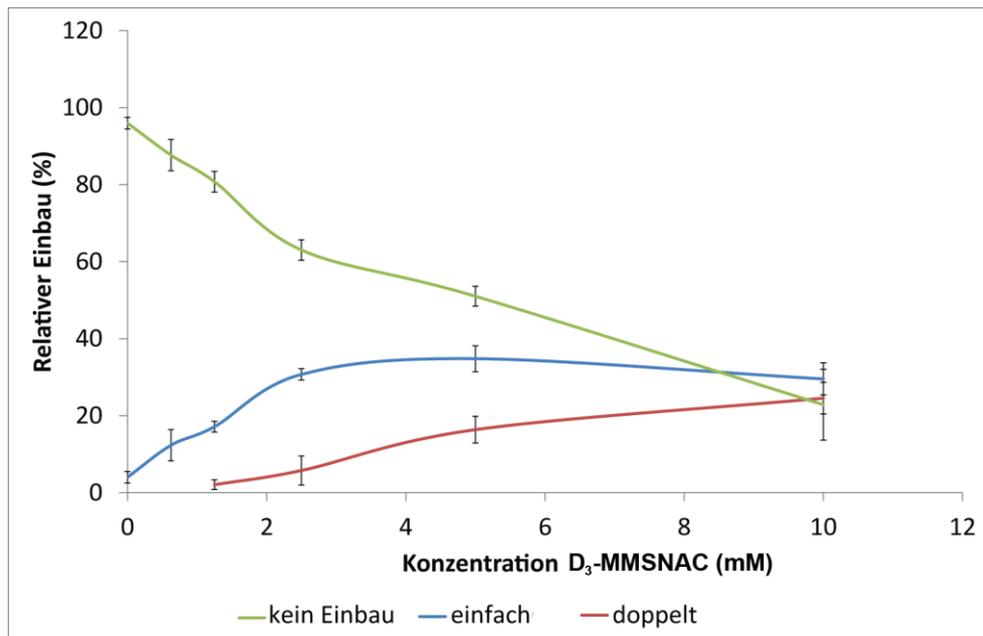


Abbildung 24: Relative Einbauraten von D₃-MMSNAC in Rapamycin. Abbildung stammt aus der Dissertation von Dr. U. Sundermann S.53.^[76]

Auch im Fall der Fütterungsexperimente für die Rapamycinbiosynthese musste berücksichtigt werden, dass D₃-MMSNAC racemisch gefüttert wurde, jedoch nur das (2S)-Substrat für die Biosynthese zur Verfügung steht. Die Berechnung der halbmaximalen Konzentrationen durch das Angleichen der Messwerte an die Michaelis-Menten-Gleichung ergab für den einfach Einbau einen Wert von $0,67 \pm 0,42$ mM und für den zweifach Einbau ein Wert von $2,21 \pm 0,19$ mM. Dies impliziert einen ähnlichen Verlauf bei dem Einbau von SNAC-aktivierten Malonaten, beginnend mit dem Membrantransfer bis hin zur Transthoesterifizierung an den PKS-Enzymen.

4.7.1.5 Quantifizierung des Einflusses durch SNAC-Aktivierung

Der exogene Zusatz von D₃-MMSNAC kann mit dem endogenen MMCoA konkurrieren, sofern mM-Konzentrationen eingesetzt werden. Um einen möglichen *in vivo* Austausch von SNAC mit dem nativen CoA auszuschließen, wurde der Einbau von D₃-Methylmalonsäure mit D₃-MMSNAC in der Rapamycinbiosynthese direkt verglichen. Bei einer Konzentration von 2 mM D₃-MMSNAC waren 29% des extrahierten Rapamycins D₃-markiert, aber nur 17% unter Verwendung des nicht aktivierten D₃-Methylmalonats (Abbildung 25). Eine Konzentration von 4 mM D₃-MMSNAC ergab eine 44%-ige Einbaurrate, während dieselbe Konzentration an D₃-Methylmalonsäure nur einen 31%-igen Einbau ergab. Dies entspricht einem 1,5- bis 1,7-fach höheren Einbau von Malonsäure-SNAC-Ester.

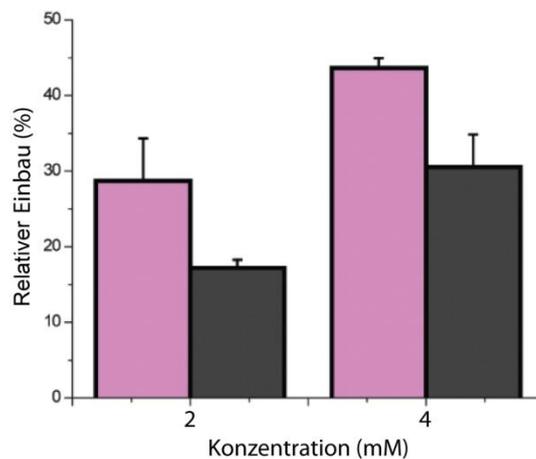


Abbildung 25: Einbau von D₃-MMSNAC (magenta) und D₃-Methylmalonsäure (schwarz) in die Rapamycinbiosynthese. Abbildung stammt aus der Dissertation von U. Sundermann S.53.^[76]

Selbst für den Fall, dass eine spontane Hydrolyse oder eine intrazelluläre Esterspaltung erfolgt, die wiederum durch kontinuierlicher Reaktivierung der D₃-Methylmalonsäure als CoA-Ester komplementiert wird, ist der Einbau der D₃-MMSNAC wesentlich effektiver. Somit hat die SNAC-Aktivierung einen entscheidenden Einfluss auf den Einbau von exogenen Malonaten.

4.7.1.6 Diskussion

Basierend auf dem Einfacheinbau von D₃-MMSNAC konnte eine relative Einbaurrate von ~40% bei Konzentrationen unter 10 mM, sowohl für den Erythromycin-, als auch für den Rapamycinproduzenten beobachtet werden. Sobald die Substratkonzentration weiter erhöht wird, stagniert der Einfacheinbau von D₃-MMSNAC und Doppel-, sowie Dreifacheinbau

werden beobachtet. Bis zu 60% von Erythromycin und Rapamycin werden einfach oder mehrfach D₃-markiert, wenn die Konzentration von D₃-MMSNAC bei 10 mM liegt, was einer tatsächlichen Konzentration von 5 mM des natürlich akzeptierten (S)-Enantiomers entspricht. Ein signifikanter Einbau vom aktivierten D₃-Methylmalonat in die Biosynthese von Erythromycin und Rapamycin benötigt keinen großen Konzentrationsunterschied (≥ 1 mM) von (S)-D₃MMSNAC, was auf eine hinreichende Reaktivität mit den AT-Domänen innerhalb der PKS hindeutet. Unter der Berücksichtigung, dass D₃-MMSNAC mit endogenem MMCoA konkurriert, welches in μ M-Konzentrationen in Actinomyceten vorliegt^[181], ist es naheliegend Malonsäurederivate, die keine große strukturelle Ähnlichkeit mit Methylmalonat besitzen, in höheren Konzentrationen zu füttern. Dadurch soll idealerweise eine Sättigung der AT mit künstlichen Verlängerungseinheiten gewährleistet werden. Zusätzlich muss noch berücksichtigt werden, dass D₃-MMSNAC aus dem Medium in die Zelle gelangen muss, bevor es mit der PKS interagieren kann, sodass derzeit keine Aussage über die tatsächliche intrazelluläre Konzentration gemacht werden kann. Der Einbau nicht-natürlicher biosynthetischer Bausteine in die Polyketidbiosynthese ist ein enorm anspruchsvolles und wachsendes Forschungsfeld, welches eine modifizierte Biosynthese innerhalb des Produzenten erfordert^[54, 119, 182], und den synthetischen Zugang zu präparativ erhältlichen SNAC-aktivierten Malonsäuren. Bis *dato* sind die Fütterungsstudien noch nicht systematisiert und insbesondere das Konkurrenzverhalten von MMCoA gegenüber nicht-natürlichen Malonaten bedarf weiterer Quantifizierung.

Die genaue Kenntnis über die Konzentration an benötigten SNAC-aktivierten Malonaten ist entscheidend, um eine mögliche Unter- oder Überdosierung zu vermeiden. Eine Unterdosierung könnte dazu führen, dass die Einbaurate unterhalb des Detektionslimits liegt und eine Überdosierung könnte sich letal auf die Mikroorganismen auswirken. Diese Ergebnisse zeigen den Vorteil und auch die Notwendigkeit von aktivierten Malonsäurederivaten, da davon ausgegangen werden kann, dass die intrazelluläre Synthesemaschinerie nicht dafür ausgelegt ist nicht-natürliche Malonsäurederivate effektiv einzubauen. Die Effektivität von SNAC als CoA-Mimetikum in mM-Konzentrationen von (S)-D₃-MMSNAC scheint auf verschiedenen Gattungen und AT-Enzymen übertragbar zu sein und gibt somit einen guten Startpunkt für weitere Optimierung.

4.7.2 Synthese von SNAC-aktivierten Malonsäurederivaten

Für alle Projekte mit Acyltransferasen in der vorliegenden Arbeit, ist der präparative Zugang zu Malonsäurederivaten von grundlegender Bedeutung. Abbildung 26 zeigt die angestrebten Zielverbindungen.

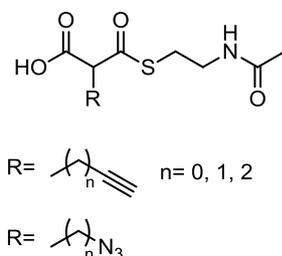


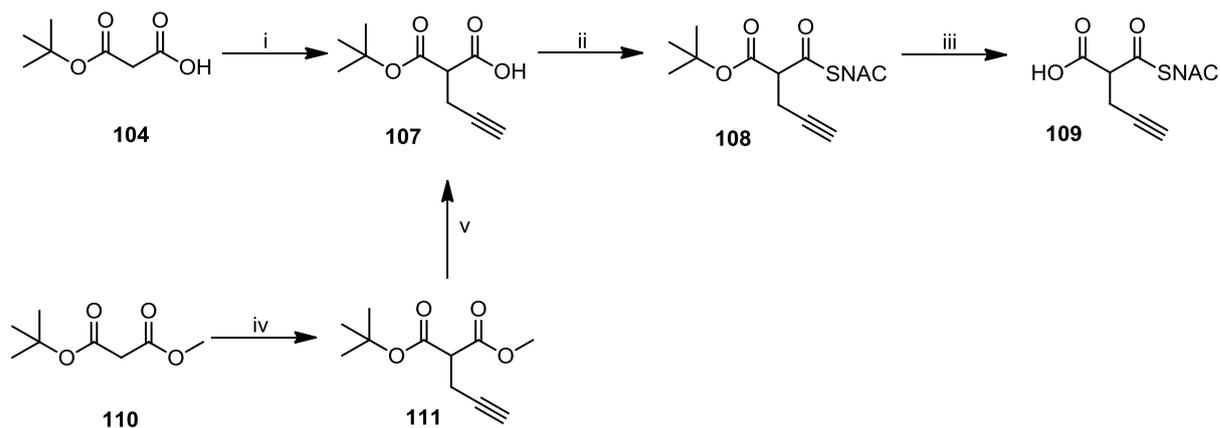
Abbildung 26: Angestrebte MSNAC-Derivate für das *trans*- und *cis*-AT-Projekt.

Es sollten orthogonal funktionalisierte Malonsäurederivate dargestellt werden, die im Falle eines präparativ wertvollen, Einbaus post-biosynthetische Modifikationen erheblich erleichtern würden. Des Weiteren sollten verschieden substituierte Derivate synthetisiert werden, die die Erstellung eines Substratprofils der getesteten AT-Varianten erlauben.

4.7.2.1 Synthese von Propargyl-MSNAC (109)

Zunächst lag der Fokus auf der Synthese von SNAC-aktiviertem Propargylmalonat (Propargyl-MSNAC, **109**). Das Ziel war es, diese Verbindung in präparativen Mengen zu synthetisieren, um somit genügend Material für das *cis*- und *trans*-AT-Projekt bereitzustellen. Die Synthese sollte dabei ursprünglich analog zu der Synthese von D₃-MMSNAC (Schema 45, Kapitel 4.7.1.1) ablaufen. Es zeigte sich, dass die Ausbeuten in der Alkylierung moderat waren und die Dialkylierung als dominante Nebenreaktion auftrat. Bei Ansätzen unter 1 g konnten Ausbeuten von bis zu 84% erzielt werden. Jedoch sanken die Ausbeuten drastisch bei dem Versuch, den Ansatz zu vergrößern. So konnten bei einem 3 g Ansatz nur noch 19% der gewünschten Verbindung **107** erhalten werden (Schema 46). Um dieses Problem zu umgehen, wurde die kommerziell erhältliche Verbindung **110** mit Propargylbromid alkyliert. Der zusätzliche Methylester dieser Verbindung sollte eine leichtere Abtrennung des dialkylierten Malonats vom gewünschten monoalkylierten Malonat ermöglichen (Schema 46). Die Ausbeuten waren gering und die Trennung in präparativen Ansätzen gelang kaum. Ausbeuten um 50% konnten erst erreicht werden, als Verbindung **110** im doppelten Überschuss (im Vergleich zum Alkylierungsmittel) hinzugegeben wurde. Des Weiteren musste der Methylester der Verbindung **111** selektiv in Gegenwart des *tert*-Butylesters

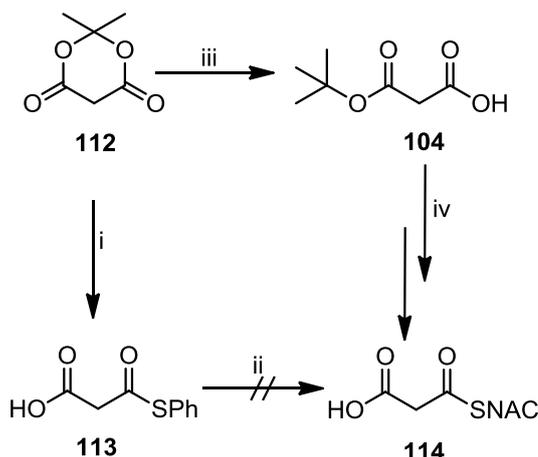
gespalten werden. Nach Optimierung gelang dies auch mit Hilfe von $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ in einem Lösemittelgemisch aus THF/MeOH/ H_2O 7:2:1. Somit wurde schnell klar, dass die direkte Alkylierung von Malonsäuren und deren Estern möglich, aber präparativ nur bedingt nützlich ist. Trotzdem wurde diese Route vorläufig verwendet, um eine konstante Versorgung mit einem nicht-natürlichen Malonat für die Fütterungsexperimente der AT-Varianten zu gewährleisten.



Schema 46: Synthese von Propargyl-MSNAC. i) 2.1 eq. LDA, 1.0 eq. Propargylbromid, abs. THF, $-78^\circ\text{C}\rightarrow\text{RT}$, Ar, 18 h, 19-84%; ii) 1.3 eq. CDI, 0.3 eq. DMAP, 1.5 eq. *N*-acetylcysteamin, abs. THF, $0^\circ\text{C}\rightarrow\text{RT}$, Ar, 18 h, 82%; iii) 2.5 eq. TiCl_4 , CH_2Cl_2 , Ar, $0^\circ\text{C}\rightarrow\text{RT}$, 6 h, quant. (DC und $^1\text{H-NMR}$); iv) 0.75 eq. NaH 60% w/t, 0.5 eq. Propargylbromid, abs. THF, $-78^\circ\text{C}\rightarrow\text{RT}$, Ar, 18 h, 54%; v) 1.0 eq. $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 9:1, 30 min 70%.

4.7.2.2 Entwicklung neuartiger Syntheserouten zur Darstellung von Propargyl-MSNAC (109)

Auf der Suche nach einer präparativnutzbaren Syntheseroute fiel das Augenmerk auf die Meldrums Säure (**112**). So berichteten Pohl *et al.*^[183], dass Meldrums Säure **112** mit SNAC in Gegenwart von Trimethylsilyl-Imidazol (TMS-Imidazol) und katalytischen Mengen Trimethylsilyltrifluormethansulfonsäure (TMSOTf) direkt in den SNAC-Ester **114** überführt werden kann (Schema 47:). In der Literatur ist beschrieben, das TMS-Nucleophile unter milden Bedingungen Meldrums Säure öffnen können.^[184] M. D.Sassman *et al.* berichteten über diese Methode um mono-O-Silylthioacetale darzustellen.^[185] Versuche, diese Methode auf andere Substituenten als Methyl zu übertragen lieferten nur unzuverlässige und schwer reproduzierbare Ergebnisse.



Schema 47: Alternative Syntheseveruche für Verbindung **114**. i) 2.0 PhSH, Dioxan, 100°C; ii) 2.0 eq. SNAC, NEt₃ oder NaHCO₃ oder Na₂CO₃, RT; iii) *t*BuOH, reflux, 6h, 95%, iv) 1.2 eq. CDI, 1.2 eq. SNAC, 0.3 eq. DMAP, THF, RT, Ar, 86%, 2.5 eq. TiCl₄, DCM, 6h.

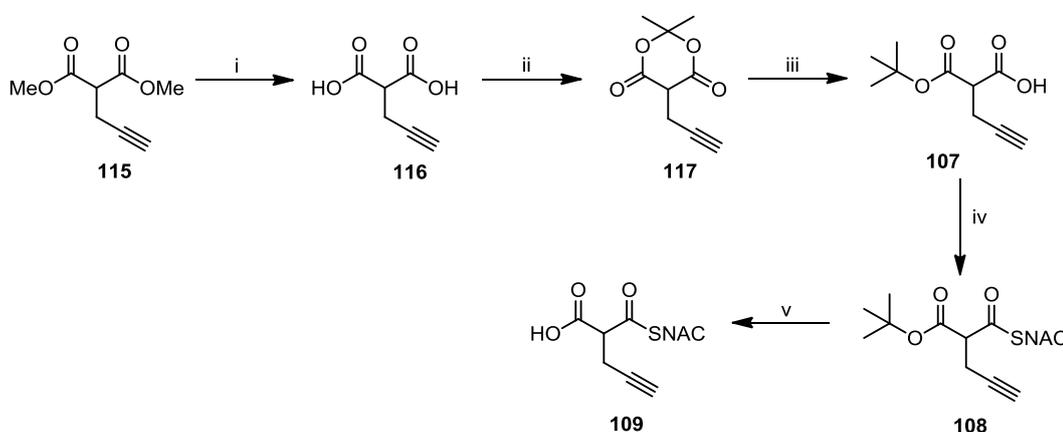
Alternativ sollte die Meldrums Säure **112** in Gegenwart von Thiophenol unter Rückfluss geöffnet werden, wie es bereits D. Magdziak *et al.* beschrieben haben.^[186] Verbindung **113** konnte nach 5 h unter Rückfluss in quantitativen Ausbeuten erhalten werden. Es stellte sich heraus, dass diese Verbindung zumindest über wenige Tage bei -20°C lagerbar ist. Versuche Verbindung **113** in Verbindung **114** zu überführen gelangen nicht zufriedenstellend. Dabei wurde eine Umesterung im wässrigen Milieu unter Verwendung eines Überschusses an SNAC und verschiedenen Basen (NEt₃, NaHCO₃, Na₂CO₃) verwendet. Jedoch gelang es nicht das entstehende Thiophenol vollständig vom Produkt zu trennen. Dadurch war dies nicht für Fütterungsexperimente einsetzbar. Versuche, in denen Meldrums Säure in *tert*-Butanol refluxiert wurde, ergaben nach 6 h Reaktionszeit die *tert*-Butylmalonsäure **104** in Ausbeuten um 95%. **104** lässt sich wiederum unter den bereits optimierten Bedingungen mit SNAC verestern und die *tert*-Butylgruppe quantitativ mit TiCl₄ entfernen. Im Folgenden wurde versucht, die Technik auf verschiedene Substituenten zu übertragen.

Versuche alkylierte Meldrums Säurederivate durch Acylierung mit Säurechloriden^[170, 187] oder mit Carbonsäuren und DCC/DMAP unter anschließender Reduktion mit NaBH₄^[188] zu erhalten, verliefen nicht zuverlässig. So zeigten Testreaktionen unter Verwendung von Acylchlorid, dass die Acylierung in guten Ausbeuten verlief, die anschließende Reduktion jedoch Probleme bereitete. Reaktionen von Essigsäure mit DCC und DMAP zeigten hingegen keinen Umsatz. Zwei Routen ergaben Verbindung **114** in Ausbeuten von bis zu 84% und eröffnen damit neue Möglichkeiten, um alkylierte Meldrums Säure zu erhalten. Zum einen erhält man Zugang zu **114** ausgehend von kommerziell erhältlichen

Malonsäurediethyl- oder Malonsäuredimethylester nach der Methode von Singh und Danishefsky^[189] und zum anderen mittels reduktiver Alkylierung nach der Methode von Hrubowchak und Smith.^[190] Diese beiden Methoden wurden im weiteren Verlauf für die Synthese neuer Malonate verwendet.

4.7.2.3 Darstellung präparativer Mengen von Propargylmalonsäure (**109**)

Um Zugang zu Propargylmalonat zu erhalten, wurde der kommerziell erhältliche Propargylmalonsäuredimethylester (**115**) verwendet. Dieser wurde zunächst nach dem Protokoll von Singh und Danishefsky^[189] mit Lithiumhydroxid verseift und mit einer Ausbeute von 73% in die entsprechenden Meldrums Säure überführt (Schema 48).

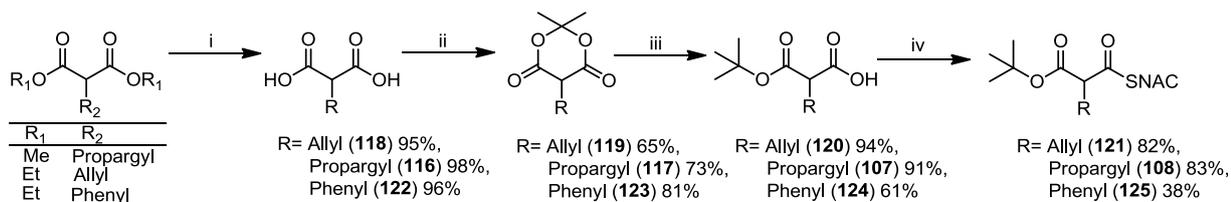


Schema 48: Syntheserouten zur Darstellung der Verbindung (**109**). i) 3.0eq. LiOH·H₂O, H₂O, 18h, RT, 98%; ii) 1.01 eq. Isoprenylacetat, 0.06 eq. H₂SO₄, ohne Lösemittel, 18h, RT, 73%; iii) *t*BuOH, 6 h, 90-100°C; iv) 1.1 eq. CDI, 0.3 eq. DMAP, 1.2 eq. SNAC, THF, 18h, RT; v) 2.5 eq. TiCl₄, DCM, Ar, 0°C→RT, 6 h, quant. (DC und ¹H-NMR).

Über die Propargylmeldrums Säure **117** erhält man Verbindung **109** in 54% Ausbeute über fünf Stufen. Die über die Alkylierung von Malonsäureestern verlaufenden Reaktionen lieferten nur 16% über drei Stufen bzw. 31% über vier Stufen (Schema 46).

Um Zugang zu weiteren Malonaten zu erhalten, wurden kommerziell erhältliche Malonsäurediethylester verwendet. Diese wurden nach Verseifung mit Lithiumhydroxid nach dem Protokoll von Singh und Danishefsky^[189] in die entsprechenden Meldrums Säure in guten Ausbeuten überführt (Schema 49).

Ergebnisse und Diskussion

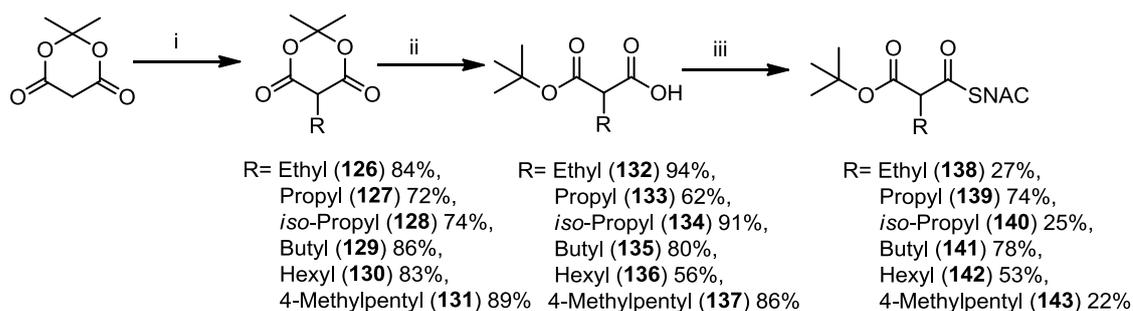


Schema 49: Synthese der Verbindungen und deren Ausbeuten. i) 3.0 eq. LiOH·H₂O, H₂O, 18h, RT; ii) 1.01 eq. Isoprenylacetat, 0.06 eq. H₂SO₄, ohne Lösemittel, 18h, RT; iii) *t*BuOH, 6h, 90-100°C; iv) 1.1 eq. CDI, 0.3 eq. DMAP, 1.2 eq. SNAC, THF, 18h, RT.

Diese Route ist im präparativen Maßstab von bis zu 50 g ohne Probleme anwendbar. Ein weiterer Vorteil bei dieser Methode ist, dass die Schritte i-iii (Schema 49) nicht zwangsweise eine säulenchromatographische Aufarbeitung benötigen. Anzumerken sei jedoch, dass im Falle der Phenylmeldrums Säure **123** bei der Umsetzung zu **125** unter den gegebenen Reaktionsbedingungen Decarboxylierungen auftreten können, die nach 6 h Reaktionszeit deutlich zunehmen.

4.7.2.4 Darstellung neuer Malonsäurederivate mittels reduktiver Alkylierung

Eine sehr elegante Methode, um eine Vielzahl von Meldrums Säurederivate zu erhalten, bietet die Methode nach Hrubowchak und Smith mittels reduktiver Alkylierung.^[190] Dabei wird Meldrums Säure in Gegenwart von Aldehyden und Borandimethylamin-Komplex in die entsprechenden alkylierten Meldrums Säure zuverlässig und in hohen Ausbeuten überführt. Die einzige Limitation dieser Variante ist, dass nur gesättigte Aldehyde toleriert werden. Sterisch anspruchsvolle Aldehyde wie z.B. Pivaloylaldehyd oder α,β -ungesättigte Aldehyde wie Acrolein oder (*E*)-3-Methylhex-3-enal und *iso*-Butyraldehyd werden hingegen nicht toleriert. Überlegungen, Verbindung **109** über reduktive Alkylierung zu synthetisieren, ausgehend von Propargylaldehyd, wurden verworfen. Zwar sind Literaturprotokolle für die Synthese von Propargylaldehyd beschrieben, jedoch konnte N. Pryk in Rahmen seiner Masterarbeit zeigen, dass diese Verbindung nur als TMS-Propargylaldehyd in präparativen Mengen handhabbar ist.^[108] Der Syntheseaufwand machte dieses Vorhaben jedoch unbrauchbar.



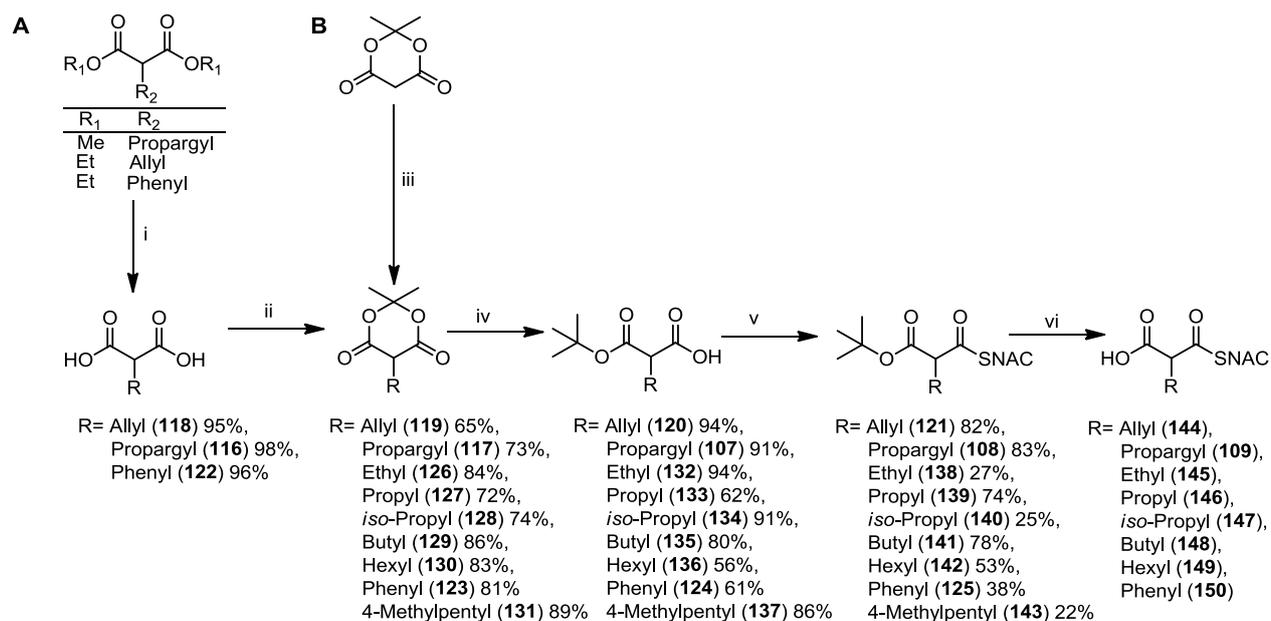
Schema 50: Synthese der Verbindungen und deren Ausbeuten. i) 1.0 eq. Borandimethylamin-Komplex, 3.0 eq. Acetaldehyd, Propyl-, Butyl-, 4-Methylpentyl-, Hexylaldehyd oder Aceton, 1 h-18 h, RT; ii) *t*BuOH, 6h, 90-100°C; iii) 1.1 eq. CDI, 0.3 eq. DMAP, 1.2 eq. SNAC, THF, 18 h, RT; iv) 2.5 eq. TiCl₄, DCM, 6 h, RT, quant. (NMR).

Mittels dieser Methode kann schnell und unkompliziert der Zugang zu einer Vielzahl an alkylierten Malonsäurederivaten gewährleistet werden (Schema 50). Die reduktive Alkylierung ist präparativ sehr gut nutzbar, jedoch sollte aus Sicherheitsgründen von Ansätzen größer 20 g auf Grund der stark exothermen Reaktion abgesehen werden (siehe Experimenteller Teil Kapitel 7.27). Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass die Reaktionsschritte i und ii (Schema 50) nicht notwendigerweise säulenchromatographisch aufgereinigt werden müssen, was eine enorme Zeitersparnis bei der Aufreinigung bedeutet. So bekommt man die Meldrums Säurederivate **126-131** durch simples Umkristallisieren aus Methanol analysenrein und die Verbindungen der *tert*-Butylmalonsäurederivate **107, 120, 124, 132-137** können in den meisten Fällen direkt ohne Aufarbeitung umgesetzt werden.

4.7.2.5 Zusammenfassung zur Darstellung von Alkylmalonsäuren

Schema 51: zeigt eine Übersicht der synthetisierten SNAC-Malonsäurederivate, die mittels Meldrums Säurebildung^[189] (Route A) oder reduktiver Alkylierung^[190] (Route B), synthetisiert wurden. Somit gelang es eine präparativ nutzbare Route zu entwickeln, um Zugang zu den SNAC-aktivierten Malonsäurederivaten (**109, 144-150**) zu erhalten. Wie aus Schema 51 ersichtlich ist, hängt die Ausbeute sehr stark von dem Alkylrest der *tert*-Butylmalonsäure ab. So werden für die Thioveresterung Ausbeuten von 22-83% erzielt.

Ergebnisse und Diskussion



Schema 51: Synthese der Verbindungen und deren Ausbeuten. i) 3.0 eq. LiOH·H₂O, H₂O, 18h, RT; ii) 1.01 eq. Isoprenylacetat, 0.06 eq. H₂SO₄, ohne Lösemittel, 18h, RT; iii) 1.0 eq. Borandimethylamin-Komplex, 3.0 eq. Acetaldehyd, Propyl-, Butyl-, 4-Methylpentyl-, Hexylaldehyd oder Acetone, 1 h-18 h, RT; iv) *t*BuOH, 6h, 90-100°C; v) 1.1 eq. CDI, 0.3 eq. DMAP, 1.2 eq. SNAC, THF, 18 h, RT; vi) 2.5 eq. TiCl₄, DCM, 6 h, RT, quant. (NMR).

Ein weiteres Problem trat bei der *tert*-Butyl-Entschützung der *tert*-Butylmalonsäurethioester **108**, **121**, **125**, **138-143** auf. Die Reaktion mit TiCl₄ selbst verläuft auch in größeren Maßstäben ohne Probleme, solange auf eine Konzentration von 10 ml DCM/100 mg Startmaterial geachtet wird. Probleme traten erst bei der Aufarbeitung auf. Es musste anstelle von NaHCO₃ auf Na₂CO₃ ausgewichen werden, da bei großen Ansätzen zu starkes Schäumen auftrat und häufig der Pufferbereich überschritten wurde, sodass die Lösung einen pH von 2-4 hatte und die Verbindungen anfangen zu decarboxylieren. Durch Zugabe von 10,0 eq. Na₂CO₃ konnte sichergestellt werden, dass der pH-Wert unabhängig von der Ansatzgröße immer zwischen pH 8 und 9 liegt. Sollten größere Mengen an SNAC-aktivierten Malonsäuren benötigt werden, zum Beispiel für präparative Fermentationen, ist es ratsam max. 2 g pro Ansatz zu benutzen, da sich die Reaktion in Bereichen von 100 mg-2 g als zuverlässig reproduzierbar erwies. Für Reaktionen bis 2 g kann problemlos das anfallende TiO₂ mit einer Fritte abfiltriert werden. Der Filterkuchen sollte mehrmals mit Methanol gewaschen werden. Wichtig ist auch, dass die Fritte zuvor gründlich gereinigt wurde. Um dies zu gewährleisten muss die Fritte zuerst mit Ethylacetat, Methanol, Wasser, konzentrierter Salzsäure und nochmals mit Wasser gewaschen werden. Um sicherzustellen, dass keine Rückstände von Übergangsmetallen, Schwermetallen oder seltenen Erden in der Fritte vorhanden sind, wurde diese zusätzlich nochmals mehrfach mit einer Lösung aus 25% H₂O₂ und 10% (w/v) Natriumhydroxid gewaschen. Anschließend wird mit konzentrierter

Salzsäure gewaschen und mit Wasser neutralgewaschen. Dies ist notwendig, da vermutlich solche Kleinstrückstände an Metallen zu einer anfangs unzuverlässigen Reproduzierbarkeit der Fermentationsergebnisse beitragen. Erst nach gründlicher Reinigung und unter Verwendung derselben Fritte konnten die Ergebnisse kontinuierlich reproduziert werden. Bei größeren Ansätzen führten häufig die vereinigten Reaktionsgemische zur Verstopfungen der Fritte durch das Anfallen von TiO_2 . Um nicht zu viel kostbares Produkt zu verlieren, wurden die gelöschten Reaktionsgemische in 50 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 4000 rpm für 5 min zentrifugiert. Dies hat den Vorteil, dass sich ein Pellet aus TiO_2 zwischen der Dichlormethan- und der wässrigen Phase bildet. Die beiden Phasen wurden anschließend vorsichtig über eine Fritte gefiltert. Die verbleibenden TiO_2 -Pelletes wurden ebenfalls in die Fritte gegeben und mehrmals mit Methanol gewaschen. Anschließend muss das DCM/MeOH/Wasser-Gemisch bei 30°C Wasserbadtemperatur behutsam destilliert werden, sodass nur noch die wässrige Phase übrig bleibt. Um das Produkt in das gewünschte Puffermedium mit der gewünschten Konzentration zu überführen, ist es wichtig die wässrige Phase von nun an mittels Gefriertrocknung aufzukonzentrieren. Versuche bei denen die wässrige Lösung bei 30°C Wasserbadtemperatur eingedampft wurde, führten zu einer Zersetzung des Produkts. Die produktthaltige Lösung sollte bei der Gefriertrocknung ebenfalls nicht bis zur Trockene eingengt werden, da Zersetzungen auftreten können. Durch diese Methode konnten zuverlässig Verbindungen **109**, **144-150** synthetisiert werden. Abbildung 27 zeigt exemplarisch das NMR-Spektrum von Propargyl-MSNAC (**109**) nach der eben beschriebenen Methode. Berücksichtigt man alle Techniken in der Aufarbeitung erhält man die Verbindungen **109**, **144-149** Nebenproduktfrei, ohne weitere Aufreinigungen.

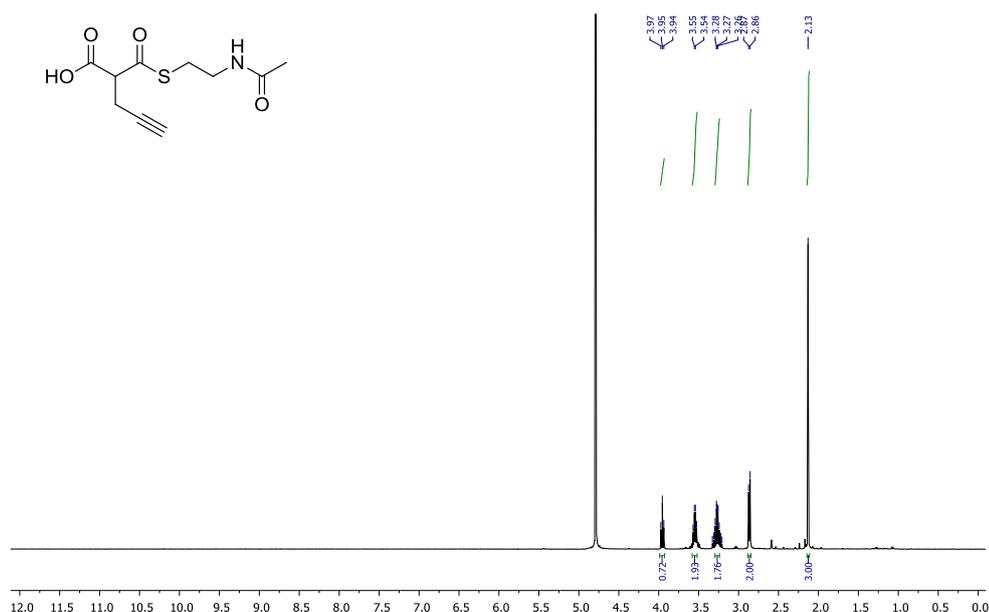


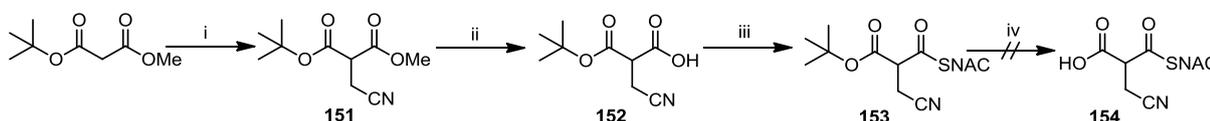
Abbildung 27: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Propargyl-MSNAC (**109**); Für die NMR-Analyse wurden Verbindungen nach der Gefriertrocknung in D_2O gelöst.

Nur im Falle des Phenyl-MSNAC (**150**) traten bereits bei dieser Art der Aufarbeitung schon Zersetzungen auf. So kann Verbindung **150** nach NMR-Analyse nur mit ungefähr 50% Ausbeute nach NMR-Analyse erhalten werden.

4.7.2.6 Versuche zur Darstellung verschieden funktionalisierter SNAC-Malonsäure-derivate

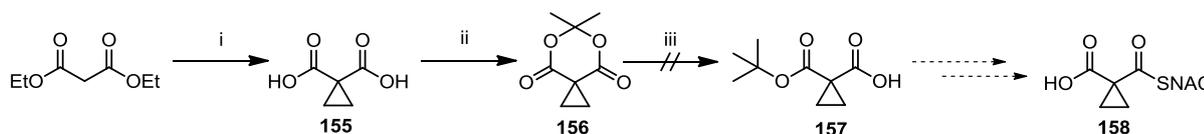
In diesem Kapitel werden kurz die Syntheseversuche funktionalisierter Malonsäurederivate beschrieben, deren Darstellung bedingt durch Probleme in den unterschiedlichen Stadien der Entwicklung nicht fertiggestellt werden konnten.

Die Synthese von Cyanomethyl-MSNAC (**154**) wurde nach folgender Syntheseroute durchgeführt (Schema 52) und scheiterte in der Entschützung.



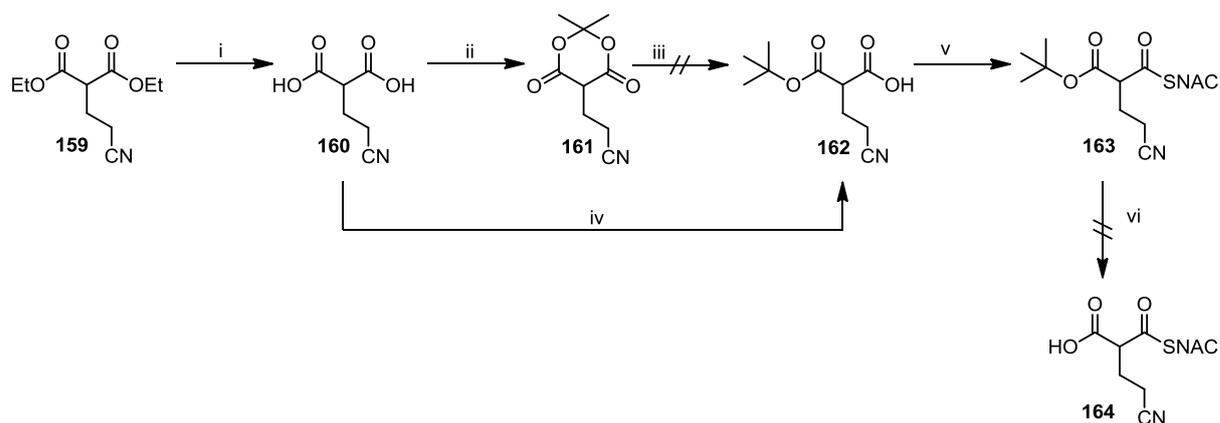
Schema 52: Syntheseversuche zur Darstellung von Cyanomethyl-MSNAC. i) 2.0 eq. Bromoacetonitril, 1.0 eq. NaH 60% w/t, THF, RT, Ar, 18h, 34%; ii) 1.3 eq. LiOH·H₂O, THF/MeOH/H₂O 7:2:1, RT, 3 h, 70 %; iii) 1. 1.1 eq. LiOH·H₂O, H₂O/MeOH 9:1, RT, 30 min, 70%, 2. 1.2 eq. CDI, 1.2 eq. SNAC, 0.3 eq. DMAP, THF, RT, Ar, 18 h, 24%; iv) 2.5 eq. Lewis-Säure, DCM, RT, Ar, 6h.

Die Synthese von Cyclopropyl-MSNAC (**158**) sollte nach folgender Syntheseroute durchgeführt werden (Schema 53). Jedoch scheiterte der Versuch Verbindung **156**^[191-196] in den *tert.*-Butylester **157** zu überführen.



Schema 53: Synthese Versuche der Verbindung Cyclopropyl-MSNAC (**158**): i) 1.2 eq. 1,2-Dibromethan, 1.1 eq. Benzyltriethylaminchlorid, 50% (w/t) NaOH, RT, 1h, 37%;^[191] ii) 1.01 eq. Isoprenylacetat, 0.06 eq. H₂SO₄, ohne Lösemittel, 0°C, 18 h, 28%;^[191-196] iii) *t*BuOH, 90°C, 6h.

Cyanoethyl-MSNAC (**164**) sollte ausgehend von kommerziell erhältlichen Malonsäureester **159** synthetisiert werden (Schema 54).

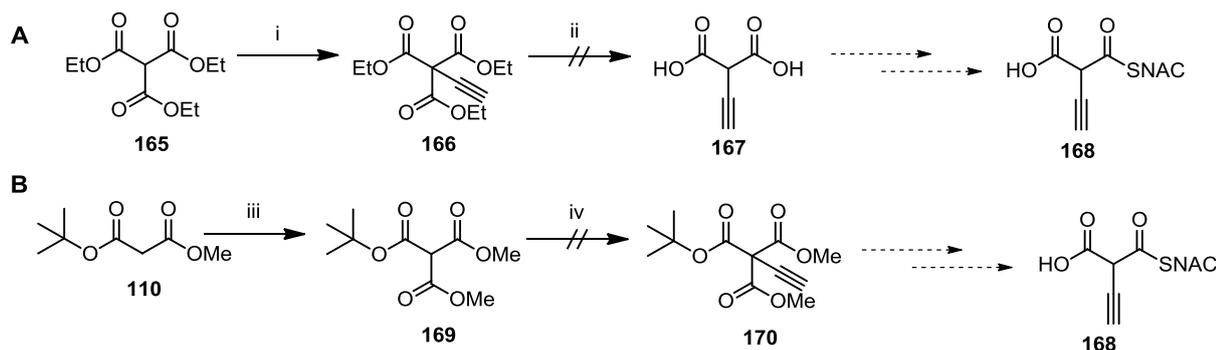


Schema 54: Syntheseversuche zur Darstellung von Cyanoethyl-MSNAC. i) 3.0 eq. LiOH·H₂O, H₂O, RT, 18h, 67%; ii.) 2.0 eq. Aceton, 0.06 eq. H₂SO₄, 2.0 eq. Ac₂O, 0°C, 18 h, 49%; iii) *t*BuOH, 90°C, 6h; iv) 2.5 eq. *t*BuOH, 2.0 eq. DIC, 0.06 eq. CuCl, DCM, RT, 4d, Ar, 24%; v) 1.2 eq. CDI, 1.2 eq. SNAC, 0.3 eq. DMAP, THF, RT, 18h, Ar, 54%; vi) 2.5 eq. Lewis-Säure, DCM, RT, 6h, Ar.

Verbindung **160** konnte nicht in **161** mit Isoprenylacetat überführt werden. Die Überführung in das Meldrums Säurederivat **161** gelang mittels Aceton, Essigsäureanhydrid und katalytische Mengen H₂SO₄. Der Versuch das Meldrums Säurederivat **161** in den *tert*-Butylester **162** zu überführen schlug fehl. Diese Reaktion führte nur zu einer Zersetzung des Startmaterials. Um dieses Problem zu umgehen, wurde versucht direkt die freie Malonsäure **160** in den *tert*-Butylester **162** zu überführen. Unter Verwendung der Methode von Mathias *et al.*^[197] mit *tert*-Butanol, DIC und CuCl wurde Verbindung **162** in moderaten Ausbeuten von 24 % erhalten. Es erfolgte auch hier eine Zersetzung des Startmaterials, bei dem Versuch den *tert*-Butylester mittels Lewis-Säure zu entschützen.

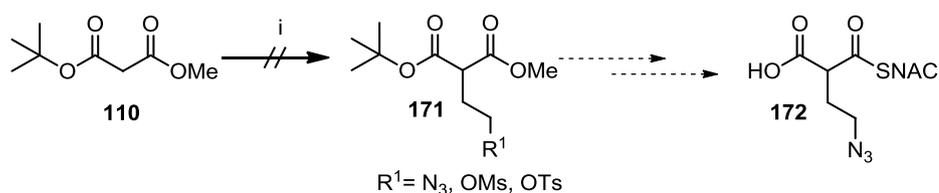
Ebenfalls wurde versucht ein Ethinyl-MSNAC (**168**) zu synthetisieren (Schema 55). Dazu wurden umfangreiche Syntheseversuche unternommen. Die Synthese von Ethinylmalonsäure-SNAC-diestern^[198] mittels Ethinyl(phenyl-1)iodoniumtetrafluoroborat^[199], einer hypervalenten Iodoniumspezies wurde bereits beschrieben. Des Weiteren berichteten D.F. Gonzalez *et al.* von der Synthese von Ethinyl-1,2-benziodoxol-3(1H)-on, mit der es möglich ist Keto-, Cyano- und Nitroester zu ethinylieren.^[200] Dessen TMS-Analogon ist stabiler und kann *in situ* EBX freisetzen, daher wurde es für Testreaktionen synthetisiert und eingesetzt.^[200] Experimente mit Ethinyl(phenyl-1)iodoniumtetrafluoroborat anhand verschiedener Modellsubstanzen lieferte kein Produkt. TMS-EBX hingegen führte bei der Verwendung von Triethylmethantricarboxylat (**165**) zur Alkinylierung (Schema 55). Das Produkt decarboxylierte jedoch nach Hydrolyse der Ester. Wird jedoch der stabilere *tert*-Butylester **169** eingesetzt gelingt die Ethinylierung nicht mehr.

Ergebnisse und Diskussion



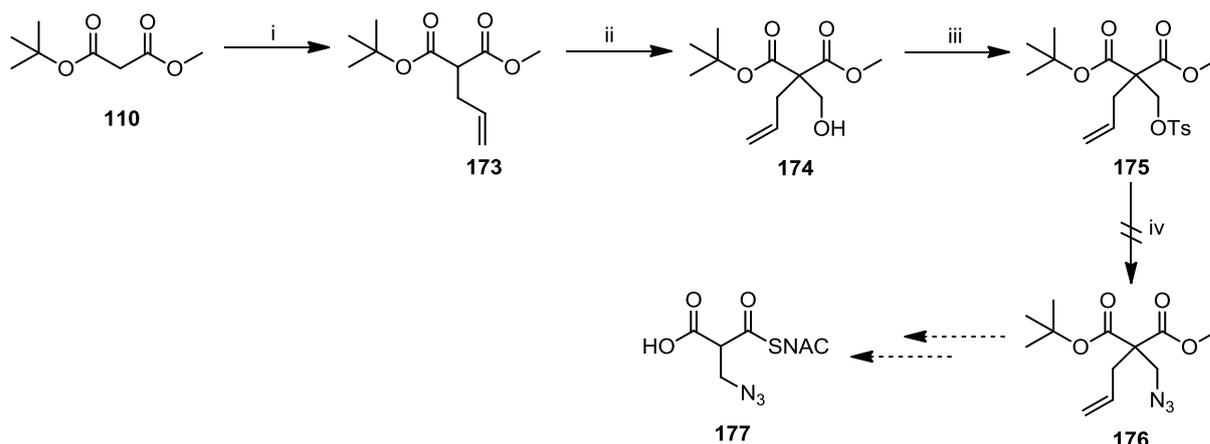
Schema 55: Syntheseveruche zur Darstellung etynlierter Malonate. i) 1.3 eq. TMS-EBX, 1.3 eq. TBAF, THF, -78°C , Ar, 56%; ii) 3.0 eq. $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, H_2O , 18h; iii) 3.0 eq. NaH (60% w/t), 1.4 eq. Chloromethylformiat, THF, 50°C , Ar, 18h, 51%; iv) 1.3 eq. TMS-EBX, 1.3 eq. TBAF, THF, -78°C , 18 h.

Zur Synthese von Azidoethyl-MSNAC (**172**) wurden ebenfalls Versuche unternommen. Dazu wurden für die Alkylierung von **110** nach der Synthesevorschrift von Kohuki *et al.* unter anderem 1-Azido-2-iodoethan und 2-Azidoethyltosylat synthetisiert.^[201] Die Alkylierung wurde unter verschiedensten Reaktionsbedingungen und unter Zuhilfenahme von Cobalt(II)-Salzen^[202-205] an Verbindung **110** durchgeführt (Schema 56). Diese Reaktionsbedingungen führten nicht zur Bildung von **171**. Wahrscheinlich findet bevorzugt eine Eliminierung der 2-Azidoethanolderivate in die resultierenden Vinylverbindungen statt. Da Verbindungen analog zu 2-Azidoethyltosylat und Azido-2-iodoethan benutzt wurden, um Vinylazid darzustellen.^[206-208]



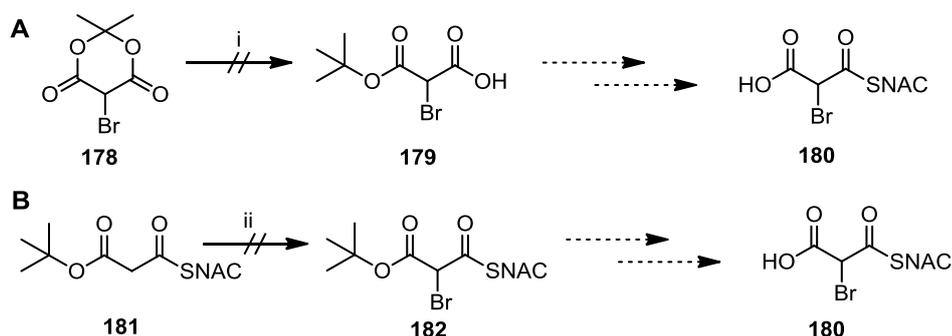
Schema 56: Syntheseveruche zur Darstellung der Verbindungen **172**. i) 1.3 eq. 1-Azido-2-iodoethan oder 2-Azidoethyltosylat oder 2-Bromoethylmesitylat, Basen: 1.1 eq. LDA, NaH, KH oder NaOMe, Lösemittel: THF oder DMF, 0°C bis 50°C , 18h; oder Co(II)-ethylhexanoat, 1.3 eq. 1-Azido-2-iodoethan oder 2-Azidoethyltosylat oder 2-Bromoethylmesitylat, Basen: 1.1 eq. LDA, NaH, KH oder NaOMe, Lösemittel: THF oder DMF, 0°C bis 50°C , 18h.

Die Synthese von Azidomethyl-MSNAC sollte analog zu einer von Allevi *et al.* beschriebenen Methode zur Darstellung von D_3 -Methylmalonsäure durchgeführt werden.^[209] Die Umsetzung von **175** in **176** mit Natriumazid in DMSO gelang jedoch nicht (Schema 57).



Scheme 57: Syntheseveruche zur Darstellung von Azidomethyl-MSNAC (**177**). i) 1.0 eq. NaH 60% w/t, 1.0 eq. Allylbromid, THF, RT, Ar, 18h, 76%; ii) 6.0 eq. Paraformaldehyd, 3.0 eq. KHCO_3 , H_2O , 50°C , 5h, 58%; iii) 1.5 eq. pTsCl, Pyridin, Ar, 18h, RT, 77%; iv) 3.0 eq. NaN_3 , DMSO, 50°C , 18h.

Bromo-MSNAC sollte ausgehend von **178**^[210] und **181** synthetisiert werden. Die Öffnung der Meldrums Säure **178**, bzw. die α -Halogenierung^[211] von Verbindung **181** gelangen nicht (Schema 58).



Scheme 58: Versuche zur Darstellung von Bromo-MSNAC (**180**). i) *t*BuOH, reflux; ii) NBS, DMSO^[211].

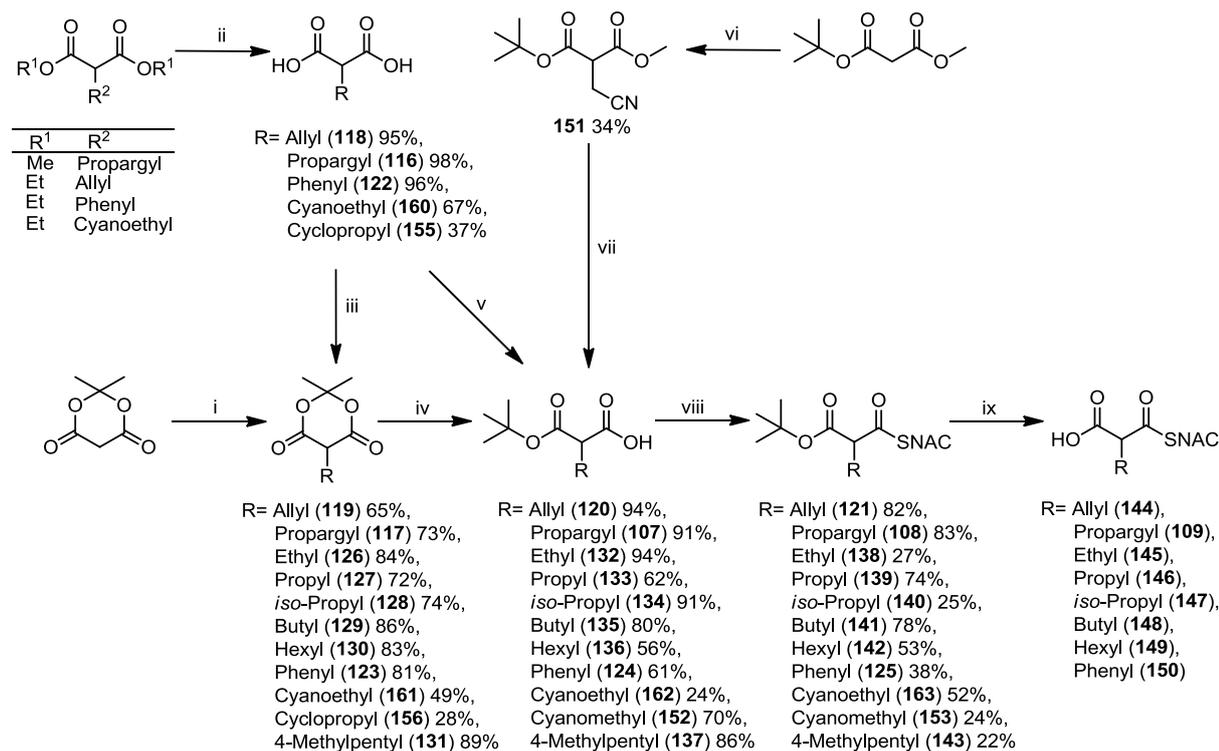
4.7.2.7 Diskussion

Basierend auf den vorher beschriebenen Versuchen zur Darstellung von Azidoethyl-MSNAC, Azidomethyl-MSNAC, Cyanoethyl-MSNAC, Ethinyl-MSNAC und Bromo-MSNAC lässt sich eine Tendenz der Stabilität von substituierten Malonsäuren feststellen. Je näher der elektronenziehende Substituent an der CH-aziden C2-Position der Malonsäure liegt, desto schneller beginnt diese zu decarboxylieren. Die Versuche in diesem Kapitel haben gezeigt, dass SNAC aktivierte Malonate eine sehr hohe Decarboxylierungstendenz haben. Diese ist viel stärker ausgeprägt als z.B. bei Thiophenolestern oder verschiedenen Alkylestern. Unter der Voraussetzung, dass diese Verbindungen mindestens fünf Tage bei 30°C in

Ergebnisse und Diskussion

einer Fermentationskultur stabil sein müssen, wurden weitere Versuche zur Darstellung dieser Verbindung eingestellt.

Basierend auf diesen Erkenntnissen lässt sich folgendes allgemeines Syntheschema für die Synthese der SNAC-aktivierten Malonaten unter Berücksichtigung reaktionsbedingter Limitationen anwenden. Schema 59 zeigt die Ausbeuten und Zwischenstufen zur Synthese der lagerbaren *tert.*-Butylmalonsäure-SNAC-esterderivate **108**, **121**, **125**, **138-143**, **153**, **163**.



Schema 59: Syntheseübersicht. i) 1.0 eq. Borandimethylamin-Komplex, 3.0 eq. Aldehyd, 1h, RT; ii) 3.0 eq. LiOH·H₂O, H₂O, 18h, RT; iii) 1.01 eq. Isoprenylacetat, 0.06 eq. H₂SO₄, Lösemittel frei, 18h, RT, 2.0 eq. Aceton, 2.0 eq. Ac₂O, 0.06 eq. H₂SO₄, 18h, RT (für **156**, **161**); iv) *t*BuOH, 6h, 90-100°C; v) 2.5 eq. *t*BuOH, 2.0 eq. DIC, 0.06 eq. CuCl, Ar, RT, 4d, 24%; vi) 2.0 eq. Bromoacetonitril, 1.0 eq. NaH (60% w/t), THF, RT, 18h, Ar, 34%; vii) 1.0 eq. LiOH·H₂O, THF/MeOH/H₂O 7:2:1, RT, 1h, 70%; viii) 1.1 eq. CDI, 0.3 eq. DMAP, 1.2 eq. SNAC, THF, 18h, RT; ix) 2.5 eq. TiCl₄, DCM, 6h.

Die Einführung der Seitenkette sollte je nach Funktionalisierung über drei verschiedene Syntheserouten verlaufen, um zu den *tert.*-Butylmalonaten **107**, **120**, **124**, **132-137**, **152**, **162** als Schlüsselintermediat zu gelangen. Zwei Routen verlaufen dabei über die Bildung von alkylierten Meldrums Säurederivaten **117**, **119**, **123**, **126-131**, **156**, **161**, welche anschließend in die *tert.*-Butylmalonate **107**, **120**, **124**, **132-137** überführt werden. Die reduktive Alkylierung von Meldrums Säure zu den alkylierten Derivaten **126-131** nach D. M. Hrubowchak *et al.*^[190] ist äußerst zuverlässig und eignet sich hervorragend für die Synthese von kurz oder langkettigen gesättigten Aldehyden. Nicht geeignet für die reduktive Alkylierung sind

hingegen α,β -ungesättigte Aldehyde, Aldehyde mit einer anspruchsvollen sterischen Gruppe (z.B. Pivaloylaldehyd) oder Methylgruppen in direkter Nachbarschaft zum Aldehyd (*iso*-Butyraldehyd), sowie Aldehyde mit redoxlabilen funktionellen Gruppen. Generell lässt sich auch jeder Malonsäuredimethylester nach Verseifung mit Lithiumhydroxid in die Meldrums Säurederivate **117**, **119**, **123**, **161** überführen. Problematisch erweist sich die Überführung der Meldrums Säurederivate in Gegenwart von *tert.*-Butanol zu den *tert.*-Butylmalonate **107**, **120**, **124**, **132-137**, **152**, **162**. Damit die Reaktion in guten Ausbeuten erfolgen kann, muss das Reaktionsgemisch bei 90°C für 6 h gerührt werden. Höhere Temperaturen sind nicht zu empfehlen, da sich Meldrums Säure ab Temperaturen von >100°C beginnt zu zersetzen. Dies erweist sich als äußerst problematisch für Verbindungen, die elektronenziehende Gruppen in β - oder γ -Position zur CH-aziden Position der Meldrums Säure besitzen, da bei diesen Temperaturen Eliminierungen auftreten.

Um dieses Problem zu umgehen, kann man ausgehend von den freien Cyanoethylmalonsäurederivat **160** nach der Prozedur von L. J. Mathias *et al.*^[197] das *tert.*-Butylmalonat **162** direkt, aber zum Teil in bescheidenen Ausbeuten, erhalten. Alternativ kann man auch *tert.*-Butylmalonsäuremethylester **110** alkylieren. Nach der Trennung von mono und dialkyliertem Produkt **151**, kann selektiv mit Lithiumhydroxid der Methylester abgespalten werden, um das *tert.*-Butylmalonat **152** zu erhalten. Die Thioveresterung mit CDI und DMAP ist die robusteste Methode, um die *tert.*-Butylmalonsäure-SNAC-ester **108**, **121**, **125**, **138-143**, **153**, **163** zu erhalten. Die Ausbeuten schwanken jedoch sehr stark zwischen den unterschiedlich substituierten Malonaten.

Die Umsetzung *tert.*-Butylmalonsäure-SNAC-ester mittels TiCl_4 ist äußerst effektiv. Jedoch toleriert diese Methode keine Cyanide als funktionelle Gruppe. Sobald die Umsetzung vollständig ist, muss darauf geachtet werden, dass das Produkt stets im basischen Milieu gehandhabt wird. Beim Aufkonzentrieren ist darauf zu achten, dass nur die flüchtigen Lösemittel wie DCM oder MeOH, bei einer Wasserbadtemperatur von max. 30°C evaporiert werden. Das weitere Evaporieren von Wasser bei dieser Temperatur führt zur Zersetzung des Produktes. Um das Produkt in den Fütterungspuffer zu überführen, muss das verbleibende Wasser mittels Gefriertrocknung fast vollständig entfernt werden, bevor der Rückstand mit Fütterungspuffer verdünnt werden kann.

Derzeit sind Verbindungen **109**, **144-150** präparativ zugänglich und nutzbar. Dabei handelt es sich mit Ausnahme von Propargyl-MSNAC (**109**) und Allyl-MSNAC (**144**), nur um gesättigte Alkylreste, mit denen man die Substratspezifität der AT-Varianten testen kann. Verbindungen **145-150** bieten keine weitere Möglichkeit das spätere Naturstoffderivat selektiv zu modifizieren. Die Reaktionen sind robust und können problemlos in der Größenordnung von 20 g bis 50 g gefahren werden. In Abbildung 28 sind die Verbindungen mit der Gesamtausbeute dargestellt. Diese Verbindungen wurden im weiteren Verlauf für

Ergebnisse und Diskussion

Fütterungsexperimente eingesetzt. Mit Verbindungen Allyl-MSNAC (**144**) und Propargyl-MSNAC (**109**) erlaubt diese Syntheseroute zwei SNAC-aktivierte Malonsäurederivate in präparativ nutzbaren Maßstab zu synthetisieren, mit denen später regioselektive Chemie betrieben werden kann.

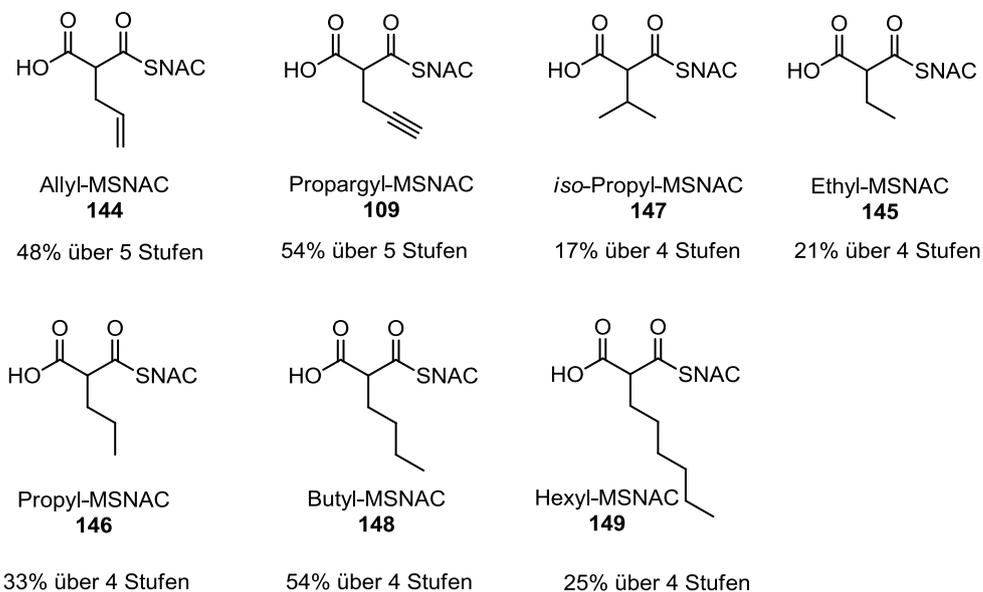


Abbildung 28: Verbindungen **109**, **144-149** unter Angabe der Gesamtausbeuten. Diese Verbindungen wurden in Fütterungsexperimenten eingesetzt.

4.7.3 Screening der Mutantenbibliothek auf Substratpromiskuität

Die im folgenden Kapitel beschriebenen Ergebnisse wurden zusammen mit Dr. U. Sundermann und in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. E. Sanchez-Garcia erarbeitet. Teile dieser Ergebnisse wurden in der Dissertation von Dr. U. Sundermann^[76] und in *ACS Chemical Biology* 2013 veröffentlicht.^[169]

Die Substrat- und Stereoselektivität von PKS ist sehr hoch. Dies wird dadurch illustriert, dass eine Verbindung wie Erythromycin zehn stereogene Zentren im Polyketid-Kern besitzt, von den 2^{10} theoretisch vorstellbaren Stereoisomeren, wird jedoch nur eins gefunden. Vor allem trifft dies auf AT-Domänen zu, die zwischen MMCoA und MCoA als natürliche Substrate unterscheiden müssen. Jedoch kann die Akzeptanz gegenüber nicht-nativen Malonsäurederivaten, nicht vollständig ausgeschlossen werden. In Experimenten mit dem isolierten Modul 6 der DEBS, konnten Koryakina *et al.* eine gewisse Substratpromiskuität der AT-Domäne für nicht-native CoA-Malonsäuren nachweisen.^[170] In unseren Experimenten mit dem nativen Erythromycinproduzenten *S. erythraea* hingegen konnte *in vivo* kein Einbau an

nicht-nativen Malonsäurederivaten beobachtet werden. Derzeit ist die Substratkonzentration die benötigt wird, um einen Einbau in ein Polyketid zu erzwingen zu hoch, als dass solche Konzentrationen *in vivo* erreicht werden könnten. Dies erfordert AT-Domänen dahingehend zu mutieren, dass die Affinität für nicht-native Malonate verbessert bzw. der Substratspezifität relaxiert wird. Basierend auf Sequenz- und Strukturvergleiche bereits untersuchter AT konnte Dr. U. Sundermann in der AT6_{DEBS} 14 Aminosäuren identifizieren, die möglicherweise Einfluss auf die Substratspezifität haben.^[76] Mittels Sequenz-funktionsbeziehungen sollten die verschiedenen Aminosäuren auf ihre Bedeutung bezüglich der Substratspezifität untersucht werden. Dazu wurde mittels Sättigungsmutagenese jede dieser 14 identifizierten Aminosäuren zu allen verbleibenden 19 proteinogenen Aminosäuren mutiert und der Einfluss dieser Reste auf die Substratspezifität untersucht. Folglich mussten insgesamt 266 Enzymvarianten erzeugt und getestet werden. Die durch Mutagenese im Folgenden untersuchte Acyltransferase liegt im letzten Modul von DEBS und wird im folgenden AT6_{DEBS} genannt. Die 266 AT6_{DEBS}-Varianten sowie der Wildtyp, wurden von Dr. U. Sundermann mit 10 mM Propargyl-MSNAC (**109**) kultiviert. Die Ethylacetatextrakte jeder einzelnen Fermentation wurden mittels HPLC/ESI-MS untersucht und analysiert. Die Analyse aller 266 AT6_{DEBS}-Varianten konnte keinen Einbau von Propargyl-MSNAC bestätigen. Dieses Resultat führte zu dem Entschluss, dass möglicherweise nicht die essentiellen Aminosäuren identifiziert wurden, welche für die Substratspezifität verantwortlich waren.

4.7.3.1 Betrachtung des Modells der AT6_{DEBS}-Region und Generierung der V295A-Variante

Basierend auf den 266 Enzymvarianten konnte ein AT6_{DEBS}•••MMCoA-Modell generiert werden.^[76, 169] In diesem Modell wird deutlich, dass der Rest V295 die Größe des Substrates am C-2 des MMCoA limitiert (Abbildung 29). Dieser Rest korrelierte in den Sequenzvergleichen nicht mit der Substratspezifität. Abbildung 29 zeigt, dass V295 sich in räumlicher Nähe der Methylengruppe des MMCoA befindet. Dies legt die Vermutung nahe, dass Propargyl-MSNAC nicht akzeptiert werden kann, da die Kavität, die die Länge der Alkylseitenkette kontrolliert, durch das V295 in seiner räumlichen Ausdehnung begrenzt wird. Basierend auf diesen Ergebnissen, wurden die AT6_{DEBS}-Varianten V295A, V295G und V295L erzeugt. Durch den geringeren sterischen Anspruch der eingeführten Reste sollte genügend Platz erzeugt werden, damit Propargyl-MSNAC als Substrat akzeptiert wird.

PyMOL For evaluation only.
Contact sales@schrodinger.com.

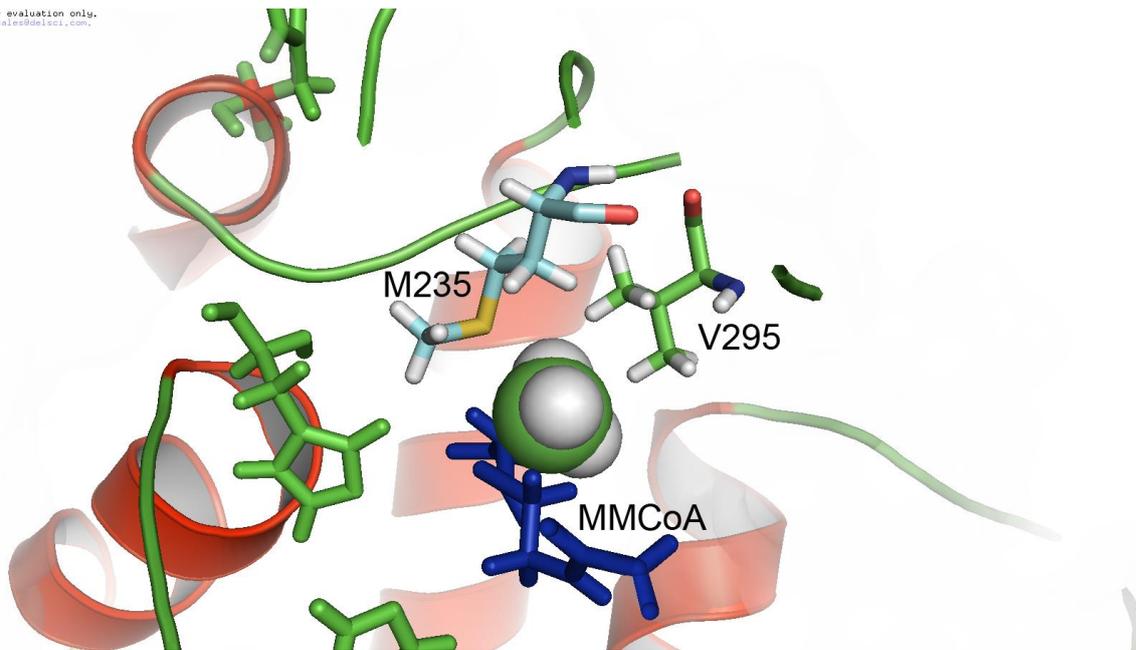


Abbildung 29: Modell der AT6_{DEBS} Region mit gebundenem MMCoA. Die Aminosäure V295 limitiert die Größe der Malonsäureseitenkette. MMCoA ist in blau dargestellt und die Methylgruppe als Kugelmodell um den Platzbedarf zu veranschaulichen. Aminosäuren mit direktem Kontakt zur Seitenkette des Malonsäurebausteins sind hervorgehoben. M235 schirmt die Region des aktiven Zentrums ab, die von (*R*)-MMCoA eingenommen werden würde, es könnte sich also hierbei um den Stereoselektivitätsfilter handeln. V295A ist der in dieser Arbeit herausgearbeitete Rest. Die Verringerung des sterischen Anspruchs an dieser Position erhöht die Flexibilität des aktiven Zentrums und erlaubt eine signifikante Substratpromiskuität.

In Anwesenheit von 10 mM Propargyl-MSNAC wurden je vier Transkonjuganten der AT6_{DEBS}-Varianten V295G, V295A und V295L fermentiert. Die Ethylacetatextrakte wurden mittels HPLC/ESI-MS analysiert. Die V295G-Variante zeigte weder Erythromycin A-Produktion noch die Bildung des Propargylerythromycin. Bei der V295L-Variante konnte die Bildung von Erythromycin A weiterhin beobachtet werden. Die Produktionslevel an Erythromycin sind verglichen mit dem Wildtypproduzenten stark reduziert und auch hier wurde der Einbau von Propargylerythromycin nicht beobachtet. Neben der Produktion von Erythromycin A lieferte die Variante V295A das gesuchte Signal von propargyliertem Erythromycin mit einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 758 [M+H]⁺ (Abbildung 30).

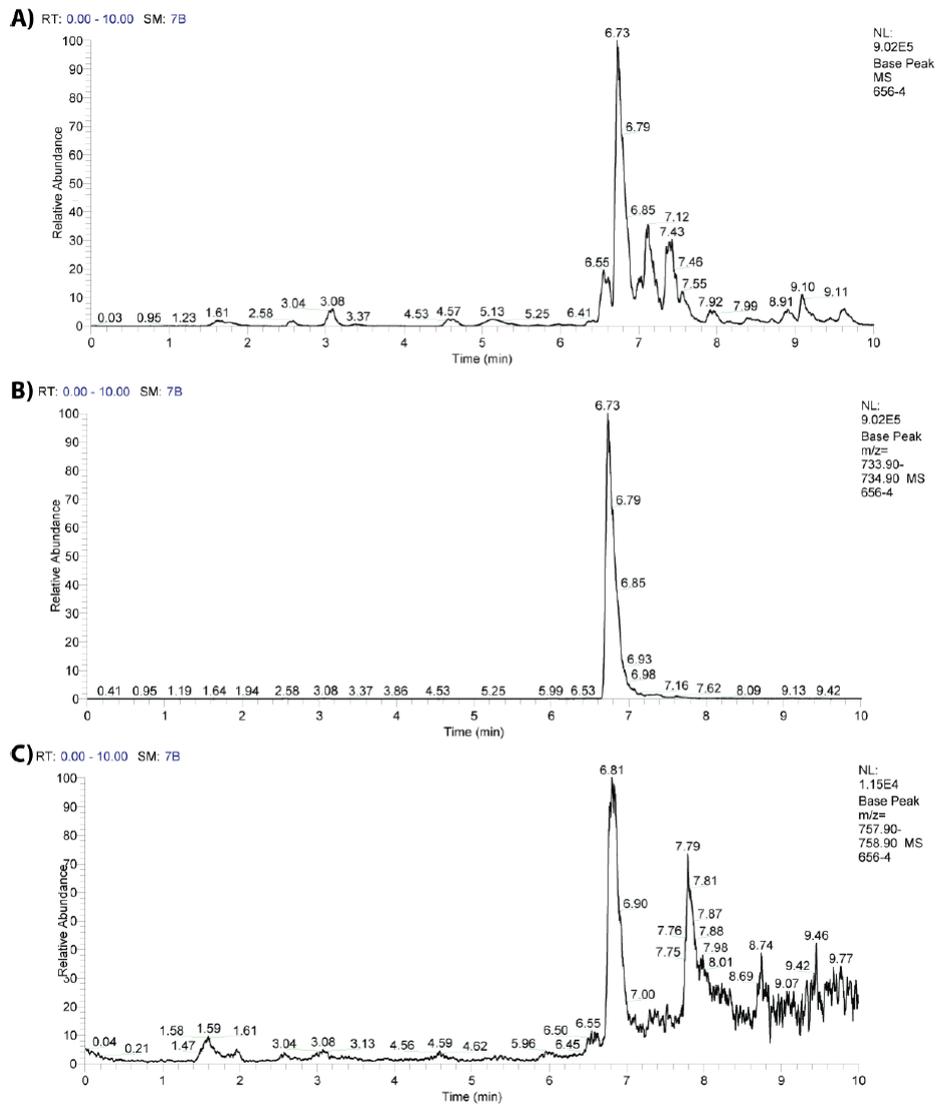
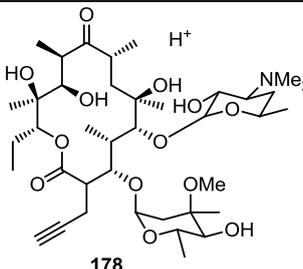


Abbildung 30: HPLC Chromatogramm des Ethylacetatextrakt der V295A-Variante nach Fütterung von Propargyl-MSNAC. **A** Base Peak; **B** Massenspur 733,9-734,9 (Erythromycin A $m/z = 734 [M+H]^+$); **C** Massenspur 757,0-758,9 (Propargylerythromycin A (**178**) $m/z = 758 [M+H]^+$). Abbildung stammt aus der Dissertation von Dr. U.Sundermann S. 103.^[76]

Aus Abbildung 30 wird ersichtlich, dass das Propargylerythromycin mit Erythromycin A coeluiert. Die Singnalintensität ist dabei um das 1,5-fache schwächer, als die des Erythromycin A-Signals. Um sicher zustellen, dass das Signal mit der m/z von 758 wirklich Propargylerythromycin ist, wurden zusätzliche ESI-MS/MS Untersuchungen durchgeführt und die akkurate Masse mittels HRMS bestimmt. Die Fragmentierungsmuster der ESI-MS/MS-Untersuchung sind in Tabelle 7 wiedergegeben.

Tabelle 7: MS/MS-Fragmentierung von 2-Propargylerythromycin:

| 2-Propargylerythromycin | Fragment | Theor. berechnet | Exp. gefunden |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------|---------------|
|  | $C_{39}H_{68}NO_{13}^+$ | 758,46852 | 758,46822 |
| | $C_{39}H_{66}NO_{12}^+$ | 740,45795 | 740,48 |
| | $C_{39}H_{64}NO_{11}^+$ | 722,44739 | 722,34 |
| | $C_{31}H_{54}NO_{10}^+$ | 600,37422 | 600,44 |
| | $C_{31}H_{50}NO_8^+$ | 582,36366 | 582,29 |
| | $C_{31}H_{52}NO_9^+$ | 564,35309 | 564,34 |
| | $C_{31}H_{48}NO_7^+$ | 546,34253 | 546,34 |
| | $C_{28}H_{42}NO_6^+$ | 488,30066 | 488,37 |

Das Fragmentierungsmuster des Propargylerythromycin stimmt mit dem von Erythromycin A abgeleiteten Fragmentierungsmuster überein (Kap.13.1.1).^[212] Die Analysen der HRMS ergaben ein Masse-zu-Ladungsverhältnis von 758,4685 mit einem Fehler von -0,395 ppm zum theoretisch ermittelten Verhältnis.

Derzeit gelingt es jedoch nur, dass Propargylerythromycin in analytischen Mengen zu erhalten. Unter Annahme einer ähnlichen Ionisierungsfähigkeit von Propargylerythromycin in der ESI-MS, wie bei Erythromycin, kann die Produktivität für 2-Propargylerythromycin aus den Integralen der Signale abgeschätzt werden. Der *S. erythraea* Wildtyp produziert unter den eingesetzten Bedingungen ~ 10 mg/l Erythromycin. Die V295A-Variante liefert zwischen 10% und 50% dieser Menge. Propargylerythromycin könnte entsprechend in Mengen von 0.07 mg/l bis 0.33 mg/l vorliegen.

4.7.3.2 Diskussion und Ausblick

Es konnte erstmalig die Akzeptanz eines nicht-nativen Substrates durch eine mutierte AT-Domäne innerhalb einer PKS erreicht werden. Auch wenn die V295A-Variante Erythromycin A als Hauptprodukt produziert, konnte gezeigt werden, dass durch den gezielten Aminosäureaustausch an einer für die Substratspezifität kritischen Stelle, die Substratspezifität geändert werden kann. Damit bietet die V295A-Variante einen guten Ausgangspunkt zur weiteren Untersuchung der Substratflexibilität. Des Weiteren ermöglichen detaillierte Computersimulationen ein besseres Verständnis der Interaktionen des Enzyms mit dem Substrat. Im Verlauf des folgenden Kapitels wird auf die erweiterte Substratflexibilität eingegangen.

4.7.4 Substratpromiskuität der V295-Varianten

Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse sind in Zusammenarbeit mit K. Koopmans und K. Bravo-Rodriguez aus dem Arbeitskreis von Dr. Elsa Sanchez-Garcia entstanden.

Um eine rationalisierte Synthese neuer Erythromycinderivate zu ermöglichen, wird die Substratspezifität der AT6_{DEBS} V295A-Variante auf molekularer Ebene untersucht. Dazu wurden verschiedene Malonsäurederivate synthetisiert, die sich in Kettenlänge und Substitutionsmuster, sowie im sterischen Anspruch unterscheiden. Das „Screening“ wurde sowohl *in silico*, als auch *in vivo* durchgeführt, um einen Einblick in die Substraterkennung der AT6_{DEBS} V295A zu bekommen.

4.7.4.1 Ergebnisse und Diskussion

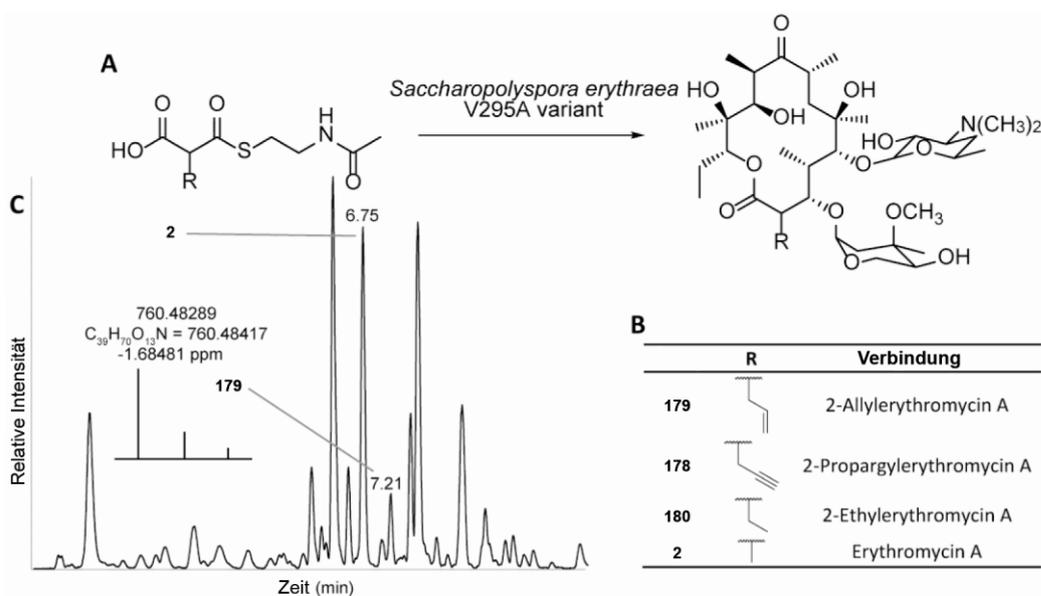
Der Fokus lag darauf herauszufinden, ob Mutationen im katalytischen Zentrum mit unterschiedlichem sterischen Anspruch die Substratspezifität auf einer breiten Ebene absenken. Zusätzlich sollen *in silico* Simulationen das Verständnis über die Substraterkennungsmechanismen der AT6_{DEBS} verbessern. Dazu wurde ein Substratprofil-Screening durchgeführt mit verschiedenen SNAC-aktivierten Malonsäurederivaten, die sich in Kettenlänge und struktureller Flexibilität unterscheiden. Das Verständnis über die Substraterkennung, unter biosynthetischen Aspekten ist wichtig. Bedingt durch die Größe der PKS können etablierte Methoden, wie die Zufallsmutagenese zur Generierung neuartiger Mutanten, nicht angewendet werden.^[213-215] Zudem erschwert die Größe und Flexibilität dieser Multienzymkomplexe derzeit eine genaue und detaillierte Struktur zu bekommen,^[216-218] was die Relevanz solcher *in silico* Studien in diesem Feld hervorhebt.

4.7.4.2 Fütterungsexperimente

Neben der AT6_{DEBS}-V295A-Variante wurden zusätzlich die Varianten-V295L und V295G von *S. erythraea* NRRL B-24071 in den Fütterungsexperimenten getestet. Wie oben beschrieben (Kapitel 4.7.3.1), ist die Variante-V295A in der Lage Propargylerythromycin zu produzieren, wenn Propyl-MSNAC dem Fermentationsmedium zugegeben wird. Unter den gleichen Bedingungen produziert die Variante-V295L nur Erythromycin A und bei der Variante-V295G konnte keine Erythromycin A-Produktion beobachtet werden. Um herauszufinden, ob diese Mutanten auch andere Substrate akzeptieren als Propargyl-MSNAC, wurden Fütterungsexperimente mit Allyl-, Ethyl-, Propyl-, *iso*-Propyl, Butyl-, Hexyl- und Phenyl-MSNAC durchgeführt. Jedes Experiment wurde mit mindestens vier unabhängigen Klonen

Ergebnisse und Diskussion

durchgeführt. Zu den Fermentationsmedien der Zellkulturen wurden die nicht-nativen Malonate in Konzentrationen von 10-50 mM hinzugefügt. Jedes Fermentationsextrakt wurde mittels HPLC/ESI-MS analysiert. Die AT6_{DEBS}-Variante-V295G zeigte keine Produktion von Erythromycin A oder anderen Derivaten. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte die AT6_{DEBS}-Variante-V295L eine verminderte Produktion von Erythromycin A. Neue Erythromycin-derivate konnten nicht beobachtet werden, wenn zu dieser Variante nicht-native Malonate zugegeben wurden. Fütterungsexperimente des Wildtyps mit Allyl-, Ethyl-, Propyl-, *iso*-Propyl, Butyl-, Hexyl- und Phenyl-MSNAC zeigten keine Bildung neuer Erythromycinderivate in einen getesteten Konzentrationsbereich von 10-50 mM. Fütterungen mit Phenyl-MSNAC führten zu vermindertem Zellwachstum und waren toxisch für *S. erythraea*. Die Fütterung der Malonsäurederivate zu der AT6_{DEBS}-Variante-V295A führte zur Bildung zweier neuer Erythromycinderivate. Der Einbau wurde durch HRMS und MS/MS Experimente bestätigt (Tabelle 8, Tabelle 9, Tabelle 10). Bei den neuen Derivaten handelt es sich um das 2-Ethylerythromycin und das 2-Allylerythromycin.



Schema 60: Ergebnisse der Fütterungsexperimente von *S. erythraea* B-24071 AT6_{DEBS}-V295A. **A:** Allgemeines Schema der experimentellen Durchführung. Propargyl-MSNAC, Allyl-MSNAC und Ethyl-MSNAC wurden zu *S. erythraea* gegeben um die Erythromycinderivate **178-180** zu erhalten (siehe Schema **B**). **C:** LC-ESI-MS TIC eines Fermentationsextraktes von einer Zellkultur, die mit Verbindung **144** versetzt wurde, zusammen mit den HRMS-Ergebnissen. Schema **C** zeigt das Allylerythromycin (**179**) neben Erythromycin A.

Tabelle 8: MS/MS-Fragmentierung von 2-Allylerythromycin.

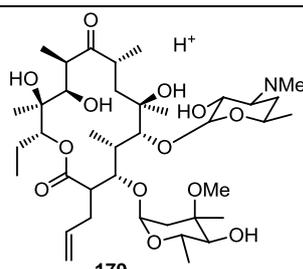
| 2-Allylerythromycin | Fragment | Theor. berechnet | Exp. gefunden |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------|---------------|
|  179 | $C_{39}H_{70}NO_{13}^+$ | 760,48417 | 760,64 |
| | $C_{39}H_{68}NO_{12}^+$ | 742,47360 | 742,50 |
| | $C_{39}H_{66}NO_{11}^+$ | 724,46304 | 724,55 |
| | $C_{31}H_{56}NO_{10}^+$ | 602,38987 | 600,52 |
| | $C_{31}H_{54}NO_9^+$ | 584,37931 | 584,48 |
| | $C_{31}H_{52}NO_8^+$ | 566,36874 | 566,48 |
| | $C_{31}H_{50}NO_7^+$ | 548,35818 | 548,40 |
| | $C_{28}H_{44}NO_6^+$ | 490,31631 | 490,46 |

Tabelle 9: MS/MS-Fragmentierung von 2-Ethylerythromycin.

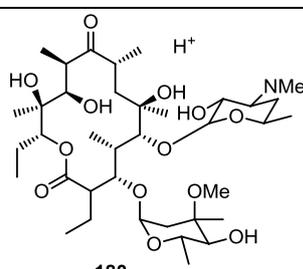
| 2-Ethylerythromycin | Fragment | Theor. berechnet | Exp. gefunden |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------|---------------|
|  180 | $C_{38}H_{70}NO_{13}^+$ | 748,48417 | 748,57 |
| | $C_{38}H_{68}NO_{12}^+$ | 730,47360 | 730,50 |
| | $C_{38}H_{66}NO_{11}^+$ | 712,46304 | 712,42 |
| | $C_{30}H_{56}NO_{10}^+$ | 590,38987 | 590,47 |
| | $C_{30}H_{54}NO_9^+$ | 572,37931 | 572,40 |
| | $C_{30}H_{52}NO_8^+$ | 554,36874 | 554,37 |
| | $C_{30}H_{50}NO_7^+$ | 536,35818 | 536,42 |
| | $C_{27}H_{44}NO_6^+$ | 478,31631 | 478,28 |

Tabelle 10: HRMS-Ergebnisse von Allylerythromycin und Ethylerythromycin.

| Verbindung | Theor. berechnet | Exp. gefunden |
|-------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Allylerythromycin | 760,48417 [M+H] ⁺ | 760,4828 [M+H] ⁺ |
| Ethylerythromycin | 748,48417 [M+H] ⁺ | 748,4845 [M+H] ⁺ |

Varianten, die mit Konzentrationen von 50 mM gefüttert wurden, zeigten keinerlei Polyketidproduktion. In den meisten Fällen konnte sogar kein Bakterienwachstum mehr beobachtet werden. Bei Konzentration von 30-40 mM aller getesteten Malonsäurederivate war das Produktionsniveau der Varianten stark vermindert. Der effizienteste Einbau jedes Malonsäurederivats konnte bei Konzentrationen von 10-20 mM beobachtet werden. Dieser konzentrationsabhängige Effekt war unerwartet, da synthetisiertes M-MSNAC keine Toxizität oder irgendeinen anderen negativen Effekt in einen Konzentrationsbereich von 10-50 mM zeigte. Diese Beobachtung zog sich reproduzierbar durch verschiedene „Batches“ der synthetischen Bausteine und über verschiedene voneinander unabhängige Klone. Kontrollexperimente mit freier Propargylmalonsäure und SNAC hatte eine verminderte

Ergebnisse und Diskussion

Produktion von Erythromycin zur Folge. Im Falle von freiem SNAC fiel das Produktionsniveau ab Konzentrationen von 30 mM rapide (Abbildung 31).

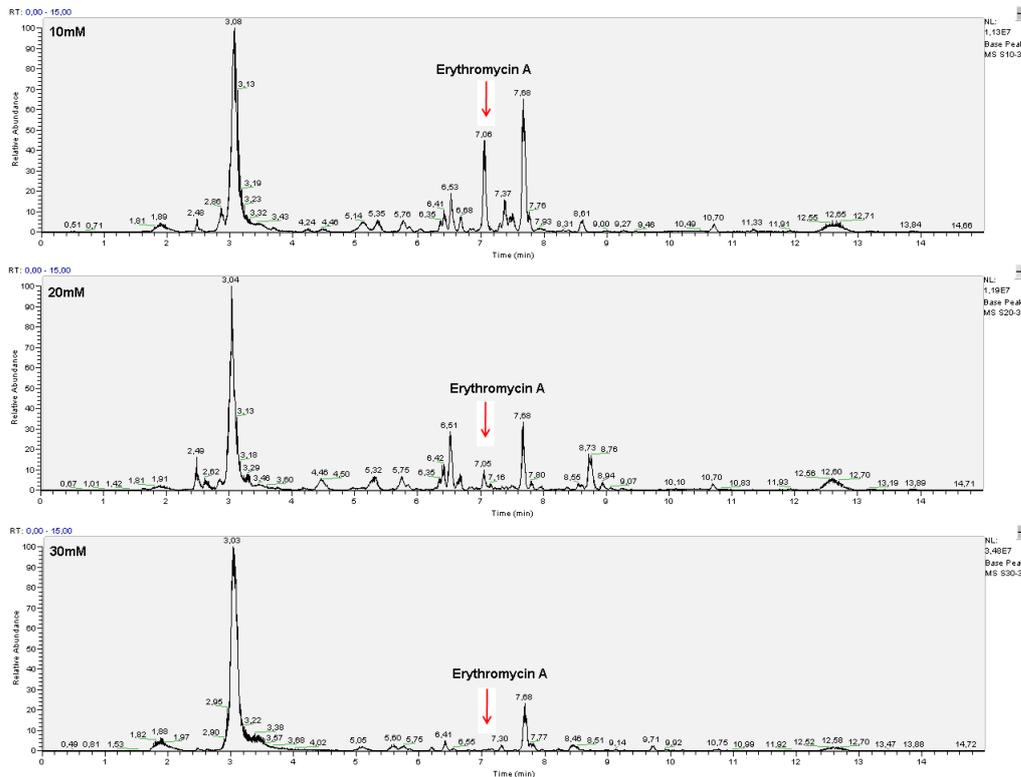


Abbildung 31: Chromatogramm der Fermentationsextrakte der SNAC-Fütterung. Es wurden jeweils Konzentrationen von 10 mM, 20 mM und 30 mM gefüttert. Es ist eine Abnahme der Erythromycin-A-Produktion bei steigender SNAC-Konzentration zu erkennen.

Diese Ergebnisse limitieren die Möglichkeit, die Ausbeute an Polyketidderivaten, durch einfache Erhöhung der Konzentration an Malonsäurederivaten in dem Fermentationsmedium, zu steigern. Stattdessen muss der apparente K_M -Wert der Malonsäurederivate so gering wie möglich gehalten werden, sodass ein effizienter Einbau gewährleistet werden kann. Dies soll bei möglichst niedrigen intrazellulären Konzentrationen der Malonsäurederivate erfolgen. Andererseits muss auf molekularbiologischer Ebene die Substratspezifität der AT6_{DEBS} zugunsten der nicht-nativen Malonate verschoben werden, um die Bildung von Nebenprodukten durch den Einbau von MMCoA zu minimieren. Dies bedarf weiterer *enzymeengineering* Experimente.

4.7.4.3 *In silico* Versuche

Die im folgenden Kapitel beschriebenen Resultate sind Ergebnisse der *in silico* Versuche von K. Bravo-Rodriguez aus dem Arbeitskreis von Dr. Elsa Sanchez-Garcia. Sie werden an dieser Stelle im Kontext der Experimente kurz diskutiert.

4.7.4.4 Modellierung der AT6_{DEBS} mit nicht-nativen Substraten

Die Substrate Et-MCoA, *iso*-Propyl-MSNAC, Hexyl-MSNAC, Allyl-MSNAC, Propargyl-MSNAC und Phenyl-MSNAC wurden in MD-Simulationen getestet. Alle diese Moleküle wurden mit der (*S*)-Konfiguration an ihrem chiralen C-Atom der Malonylregion modelliert.

Die folgenden Momentaufnahmen zeigen exemplarisch die räumlichen Orientierungen, die die Substrate in dem katalytisch aktiven Zentrum einnehmen. Zusehen sind die Anordnungen von Allyl-MSNAC und Propargyl-MSNAC, dessen Einbau sowohl theoretisch vorhergesagt, als auch experimentell bestätigt wurde (Abbildung 32).

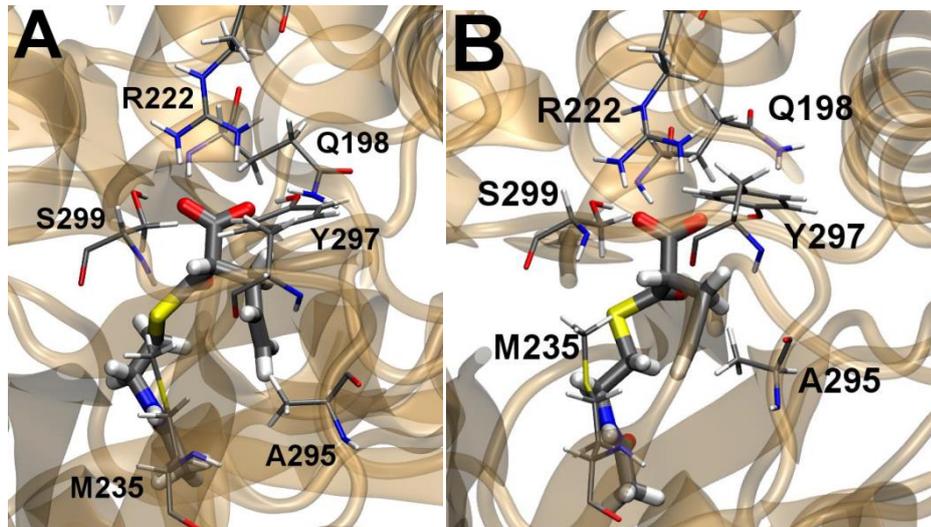


Abbildung 32: **A:** Die Allyl-Seitenkette nimmt eine Position unterhalb von A295 an. **B:** Richtige Positionierung von Propargyl-MSNAC im aktiven Zentrum der AT6_{DEBS}-V295A-Variante. Aminosäuren mit direktem Kontakt zur Seitenkette des Malonsäurebausteins sind hervorgehoben, außerdem ist R222 markiert, welches eine Salzbrücke zur Carboxylgruppe des Malonats aufbaut. Q198 wurde einer Sättigungsmutagenese unterzogen, keine der Mutationen war für die Erweiterung des Substratspektrums im hier untersuchten Rahmen relevant. Y297 und S299 sind in MMCoA spezifischen AT-Domänen konservierte Reste. Einzelmutationen an diesen Aminosäuren können die Spezifität zu MCoA verschieben, jedoch nicht die Akzeptanz größerer Bausteine fördern. M235 schirmt die Region des aktiven Zentrums ab, die von (*R*)-MMCoA eingenommen werden würde, es könnte sich also hierbei um den Stereoselektivitätsfilter handeln. V295A ist der in dieser Arbeit herausgearbeitete Rest. Die Verringerung des sterischen Anspruchs an dieser Position erhöht die Flexibilität des aktiven Zentrums und erlaubt eine signifikante Substratpromiskuität.

K. Bravo-Rodriguez konnte zeigen, dass die Erhöhung der Flexibilität in V295A wichtig für den Einbau von Allyl-MSNAC und Propargyl-MSNAC ist. Die MD-Simulationen zeigten, dass A295 Konformationen annehmen kann, die für V295 nicht möglich sind und somit den Einbau von Allyl-MSNAC und Propargyl-MSNAC fördern. Des Weiteren wurde der Einbau von Phenyl-MSNAC modelliert. Im Fall von Phenyl-MSNAC kann der aromatische Ring von der aktiven Tasche akzeptiert werden. Jedoch wurde experimentell festgestellt, dass Phenyl-

Ergebnisse und Diskussion

MSNAC sowohl für die Varianten als auch für den Wildtypstamm toxisch ist. In den meisten Fällen wurde die Erythromycinbiosynthese komplett eingestellt und die Bakterien zeigten vermindertes Zellwachstum. Damit konnte die Akzeptanz von Phenyl-MSNAC experimentell nicht nachgewiesen werden.

4.7.4.5 Vergleich der Fütterungs- und Modellierungsergebnisse

Die Ergebnisse der Fütterungsexperimente stimmen sehr gut mit den theoretischen Berechnungen überein. Gemäß dem *in silico* Ergebnissen können neben Propargyl-MSNAC auch Allyl-, Ethyl- und Phenyl-MSNAC von der AT6_{DEBS} V295A-Variante akzeptiert werden. Die Fütterungsexperimente führten zu der Bildung von 2-Ethyl- und 2-Allylerythromycin A und bestätigten somit die Akzeptanz von Allyl- und Ethyl-MSNAC als Substrate der AT6_{DEBS}-V295A. Da Phenyl-MSNAC toxisch für *S. erythraea* ist, konnte der *in vivo* Einbau nicht untersucht werden. Des Weiteren konnte der Einbau von *iso*-Propyl-MSNAC und Hexyl-MSNAC, in Übereinstimmung mit dem *in silico* Vorhersagen, experimentell nicht bestätigt werden.

4.7.4.6 Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass eine Punktmutation (V295A) eine signifikante Substratrelaxation in der Selektivität der AT6_{DEBS} verursacht. Die mutierte AT6_{DEBS} kann verschiedene neue Substrate akzeptieren, die sich in dem Sättigungsgrad der Malonylseitenkette unterscheiden. Einer der Hauptfaktoren, der den Einbau neuer Substrate kontrolliert, ist die Größe und die Flexibilität der Seitenkette. Große und sterisch anspruchsvolle Seitenketten, wie Hexyl-MSNAC und *iso*-Propyl-MSNAC, werden nicht als Substrate akzeptiert, weder von der AT6_{DEBS}, noch von den Varianten V295A, V295L oder V295G. Kürzere, rigidere und kleinere Gruppen, wie Propargyl-MSNAC und Ethyl-/Allyl-MSNAC, werden eingebaut. Die vergleichsweise niedrige Einbaurate kann mit der Tatsache erklärt werden, dass das native Substrat MMCoA, welches immer noch von der V295A-Enzymvariante akzeptiert wird, *in vivo* in wesentlich höheren Konzentrationen zu Verfügung steht. Starre Gruppen wie das Propargylmotiv nehmen innerhalb des aktiven Zentrums eine passende Orientierung ein. Kleine flexible Gruppen, wie in Ethyl-MSNAC, richten sich nach der natürlichen Orientierung der Seitenkette von MMCoA aus.

Basierend auf den *in silico* Ergebnissen kann man sagen, dass der Einbau nicht-nativer Malonate begünstigt wird, wenn folgende Punkte berücksichtigt werden:

- 1) Die Thioestergruppe des Substrates sollte nahe zu S197 ausgerichtet sein.
- 2) Die Substratseitenkette sollte zwischen M235 und V295 liegen.
- 3) R222 sollte mit der Carboxylgruppe des Substrates zur selben Zeit wie Y297 und S299 interagieren.

Somit kann rückwirkend auf die Synthese verschiedener Malonate folgende Schlussfolgerung gezogen werden. Malonsäurederivate deren Seitenkette größer als drei Kohlenstoffatome sind, werden nicht als Substrat der V295A akzeptiert, da das katalytische Zentrum nicht genügend Platz bietet. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass Butyl-MSNAC nicht als Substrat der V295A-Variante akzeptiert wird. Zum einen erhöht sich die Flexibilität der Seitenkette mit zunehmender Kettenlänge, was zu einer Abstoßung des Malonats in der aktiven Tasche führt, wie die MD-Simulationen es bei Hexyl-MSNAC zeigten. Zum anderen ist die aktive Tasche hydrophob, sodass polar substituierte Malonsäurederivate, sofern sie überhaupt in präparativen Mengen synthetisierbar sind, aufgrund fehlender Wechselwirkungen nicht akzeptieren würden.

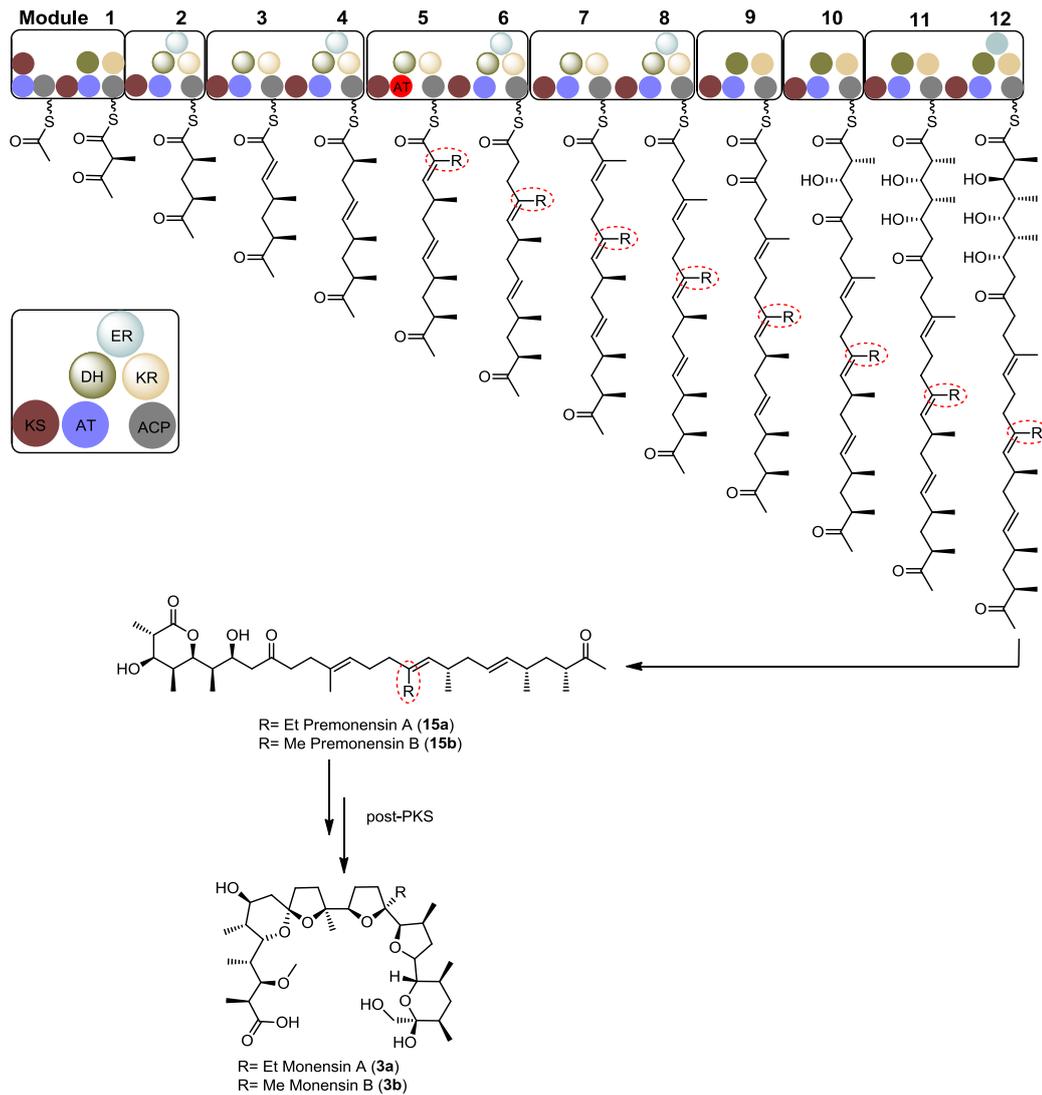
MD-Simulationen mit *iso*-Propyl-MSNAC zeigten, dass die V295A-Variante keine verzweigten Malonate akzeptiert. Die Computermodelle erlauben es auch die vor kurzem veröffentlichten Ergebnisse über den Einbau von Propargyl-MCoA durch AT6_{DEBS} unter *in vitro* Bedingungen und bei sehr hohen Substratkonzentrationen zu erklären.^[170] Die richtige Ausrichtung der Seitenkette und den Erhalt der Schlüsselinteraktionen mit dem aktiven Zentrum sind die Hauptgründe für die Substratspezifität der AT6_{DEBS} Domäne. Die Größe und die Flexibilität des Substrates beeinflussen die Möglichkeit der richtigen Orientierung der Seitenkette. Dies bedeutet im Fall für hohe Substratkonzentrationen, dass ein kleiner Anteil des Substrates die bevorzugte Konformation besitzt und somit von der AT-Domäne akzeptiert wird. Somit konnte gezeigt werden, dass die Enzym-Substratspezifität durch enzymgeleitete Mutagenese geändert werden kann, sodass durch eine einzelne Punktmutation der Einbau nicht-nativer Substrate gelang. Eine einzige Punktmutation im aktiven Zentrum des Enzyms war ausreichend, um Substratpromiskuität hervorzurufen, die es ermöglicht, dass Substrate mit einer begrenzten Seitenkettenlänge eingebaut werden, unabhängig von ihrem Sättigungsgrad. Es bedarf aber noch genauere enzymatische Studien, um signifikanten präparativen Nutzen daraus zu ziehen. Mit dieser Methode kann der Anteil an artifiziellen funktionellen Gruppen innerhalb eines Polyketides erhöht werden. Dies ermöglicht einen Zugang zur Synthese neuer komplexer Polyketidderivate. Um höhere Produktmengen von Polyketidderivaten zu erhalten, muss die Substratspezifität in Richtung des künstlichen Produktes verschoben werden. Dazu bedarf es weiterer strukturbasierter Mutagenesen.

4.8 Einbau nicht-nativer Substrate durch eine Polyketidsynthase führt zu neuen Monensin- und Premonensinderivaten

Das folgende Kapitel umfasst die Ergebnisse der Untersuchung zur Substratspezifität der Monensin-Acyltransferase 5 (AT5_{mon}). Teile davon sind in ChemBioChem 2014 veröffentlicht worden.^[219] Die für das AT5_{mon}-Modell notwendigen Computersimulationen wurden von Kenny Bravo-Rodriguez aus der Arbeitsgruppe von Dr. Elsa Sanchez-Garcia durchgeführt. Die Experimente wurden gemeinsam mit A. Ali und J. Arens durchgeführt.

4.8.1 Monensin und Premonensin

Monensin wird vom Bakterium *Streptomyces cinnamonensis* gebildet.^[220] Es ist ein Polyetherionophor und bindet eine Vielzahl an Kationen.^[221-223] Monensin weist zudem antibakterielle und antiparasitäre Wirkung auf.^[224, 225] Weiterhin wird es als weitverbreitetes Antibiotikum in der Viehzucht^[226] eingesetzt und Derivate des Monensins als ionenselektive Elektroden.^[227-229] Die Monensinbiosynthese wird in Schema 61 abgebildet. Von der AT-Domäne in Modul 5 der Monensin PKS (AT5_{mon}) ist bekannt, dass sie sowohl EtCoA als auch MMCoA akzeptiert. Durch diese natürliche Substratpromiskuität werden zwei verschiedene Derivate des Monensins erhalten (Monensin A und B).^[220, 230] Premonensin wird vom Bakterium *Streptomyces cinnamonensis* A495 gebildet.^[220] Dabei handelt es sich um ein künstliches *shunt-Produkt* der Monensinbiosynthese (Schema 61). Diesem Organismus fehlt die Fähigkeit, Premonensin, das Produkt der PKS, durch weitere post-PKS-Prozesse in das Polyetherantibiotikum Monensin zu überführen.^[220]



Schema 61: Aufbau der Monensin PKS. Die Blockierung der post-PKS-Prozessierung in *S. cinnamomensis* A495 führt zur Bildung von Premonensin (15a und 15b) A und B, während *S. cinnamomensis* durch weitere post-PKS-Prozessierung Monensin (3a und 3b) A und B produziert. Rot markiert ist die AT_{5mon}, die sowohl MMCoA, als auch EtMCoA akzeptiert.

Die natürliche Substratflexibilität legt nahe, dass die AT_{5mon} der Monensin PKS weitere, nicht-natürliche, Malonate akzeptieren könnte. Aus diesem Grund wurden alle bis dato zugänglichen Malonsäurederivate für entsprechende Fütterungsexperimente getestet. Die Fütterungen wurden in zwei unterschiedlichen Medien getestet. Zum einen handelt es sich um das BulgarianMedium^[231], was auch industriell für die Fermentation von Monensin verwendet wird, und zum anderem das Medium SM16^[230]. Die besten Fermentationsergebnisse wies das SM16-Medium auf, sodass dieses für alle weiteren Experimente verwendet wurde. Die Methanolextrakte der einzelnen Fermentationen wurden mittels HPLC-ESI-MS analysiert und zu genaueren Analyse wurden zusätzlich noch MS/MS-Analysen und HRMS-Analysen durchgeführt. Bei den so neu synthetisierten

Ergebnisse und Diskussion

Monensinderivaten handelt es sich, neben demproduzierten Monensin A und B, um Propargyl-, Allyl- und Propylmonensin (Abbildung 33).

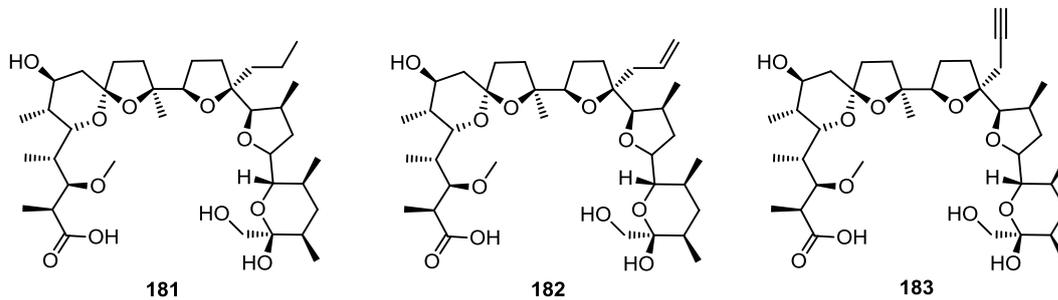


Abbildung 33: Durch vorläuferdirigierte Biosynthese erhaltene Monensinderivate, ausgehend von Propyl-, Allyl- und Propargyl-MMSNAC.

Die Fragmentierungsmuster wurden analog des bereits literaturbekannten Fragmentierungsmuster von Monensin A und B ausgewertet.^[232] Exemplarisch ist in Abbildung 34 das Chromatogramm von Propylmonensin wieder gegeben. Die Chromatogramme aller weiteren Verbindungen sind im Anhang (Kap.13.2) zu finden. Im Folgenden werden die HPLC-ESI-MS/MS und HRMS- Ergebnisse wiedergegeben.

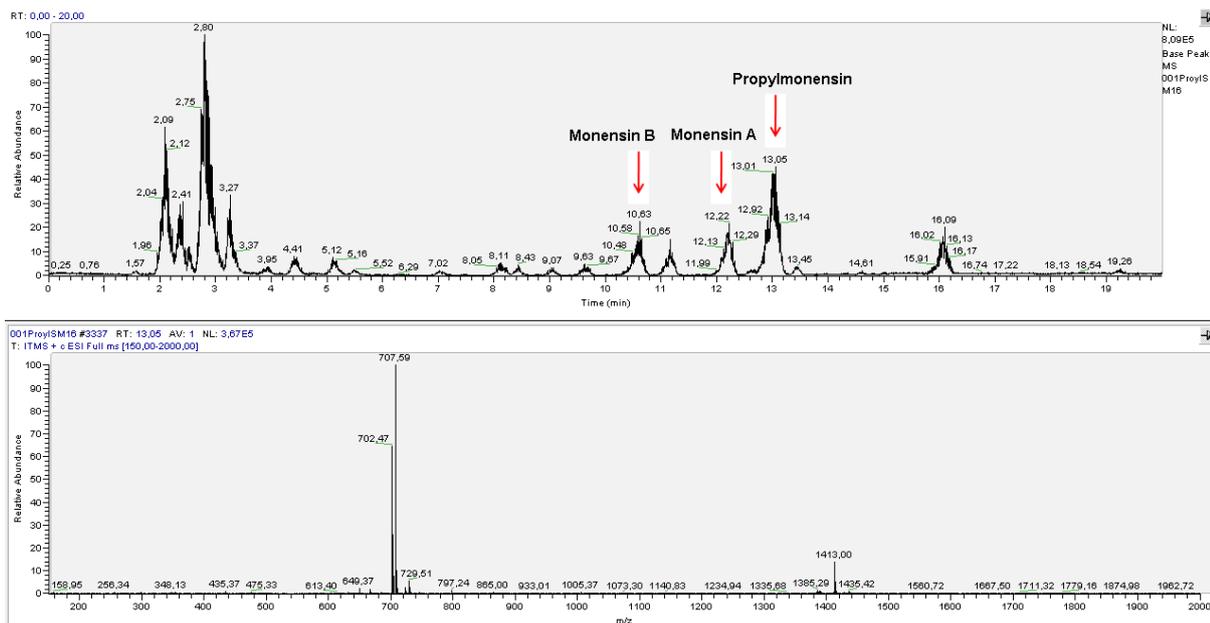
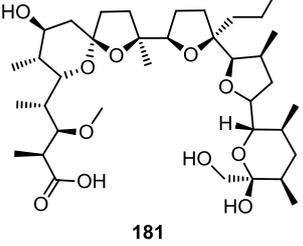
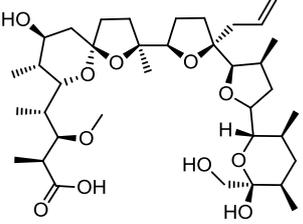


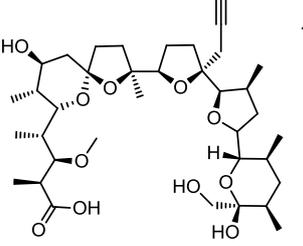
Abbildung 34: ESI-MS-Spektrum von Propylmonensin. Zusehen ist der Basepeak des Fermentationsextraktes. Die Massenspur zeigt Propylmonensin als m/z: 707 [M+Na]⁺.

Tabelle 11: MS/MS-Analyse des Propylmonensin


| Summenformel | Theor. Berechnet | Exp. gefunden |
|--------------------------|------------------|---------------|
| $C_{37}H_{64}NaO_{11}^+$ | 707,43408 | 707,53 |
| $C_{37}H_{62}NaO_{10}^+$ | 689,42352 | 689,55 |
| $C_{37}H_{60}NaO_9^+$ | 671,41295 | 671,47 |
| $C_{37}H_{58}NaO_8^+$ | 653,40239 | 653,44 |
| $C_{32}H_{54}NaO_7^+$ | 573,37618 | 537,44 |
| $C_{29}H_{46}NaO_5^+$ | 497,32375 | 497,39 |
| $C_{26}H_{44}NaO_6^+$ | 475,30301 | 475,39 |
| $C_{26}H_{42}NaO_5^+$ | 457,29245 | 457,35 |

Tabelle 12: MS/MS-Analyse des Allylmonensin


| Summenformel | Theor. Berechnet | Exp. gefunden |
|--------------------------|------------------|---------------|
| $C_{37}H_{62}NaO_{11}^+$ | 705,41843 | 705,59 |
| $C_{37}H_{58}NaO_9^+$ | 669,39730 | 669,51 |
| $C_{37}H_{56}NaO_8^+$ | 651,38674 | 651,49 |
| $C_{29}H_{44}NaO_5^+$ | 495,30810 | 495,44 |
| $C_{26}H_{42}NaO_6^+$ | 473,28736 | 473,43 |
| $C_{26}H_{40}NaO_5^+$ | 455,27680 | 455,39 |

Tabelle 13: MS/MS-Analyse des Propargylmonensin


| Summenformel | Theor. Berechnet | Exp. gefunden |
|--------------------------|------------------|---------------|
| $C_{37}H_{60}NaO_{11}^+$ | 703,40278 | 703,43 |
| $C_{37}H_{58}NaO_{10}^+$ | 685,39222 | 685,47 |
| $C_{37}H_{56}NaO_9^+$ | 667,38165 | 667,40 |
| $C_{37}H_{54}NaO_8^+$ | 649,37109 | 649,39 |
| $C_{29}H_{42}NaO_5^+$ | 493,29245 | 493,35 |
| $C_{26}H_{40}NaO_6^+$ | 471,27171 | 471,30 |
| $C_{26}H_{38}NaO_5^+$ | 453,26115 | 453,29 |

Tabelle 14: HRMS-Ergebnisse von Propylmonensin, Allylmonensin und Propargylmonensin

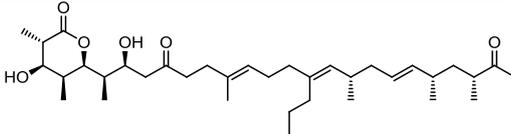
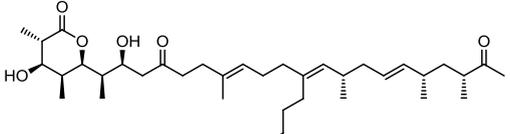
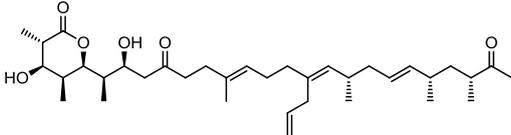
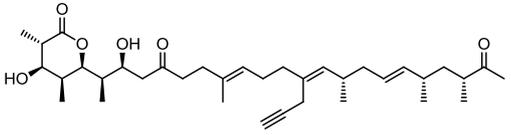
| Verbindung | Theor. berechnet | Exp. gefunden |
|-------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Propylmonensin | 703,40278 [M+Na] ⁺ , | 703,40331 [M+Na] ⁺ , |
| | 698,44739 [M+NH ₄] ⁺ , | 698,44860 [M+NH ₄] ⁺ , |
| | 663,41027 [M-(H ₂ O)+H] ⁺ | 663,41257 [M-(H ₂ O)+H] ⁺ |
| Allylmonensin | 683,43649 [M+H] ⁺ , | 683,43879 [M+H] ⁺ , |
| | 705,41843 [M+Na] ⁺ , | 705,41930 [M+Na] ⁺ , |
| | 700,46304 [M+NH ₄] ⁺ , | 700,46472 [M+NH ₄] ⁺ , |
| | 665,42592 [M-(H ₂ O)+H] ⁺ | 665,42762 [M-(H ₂ O)+H] ⁺ |
| Propargylmonensin | 685,45214 [M+H] ⁺ , | 685,45473 [M+H] ⁺ , |
| | 707,43408 [M+Na] ⁺ , | 707,43492 [M+Na] ⁺ , |
| | 702,47869 [M+NH ₄] ⁺ , | 702,48154 [M+NH ₄] ⁺ , |
| | 667,44157 [M-(H ₂ O)+H] ⁺ | 667,44342 [M-(H ₂ O)+H] ⁺ |

Um die Substratspezifität zu testen, wurde der Stamm *S.cinnamensis* A495 mit Propyl-MSNAC, Allyl-MSNAC, Propargyl-MSNAC, Butyl-MSNAC und Hexyl-MSNAC jeweils in

Ergebnisse und Diskussion

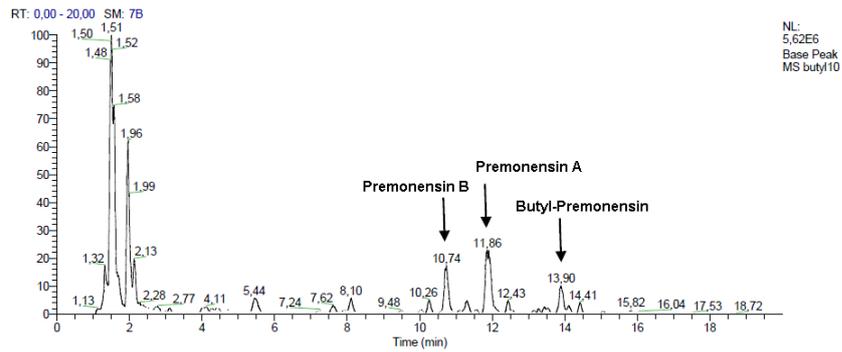
Konzentrationen von 10-30 mM gefüttert. Die Analyse der Fermentationsextrakte mittels ESI-MS und HRMS zeigte, dass vier der fünf getesteten Substanzen von der AT5_{mon} akzeptiert werden. Hexyl-MSNAC zeigte als einzige Verbindung zytotoxische Eigenschaften, da die Fermentationsextrakte keine Produktion von Premonesin A und B anzeigten. Diese Proben wurden ebenfalls für die HRMS-Analyse verwendet. Die Ergebnisse für die einzelnen Verbindungen werden in Tabelle 15 wiedergegeben.

Tabelle 15: HRMS-Ergebnisse der fermentativ erhaltenen Verbindungen.

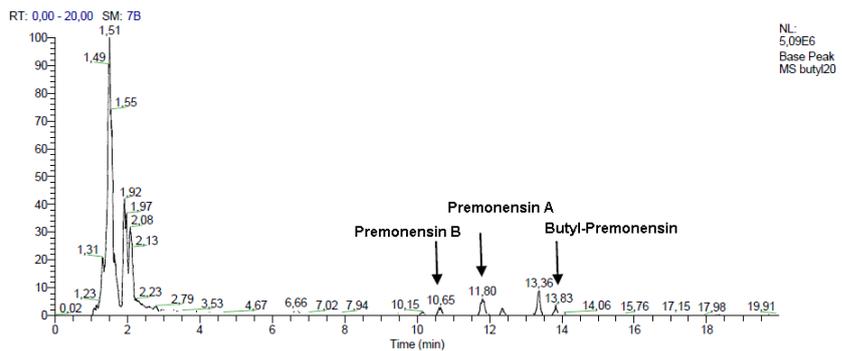
| Verbindung | Theor. berechnet | Exp. gefunden |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p>Propylpremonensin (183)</p> | 606,4728 [M+NH ₄] ⁺ | 606,4724 [M+NH ₄] ⁺ |
|  <p>Butylpremonensin (185)</p> | 603,4619 [M+H] ⁺ ; 620,4885 [M+NH ₄] ⁺ ; 625,4439 [M+Na] ⁺ | 603,4614 [M+H] ⁺ ; 620,4875 [M+NH ₄] ⁺ ; 625,4431 [M+Na] ⁺ |
|  <p>Allylpremonensin (186)</p> | 604,4572 [M+NH ₄] ⁺ | 604,4575 [M+NH ₄] ⁺ |
|  <p>Propargylpremonensin (187)</p> | 585,4150 [M+H] ⁺ ; 602,4415 [M+NH ₄] ⁺ ; 607,3969 [M+Na] ⁺ | 585,4143 [M+H] ⁺ ; 602,4411 [M+NH ₄] ⁺ ; 607,3965 [M+Na] ⁺ |

Tendenziell erfolgten bessere Einbauraten der nicht-natürlichen Malonate bei geringeren Konzentrationen. Höhere Konzentrationen dieser Malonate führen zu zelltoxischen Effekten. Dies ist anhand der Fütterung von Butyl-MSNAC sichtbar. Gefüttert wurde die Substanz in Konzentrationen von 10, 20 und 30 mM. Bei einer Konzentration von 30 mM konnte bereits kein Einbau von Butyl-MSNAC festgestellt werden (Abbildung 35).

10mM



20 mM



30mM

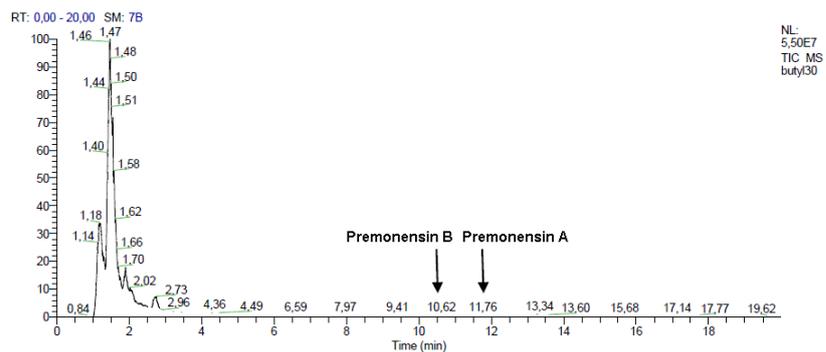


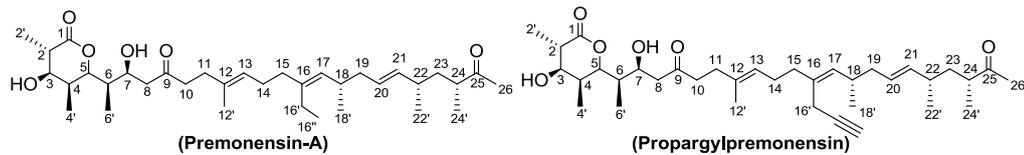
Abbildung 35: LC-ESI-MS Chromatogramme der Butyl-MSNAC Fütterung mit Konzentrationen von 10, 20 und 30 mM.

Fütterungsexperimente mit Propyl-MSNAC führten zu einer erheblichen Reduzierung der Premonensinproduktion, sodass nur Spuren des Premonensins in der LC-ESI-MS detektierbar waren. Im weiteren Verlauf wurde die Fermentation mit Propargyl-MSNAC auf 1,8 l hochskaliert, um präparative Mengen eines Polyketides zu erhalten, was eine nützliche bioorthogonale funktionelle Gruppe trägt. Die Fermentation und die damit verbundene Aufreinigung wurde von A. Ali durchgeführt. Er konnte 0,55 mg Propargylpremonensin aus einer 1,8 l Fermentation isolieren. Des Weiteren wurden 5,4 mg/l Premonensin A und 1,8 mg/l Premonensin B isoliert. Interessanter Weise führten die Zugabe der künstlichen Bausteine zu einer Inversion der Einbaueffizienz von EtMCoA und MMCoA und somit zur Produktion von Premonensin A und B. Dies wurde von A. Ali durch Kontrollfermentationen bestätigt. Bei

Ergebnisse und Diskussion

Fermentationsansätzen gleicher Größe, ohne künstliche Bausteine erhielt er 8,2 mg/l Premonensin A und 15,2 mg/l Premonensin B.

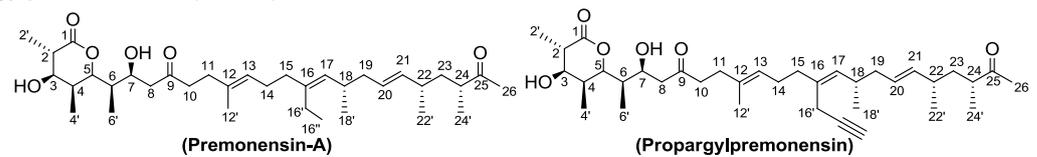
Nach der Aufreinigung des Propargylpremonensin, wurde dessen genaue Struktur mittels $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ bestätigt. Dabei diente das bereits isolierte und vollständig charakterisierte Premonensin A als Referenz.^[233] Die chemischen Verschiebungen der $^1\text{H-Signale}$ und $^{13}\text{C-Signale}$ werden in Tabelle 16 und Tabelle 17 wiedergegeben.

Tabelle 16: Gegenüberstellung der $^1\text{H-NMR}$ Spektren von Premonensin A (links) und Propargylpremonensin (rechts).


| Premonensin A (CDCl_3 , 500 MHz) | | | | Propargyl-Premonensin (CDCl_3 , 600 MHz) | | |
|-----------------------------------------------|----------------|---------------|------------|-------------------------------------------------------|---------------|-----------|
| Protonen | σ (ppm) | Multiplizität | J (Hz) | σ (ppm) | Multiplizität | J (Hz) |
| H-2 | 2.47 | m | - | 2.39-2.51 | m | - |
| H-2' | 1.41 | d | 7.5 | 1.40-1.42 | d | 7.1 |
| H-3 | 3.85 | dd | 4.0; 10.0 | 3.84-3.86 | dd | 4.2; 10.2 |
| H-4 | 2.44 | m | - | 2.39-2.51 | m | - |
| H-4' | 0.96 | d | 7.0 | 0.96-0.97 | d | 6.0 |
| H-5 | 4.22 | dd | 2.0; 9.5 | 4.19-4.23 | m | - |
| H-6 | 1.75 | m | - | 1.74-1.77 | m | - |
| H-6' | 1.10 | d | 7.0 | 1.10-1.11 | d | 6.6 |
| H-7 | 4.20 | dt | 2.0; 9.5 | 4.19-4.23 | m | - |
| H-8a | 2.67 | dd | 10.0; 18.0 | 2.65-2.70 | dd | 12.0; 6.0 |
| H-8b | 2.53 | m | - | 2.53 | m | - |
| H-10 | 2.55 | m | - | 2.54-2.57 | m | - |
| H-11 | 2.26 | t | 7.5 | 2.25-2.28 | t | 7.6 |
| H-12' | 1.61 | s | - | 1.62 | s | - |
| H-13 | 5.12 | t | 7.5 | 5.13-5.14 | m | - |
| H-14 | 2.05 | m | - | 1.94-1.97 | m | - |
| H-15 | 1.96 | m | - | 1.94-1.97 | m | - |
| H-16' | 2.05 | m | - | 2.91-2.92 | m | - |
| H-16'' | 0.94 | t | 8.0 | - | - | - |
| H-16''' | - | - | - | 2.17 | s | - |
| H-17 | 4.85 | d | 10.0 | 5.00-5.02 | d | 9.5 |
| H-18 | 2.36 | m | - | 2.39-2.51 | m | - |
| H-18' | 0.91 | d | 7.0 | 0.93-0.94 | d | 6.6 |
| H-19 | 1.92 | m | - | 1.94-1.97 | m | - |
| H-20 | 5.33 | dt | 7.0; 15.0 | 5.30-5.36 | m | - |
| H-21 | 5.15 | dd | 8.5; 15.0 | 5.16-5.19 | m | - |
| H-22 | 2.10 | m | - | 2.10-2.13 | m | - |
| H-22' | 0.97 | d | 7.0 | 0.97-0.98 | d | 6.0 |
| H-23a | 1.60 | m | - | 1.59-1.60 | m | - |
| H-23b | 1.22 | m | - | 1.20-1.24 | m | - |
| H-24 | 2.50 | m | - | 2.54-2.57 | m | - |
| H-24' | 1.03 | d | 6.5 | 1.03-1.04 | d | 6.8 |
| H-26 | 2.11 | s | - | 2.11 | s | - |

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 17: Gegenüberstellung der ^{13}C -NMR Spektren von Premonensin A (links) und Propargylpremonensin (rechts).



| Kohlenstoffatom | Premonensin A (CDCl ₃ , 100 MHz) | Propargyl-Premonensin (CDCl ₃ , 100 MHz) |
|-----------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| C-1 | 173.6 | 173.9 |
| C-2 | 40.1 | 40.1 |
| C-2' | 14.6 | 14.7 |
| C-3 | 74.1 | 74.2 |
| C-4 | 35.3 | 35.4 |
| C-4' | 4.9 | 5.0 |
| C-5 | 81.4 | 81.5 |
| C-6 | 38.7 | 38.8 |
| C-6' | 10.0 | 10.0 |
| C-7 | 66.2 | 66.4 |
| C-8 | 46.6 | 46.6 |
| C-9 | 212.2 | 212.3 |
| C-10 | 42.3 | 42.4 |
| C-11 | 33.4 | 33.5 |
| C-12 | 132.9 | 133.1 |
| C-12' | 16.2 | 16.3 |
| C-13 | 125.4 | 125.1 |
| C-14 | 26.9 | 26.8 |
| C-15 | 36.5 | 36.7 |
| C-16 | 138.9 | 133.6 |
| C-16' | 23.4 | 20.1 |
| C-16'' | 13.6 | 68.5 |
| C-16''' | - | 82.6 |
| C-17 | 130.6 | 131.1 |
| C-18 | 32.6 | 33.0 |
| C-18' | 21.2 | 20.8 |
| C-19 | 40.8 | 40.5 |
| C-20 | 128.2 | 127.9 |
| C-21 | 136.2 | 136.8 |
| C-22 | 35.2 | 35.3 |
| C-22' | 21.7 | 21.8 |
| C-23 | 40.0 | 40.0 |
| C-24 | 45.3 | 45.4 |
| C-24' | 16.1 | 16.1 |
| C-25 | 213.1 | 213.3 |
| C-26 | 28.1 | 28.2 |

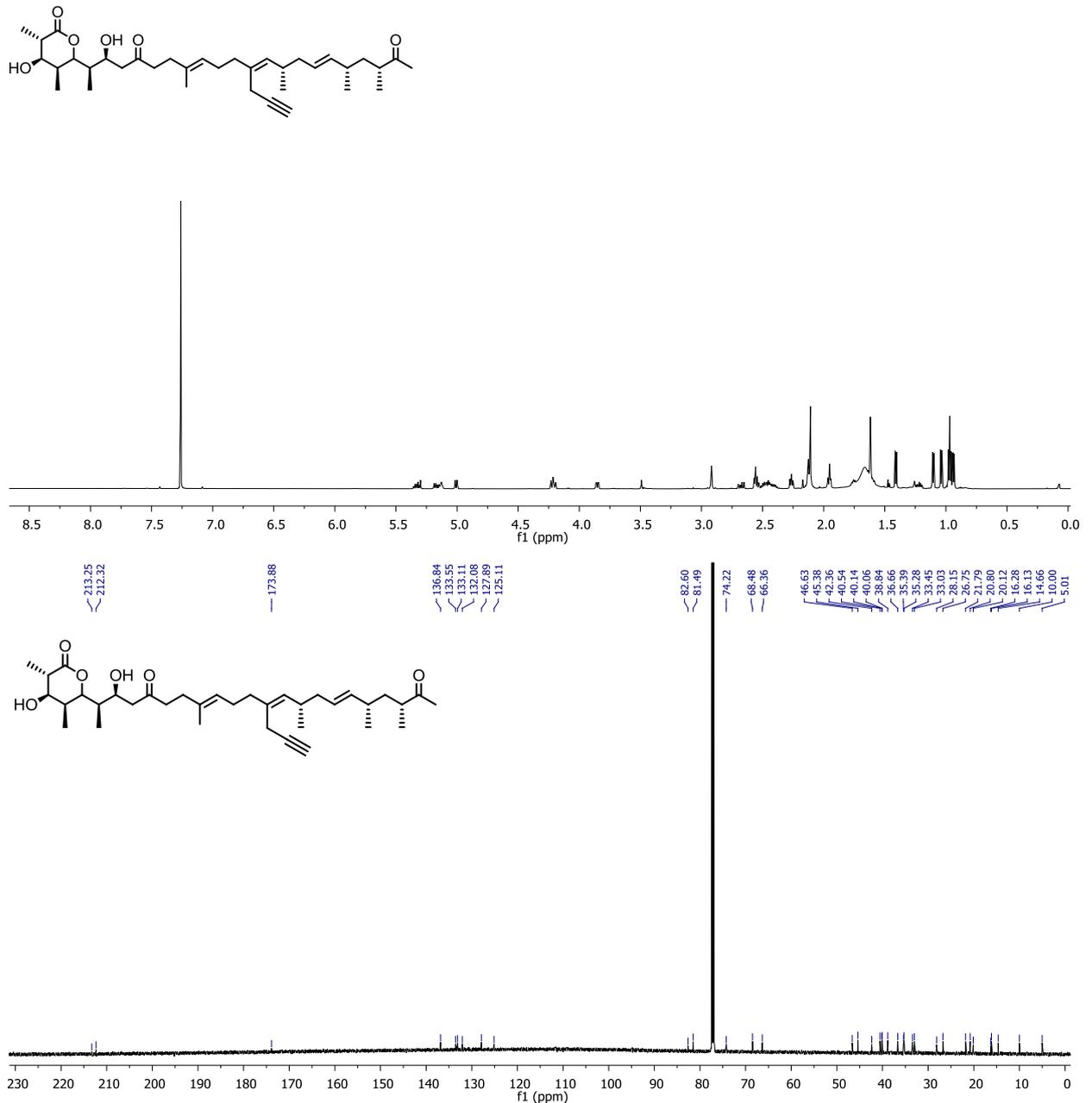
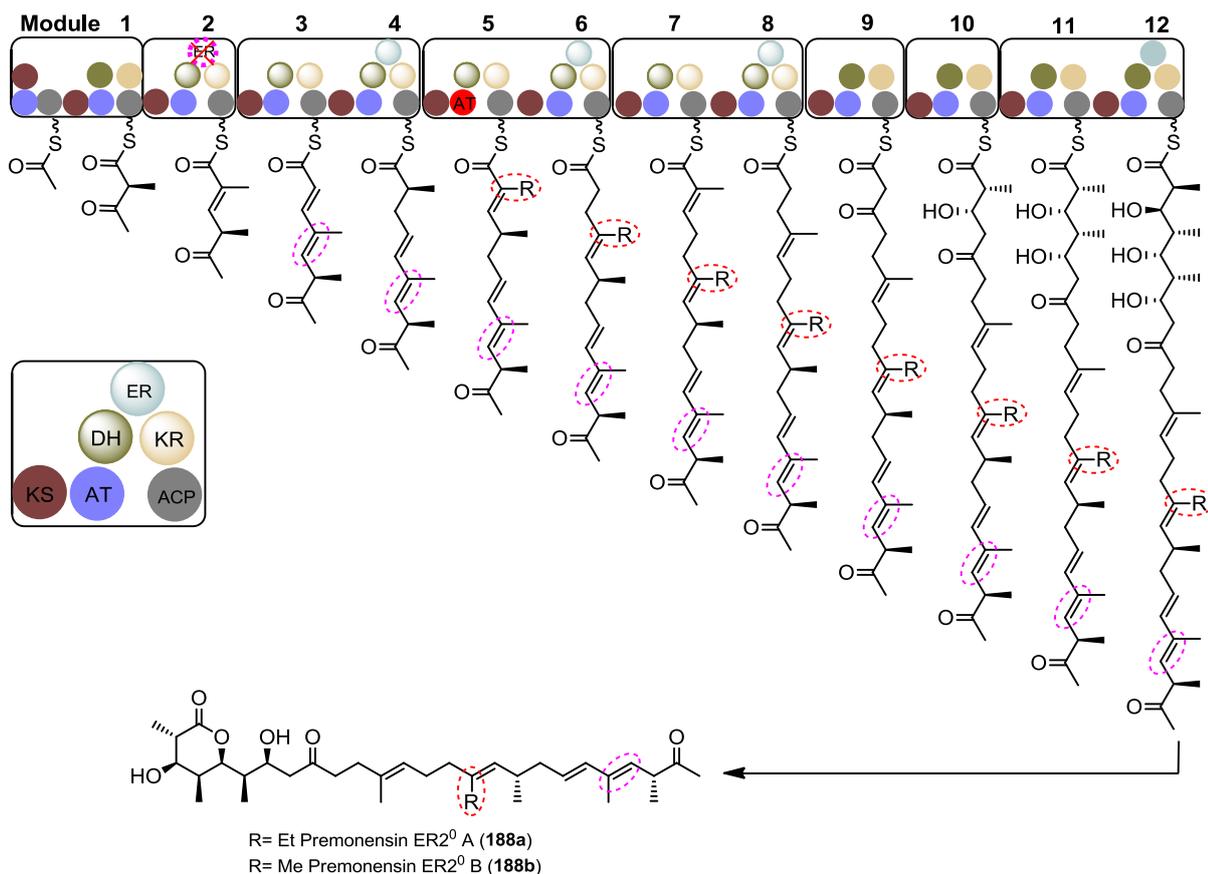


Abbildung 36: ¹H-NMR und ¹³C-NMR-Spektrum von Propargylpremonensin (**187**) in CDCl₃-d₁.

Um weitere Untersuchungen der Substratflexibilität dieser PKS durchzuführen, wurden Propyl-MSNAC, Propargyl-MSNAC, Allyl-MSNAC und Hexyl-MSNAC zu Kulturmedien des Mutantenstamms *S. cinnamomensis* A495-ER2⁰ hinzugefügt.^[233] Dieser Stamm ermöglicht Zugang zu einem Redoxderivat von Premonensin und war das Ergebnis vorangegangener PKS-Engineering Experimenten.^[233] Dieser Mutantenstamm besitzt eine inaktivierte ER-Domäne in Modul 2, was zum Premonensinderivat **188a** und **188b** führt (Schema 62).

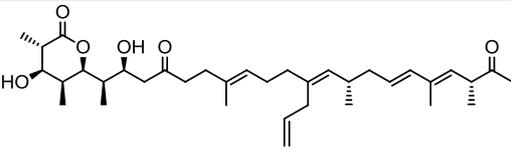
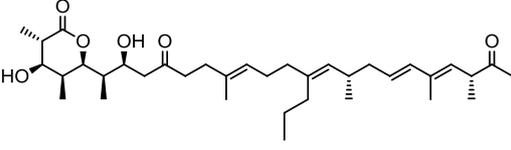
Ergebnisse und Diskussion



Schema 62: Aufbau der Premonensin ER²⁰-PKS. Die Inaktivierung der ER in Modul 2 führt zur Bildung von Premonensin ER²⁰ (188a und 188b) A und B. Rotmarkiert ist die AT_{5mon} die sowohl MMCoA, als auch EtMCoA akzeptiert. Rosa markiert ist die Position, die nicht weiter reduziert wurde.

Die Analyse dieser Fermentationen zeigte interessante Unterschiede zu der Wildtyp-PKS und impliziert einen *crossstalk* zwischen verschiedenen Segmenten des Multienzymkomplexes durch einen derzeit noch unbekanntem Mechanismus. Wie erwartet war die Menge an produzierten Polyketidderivaten signifikant geringer, als im Falle des Wildtyps. Im Gegensatz zum Premonensinproduzenten erfolgt hier kein Einbau von Propargyl-MSNAC. Die Fütterung mit Propargyl-MSNAC führte lediglich zu stark verringerter Produktion von Premonensin ER²⁰. Propyl-MSNAC und Allyl-MSNAC hingegen zeigten eine signifikante Einbaurrate relativ zum Wildtyp. Diese Proben wurden ebenfalls für die HRMS-Analyse verwendet. Die Ergebnisse für die einzelnen Verbindungen werden in Tabelle 18 wiedergegeben.

Tabelle 18: HRMS-Ergebnisse der Fermentativ erhaltenen Verbindungen.

| Verbindung | Theor. berechnet | Exp. gefunden |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  Allylpremonensin ER2 ⁰ (189) | 585,4150 [M+H] ⁺ ; 602,4415 [M+NH ₄] ⁺ ; 607,3960 [M+Na] ⁺ | 585,4150 [M+H] ⁺ ; 602,4412 [M+NH ₄] ⁺ ; 607,3967 [M+Na] ⁺ |
|  Propylpremonensin ER2 ⁰ (190) | 604,4572 [M+NH ₄] ⁺ | 604,4572 [M+NH ₄] ⁺ |

Diese Experimente implizieren einen subtilen, aber effektiven *cross-talk*-Mechanismus zwischen Modul 2 und Modul 5. Offenbar kann die molekulare Umgebung der PKS-Maschinerie Veränderungen in der Substratspezifität von einzelnen Domänen oder Modulen hervorrufen. Dies könnte das Ergebnis eines geeigneten *Proofreading*-Mechanismus sein oder eines substratinduzierten Veränderung der katalytischen Aktivität.^[220, 233]

4.8.2 Molekulares Modelling der AT5_{mon}-Domäne

Um den Einbau nicht-nativer Substrate genauer zu verstehen, unternahm die Arbeitsgruppe um Dr. E. Sanchez-Garcia MD-Simulationen der AT5_{mon}-Domäne. Die im folgenden Kapitel beschriebenen Ergebnisse und Abbildungen wurden von Kenny Bravo-Rodriguez zur Verfügung gestellt.

Ein Homologiemodell der AT5_{mon}-Domäne wurde basierend auf Röntgenkristallstrukturen der AT3_{DEBS} (PDB ID: 2QO3)^[234], AT5_{DEBS} (PDB-ID: 2HG4)^[235] und der Malonyl-CoA-Acyl-Carrier-Protein Transacylase (MCAT) als Template benutzt. AT3_{DEBS} und AT5_{DEBS} wurden verwendet aufgrund der hohen Sequenzhomologie mit der AT5_{mon}. Die MCAT wurde verwendet, da ihr katalytisch aktives Zentrum der AT5_{mon} mehr ähnelt, als das aktive Zentrum der AT3_{DEBS} und der AT5_{DEBS}. Anschließend wurden die Substrate MCoA, (S)-Et-MCoA und (S)-Propargyl-MSNAC in die Struktur gedockt. Abbildung 37 zeigt die Bindung von Et-MCoA, MCoA und Propargyl-MSNAC und dass die AT5_{mon} eine Kavität besitzt um alkylierte Malonsäurederivate zu akzeptieren.

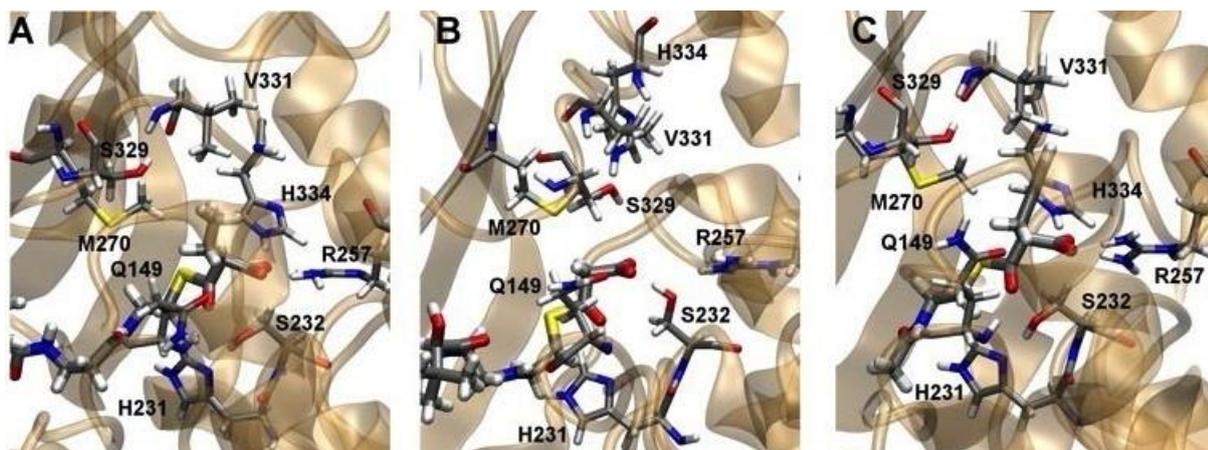


Abbildung 37: Aminosäuren mit direktem Kontakt zur Seitenkette des Malonsäurebausteins sind hervorgehoben, außerdem ist R257 markiert, welches eine Salzbrücke zur Carboxylgruppe des Malonats aufbaut. Q149 war für die Erweiterung des Substratspektrums im hier untersuchten Rahmen nicht relevant, sondern sorgt für die richtige Positionierung des Substrates. H231 und S232 sind die katalytische Diade, die es S232 ermöglicht den Thioester nucleophil anzugreifen. M270 schirmt die Region des aktiven Zentrums ab, die von (*R*)-MMCoA eingenommen werden würde, es könnte sich also hierbei um den Stereoselektivitätsfilter handeln. S239 ist der in dieser Arbeit herausgearbeitete Rest. Die Verringerung des sterischen Anspruchs an dieser Position erhöht die Flexibilität des aktiven Zentrums und erlaubt eine signifikante Substratpromiskuität. **A:** Et-MCoA bildet wesentlich mehr Wechselwirkungen mit der AT5_{mon} aus. **B:** MCoA kann nicht viele Interaktionen mit der AT5_{mon} ausbilden. **C:** Das nicht-native Substrat Propargyl-MSNAC kann in die aktive Seite integriert werden, ähnlich wie Et-MSNAC.

4.8.3 Diskussion

Die AT5_{mon} des Monensinproduzenten *S. cinnamomensis* zeigt, dass es ebenfalls möglich ist neue Naturstoffderivate zu erhalten, indem man nicht-natürliche Malonsäurederivate dem Wildtypproduzenten bei der Fermentation hinzufügt. Dies setzt eine natürliche Substratpromiskuität voraus. Durch den Einbau von Allyl- und Propargyl-MSNAC kann man Zugang zu neuen Monensin- und Premonensinderivaten erhalten. Somit sollen im weiteren Verlauf Allyl- und Propargylmonensin in präparativen Mengen fermentativ erhalten werden, um diese chemisch zu derivatisieren. Das *in silico* Modell der AT5_{mon} ermöglicht es, einen detaillierten Einblick in den Aufbau dieses Enzyms zu bekommen und den Einbau von nicht-nativen Substraten im Wildtypsystem vorherzusagen. Diese Vorhersagen wurden durch ein systematisches Screening von nicht-nativen Malonsäurederivaten als *building blocks* für die Monensin-PKS bestätigt. Des Weiteren insertiert die Zugabe von nicht-nativen Malonsäurederivaten die relativen Mengen an produzierten Premonensin A und B. Die Toleranz eines neuen Propargyl-Motivs in der Struktur des Premonensins eröffnet neue Möglichkeiten für die Entdeckung neuer bioaktiver Substrate durch weitere chemische Modifikationen.

4.9 Die biologische Aktivität von Premonensin und dessen Derivaten

Die im folgenden Kapitel beschriebenen Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit A. Ali und Dr. S. Ismail erarbeitet. Der Fluoreszenzpolarisationsassay wurde von Dr. S. Ismail im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Wittinghofer durchgeführt.

Bei Premonensin handelt es sich um eine nicht-natürliche Verbindung, die nur durch gentechnische Unterdrückung der oxidativen post-PKS-Prozessierung erhalten wird. Auf der biologischen Aktivität dieser Struktur liegt aller Wahrscheinlichkeit nach kein direkter evolutionärer Druck. Trotzdem befindet sich Premonensin im Strukturrahmen der Polyketide, weshalb eine Testung auf Bioaktivität sinnvoll ist.^[236] Vorarbeiten in unseren Arbeitskreis konnten zeigen, dass Premonensin und verschiedene Redoxderivate teils deutliche antibakterielle Wirkung zeigen.^[233] Des Weiteren wurde von A. Ali und Dr. S. Ismail gezeigt, dass Premonensin an PDE δ bindet. Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle im K-Ras Signalweg.^[237-239] Da K-Ras eine wichtige Rolle beim Tumorwachstum spielt, ist PDE δ Gegenstand der Tumorforschung geworden.^[240-247] Die Inhibierung von PDE δ zeigte zytotoxische Effekte an Pankreastumorzellen.^[248] Die Suche nach Verbindungen, welche gezielt PDE δ inhibieren, könnten somit potenziell einen großen Fortschritt für die Entwicklung neuartiger Tumorthapeutika bedeuten, die einen gezielten Einfluss auf den K-Ras Signalweg haben. Derzeit gibt es nur wenige Verbindungen die an PDE δ binden.^[248, 249] In einen kompetitiven Fluoreszenz-Assay mit farnesyliertem Rheb-Peptid ($K_D=214\pm 10$ nM) zeigte sich, dass sowohl Premonensin B, als auch Propargyl-Premonensin an PDE δ binden. Dabei dient das Rheb-Peptid als Mimetikum für den C-Terminus von K-Ras. Premonensin B besitzt einen IC_{50} von 0,8 μ M, während Propargylpremonensin einen IC_{50} von 2,00 μ M zeigt. Propargylpremonensin bindet dabei 2,5-mal schlechter als Premonensin. Dr. S. Ismail gelang es, PDE δ mit gebundenen Premonensin A zu kristallisieren. In der gelösten Struktur ist deutlich zu erkennen, dass Premonensin B mit dem hydrophoben Kohlenwasserstoffgerüst an das PDE δ bindet. Das hydrophilere Valerolacton ist hingegen solvensexponiert (Abbildung 38).

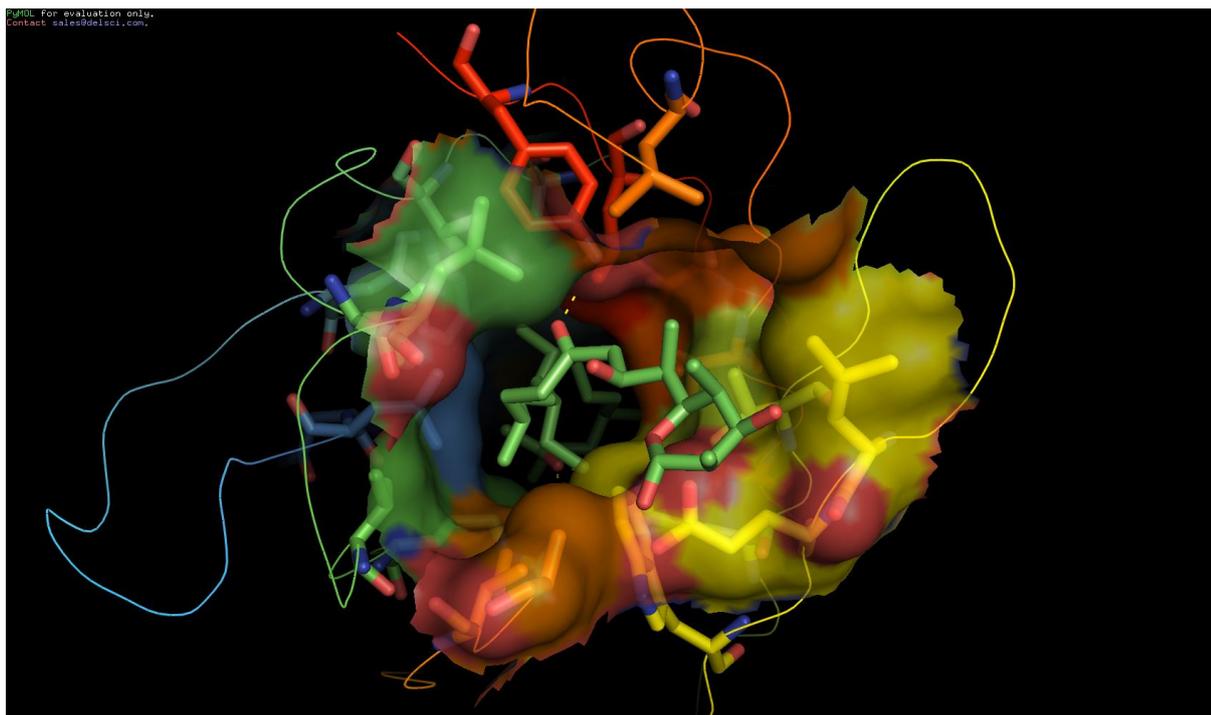


Abbildung 38: Bindung von Premonensin B in PDE δ . Die Bindung von Premonensin B erfolgt über die hydrophobe Kohlenwasserstoffkette, während das Valerolacton lösemittel exponiert ist.

Nachdem die Bindung von Premonensin B an PDE δ bekannt ist, kann man sich die Frage stellen inwiefern die Interaktionen von Premonensin durch semisynthetische Derivatisierung verbessert werden kann. Schaut man sich die Struktur von PDE δ genauer an, so sind am Ende des hydrophoben Tunnels zwei polare Aminosäuren, welche mit dem Methylketon des Premonensins interagieren. Bei den Aminosäureresten handelt es sich um Q78 und R61 (Abbildung 39). Diese Interaktionen könnten verstärkt werden, indem anstelle der Wasserstoffbrückenbindung eine elektrostatische Interaktion ausgebildet wird. Die Möglichkeit dazu sollte semisynthetisch untersucht werden. Das Tetrazolderivat sollte über geeignete Umsetzung der Methylketongruppe eingeführt werden. Dabei lag der Fokus auf Carbonsäuren oder Tetrazolen, die mit Q78 und R61 eine ionische Bindung ausbauen sollten. Carbonsäuren senken die Membranpermeabilität von Substanzen erheblich, sodass sich in erster Linie auf die Synthese von Tetrazolderivaten fokussiert wurde. Tetrazole verhalten sich bioisoster zu Carbonsäuren, sind aber besser membrangängig.

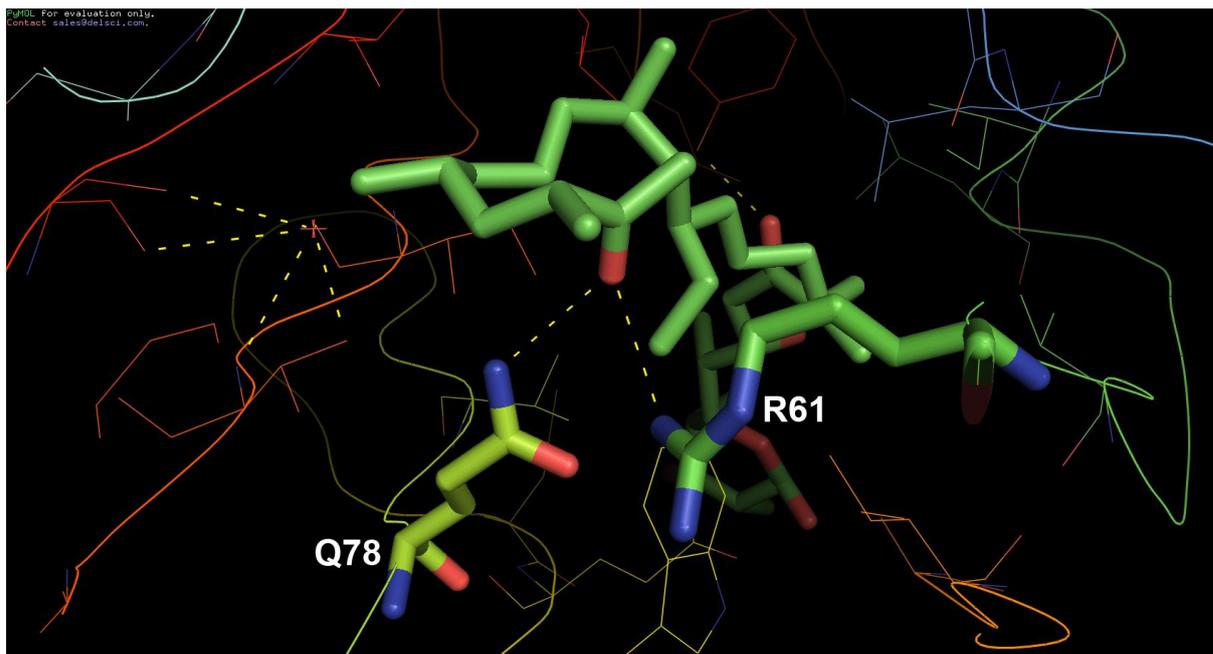


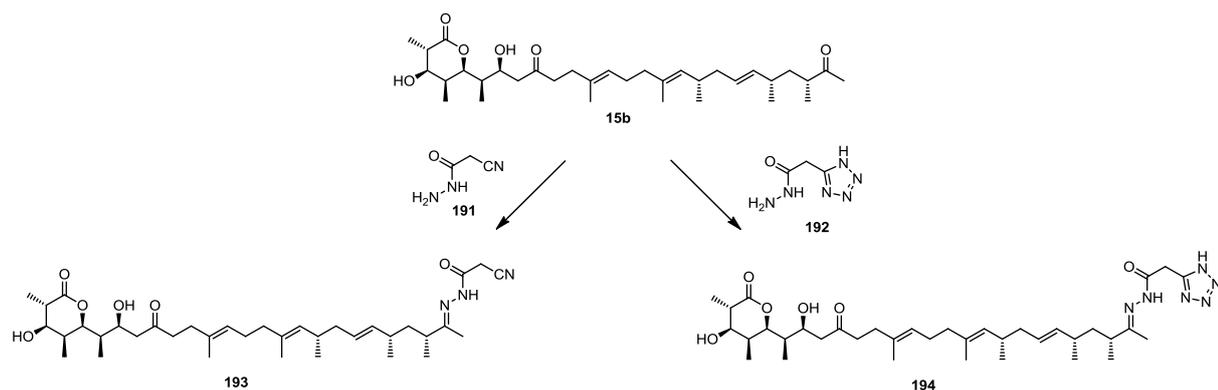
Abbildung 39: Sicht auf den Boden der Hydrophobentasche von PDE δ . Die Aminosäurereste Q78 und R61 bilden Wasserstoffbrücken zu dem Methylketon des Premonensin aus.

Basierend auf dem Mangel an zur Verfügung stehendem Premonensin, wurden Testreaktionen in der Größenordnung von 1 mg durchgeführt. Somit ergeben die Ergebnisse erste Hinweise über mögliche neue Derivate, deren absolute Konformation und Konfiguration jedoch nicht mittels NMR bestätigt werden konnte. Das Projekt wird aufgrund der zeitlichen Begrenzung der Arbeit, an einen Nachfolger übergeben.

4.9.1 Synthese neuer Premonensinderivate

In Modellreaktionen wurde, Premonensin B mit Cyanoacteohydrazid (**191**) umgesetzt. Die Semicarbazol-Bildung erfolgte zunächst in einem 1 mg Testansatz in einem 1 M Natriumacetatpuffer bei pH 4,5. Nach 48 h zeigte die Reaktion keinen vollständigen Umsatz unter Verwendung von 1 eq. Hydrazid (**191**). Bei Erhöhung der Äquivalente des Hydrazids **191**, erhielt man bei vollständigem Umsatz jedoch Produktgemische von Mono- und Di-Semicarbazone des Premonensin B (Schema 63). Basierend auf den Vorexperimenten wurden analoge Untersuchungen mit Tetrazolderivaten getestet.

Ergebnisse und Diskussion



Schema 63: Derivatisierung des Methylketons von Premonensin B (**15b**). Mangels NMR-Daten kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die Reaktion auch am β -Hydroxyketon stattfindet.

194 erhält man in 77%iger Ausbeute durch Rühren des kommerziell erhältlichen Tetrazolethylesters mit Hydrazin in Methanol. Um die Reaktionsbedingungen zur Semicarbazonbildung zu optimieren, wurde Verbindung **192** unter verschiedenen Bedingungen mit Farnesylaceton als Modellverbindung umgesetzt. Dazu wurden Versuche mit 1 M Natriumacetat-Puffer pH 4,5, Triethylamin und Siliziumdioxid,^[250] sowie Pyridin durchgeführt. Mit Triethylamin und Siliziumdioxid wurde nach 24 h nahezu quantitativer Umsatz erzielt, mit nur 1,2 eq. des Tetrazols **192**. Mit Pyridin was als Lösemittel und Base dient erzielte man bereits nach 3 h nahezu quantitativen Umsatz. Der Versuch, diese optimierten Reaktionsbedingungen auf das Premonensin zu übertragen, scheiterte. So führten jedwede Versuche, das Tetrazolpremonensin **194** in Pyridin als Lösemittel zu erhalten, zur Zersetzung des Startmaterials. Ebenfalls konnte die Methode mit Triethylamin und Siliziumdioxid, nicht angewandt werden. Premonensin zeigte Zersetzungsprodukte, wenn dieses mit Lewis-Säuren oder Lewis-Basen in Kontakt trat. Umsatz zeigte sich, als der 1 M Natriumacetatpuffer verwendet wurde. Dabei zeigte sich, dass das Tetrazolpremonensin **194** erst nach drei Tagen Reaktionszeit in nennenswerten Mengen gebildet wurde. In dem Chromatogramm ist auch die Zunahme an Zersetzungsprodukten deutlich erkennbar. Insgesamt ließen sich durch Einsatz von Modellverbindungen für Premonensin oder Tetrazoldonoren keine hinreichend übertragbaren Synthesemethoden etablieren.

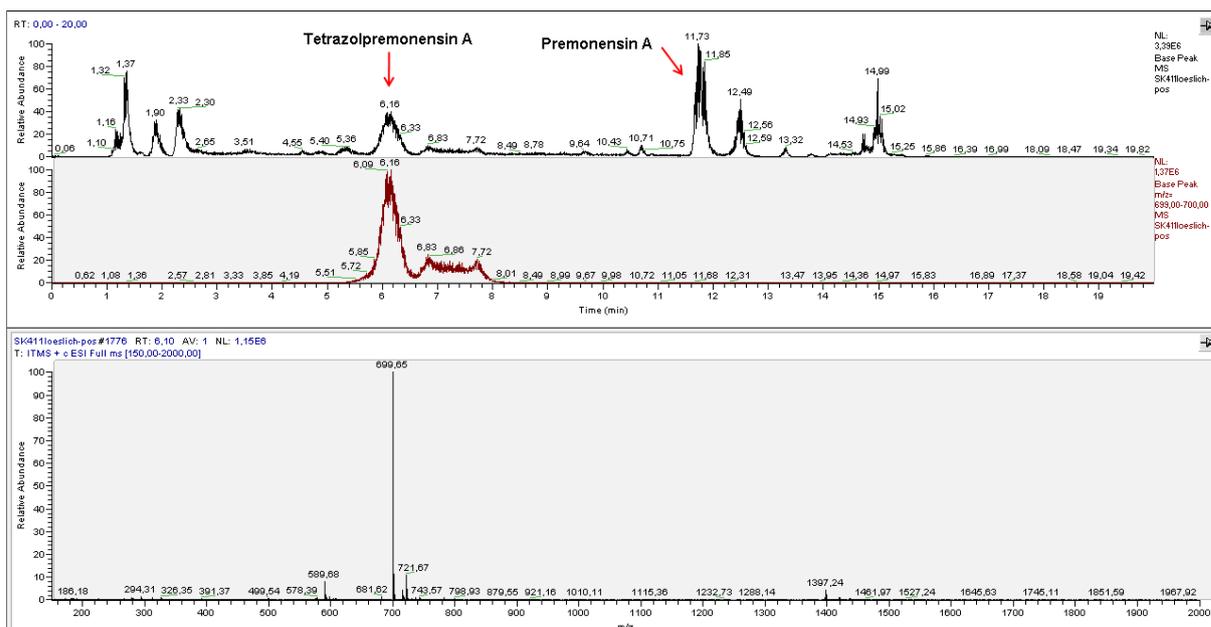
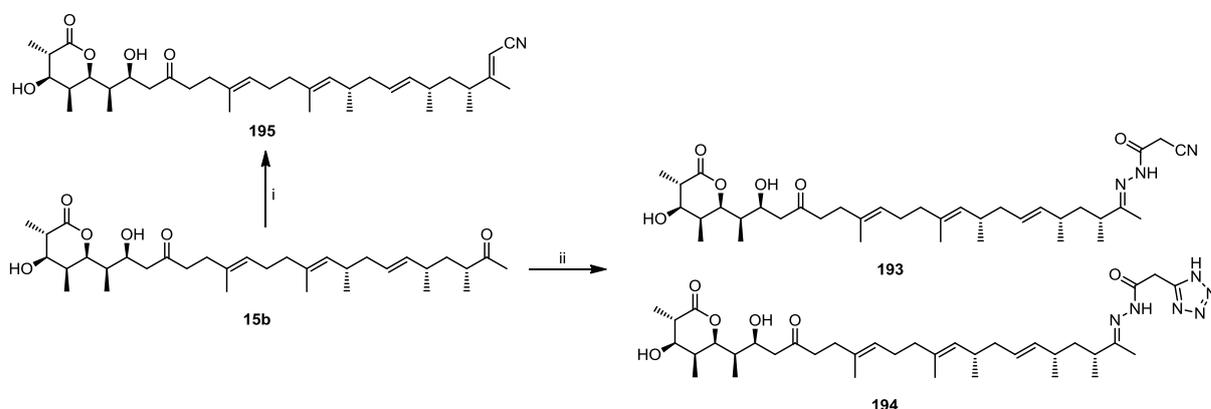


Abbildung 40: HPLC-ESI/MS Chromatogramm der Reaktion von Premonensin A mit Verbindung **192** in 1 M Natriumacetatpuffer bei pH 4,5 nach drei Tagen. Das Chromatogramm zeigt Tetrazolpremonensin A und dessen Massenspur ($m/z = 699 [M+H]^+$).

Somit konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich wäre ein Tetrazolpremonensinderivat zu erhalten. Eine Skalierung konnte jedoch nicht mehr durchgeführt werden. Eine weitere Methode das Methylketon zu modifizieren, sind Olifinierungsreaktionen. So sollte mittels Wittig-Olefinierung oder der Horner-Wadsworth-Emmons-Olefinierung (HWE-Olefinierung) vorzugsweise das Z-Alken entstehen. Hier stellte sich ebenfalls die Frage der Regioselektivität dieser Reaktionen. In Premonensin gibt es das β -Hydroxyketon und das Methylketon, was für diese Art der Reaktion in Frage kommt. Auf Grund der vielen kommerziell erhältlichen Wittig-Salze, sollte versucht werden Premonensin mit Wittig-Salzen in Gegenwart von Basen oder mit Wittig-Yliden umzusetzen. Ein generelles Problem hierbei ist die intrinsische Limitation, dass Premonensin instabil gegenüber starken Basen ist, sodass die Phosphorylide zuvor generiert werden müssen. Wittigreaktionen verlaufen mit Aldehyden wesentlich besser als mit Ketonen, sodass die Reaktionsmischungen erhitzt werden müssen.^[251-255] Aus vorausgegangenen Versuchen zeigte sich aber, dass Premonensin beginnt sich ab Temperaturen von 40°C zu zersetzen. Somit schied die Wittigreaktion aus und der Fokus wurde auf die HWE-Olefinierung gelegt.^[253, 256-260] Diese Reaktion kann auch unter milderer Bedingungen bei niedrigen Temperaturen erfolgen. Als Testreagenz wurde α -(Cyanomethyl)phosphonsäuredialkylester in Gegenwart von Natriumhydrid umgesetzt und nach 10 min wurden 1,1 eq. dieser Lösung zu einer Premonensinlösung hinzugegeben. Die Reaktion wurde anschließend 3 h bei RT gerührt.

4.9.2 Diskussion und Ausblick

Durch die Substratpromiskuität der AT5_{mon} erhält man Zugang zu Propargyl-, Allyl- und Butyl-Premonensin. Versuche die Methylregion zu derivatisieren, weisen derzeit unzureichende Resultate auf (Schema 65). So konnte gezeigt werden, dass Wittig- bzw. HWE-Reaktionen, bedingt durch die Instabilität des Premonensins, keine schnelle Option sind, um neue Derivate zu erhalten. Die Hydrazonbildung, ausgehend von Hydrazinderivaten des Tetrazols **192**, könnte potenziell möglich sein. Derzeit liegt die Limitation am geringen Umsatz der Reaktion und dem Mangel an Premonensin, um präparative Mengen des gewünschten Tetrazolpremonensins zu erhalten.



Schema 65: Semisynthetische Ansätze zur Derivatisierung von Premonensin B. i) Derivatisierung durch Wittigreaktionen oder HWE-Olefinierung, ii) Derivatisierung mittels Hydrazonen in 1 M Natriumacetatpuffer pH 4,5.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Premonensin ein sehr fragiles Molekül ist. Es beginnt sich bei Temperaturen von 40°C zu zersetzen. Basen als Additive in Reaktionen werden ebenso wenig toleriert, wie basische Lösemittel (Pyridin). Säuren werden bedingt toleriert. Solange der pH nicht kleiner als pH 4,5 wird, ist Premonensin für einen kurzen Zeitraum stabil. Die Zersetzung von Premonensin wird zusätzlich gefördert durch Lewis-Säuren, wie Lithium-, Zink-, oder Titansalze.

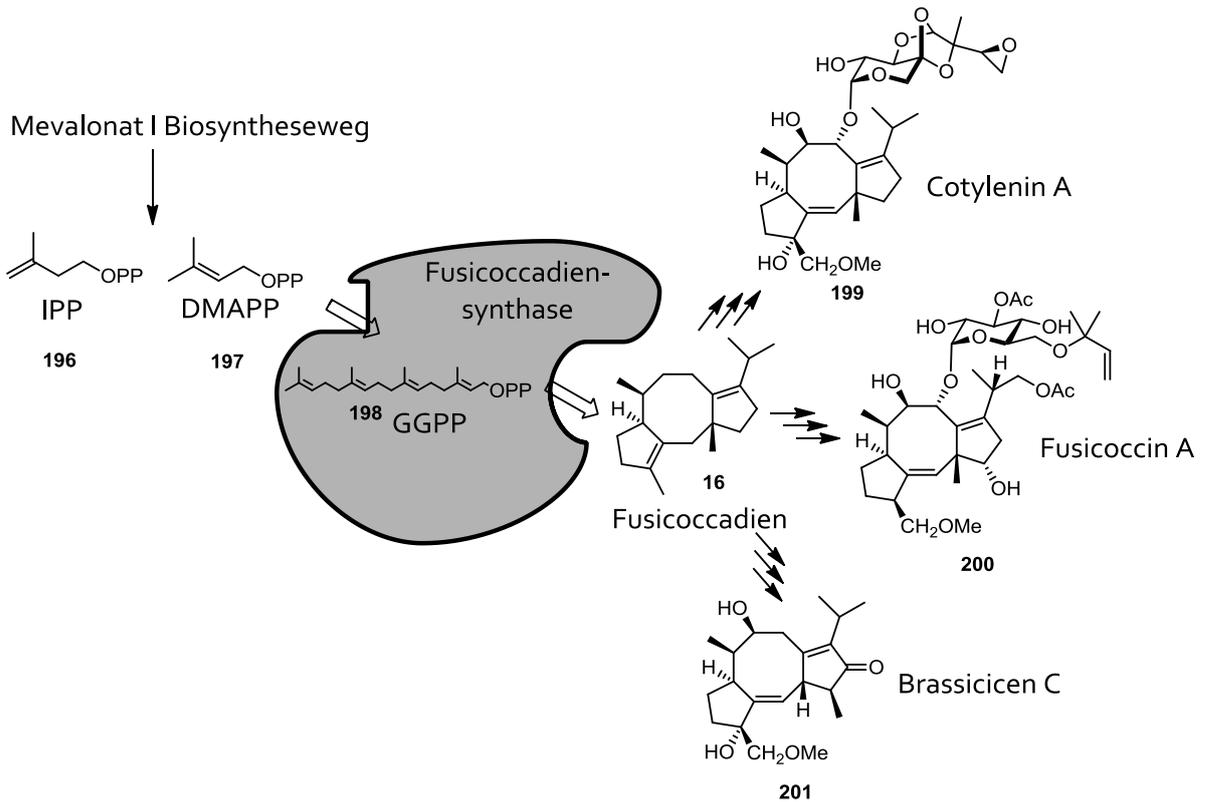
Damit sind die Möglichkeiten Premonensin semisynthetisch an dem Methylketon zu modifizieren sehr begrenzt. Eine wesentlich effektivere Möglichkeit könnten die Modifikationen der Allyl- bzw. Propargyl-Seitenkette des Premonensins erzielen. Ob dadurch jedoch eine verbesserte Bioaktivität zu erreichen wäre ist aktuell fraglich, da bereits Propargylpremonensin eine geringere Affinität zu PDE δ aufweist.

4.10 Versuche zur Darstellung neuer Fusicoccadien Derivate

In dem folgenden Kapitel werden Versuche zur semisynthetischen Derivatisierung von Fusicoccadien (FCdien) beschrieben. Präparative Mengen wurden von J. Arens im Rahmen ihrer Masterarbeit und ihrer derzeitigen Dissertation bereitgestellt.^[266, 267]

4.10.1 Diterpene und ihr Potenzial

Terpene sind vielfältige Naturstoffe mit einer Vielzahl an bekannten Bioaktivitäten. Sie spielen eine wichtige Rolle sowohl als Primärmetabolite in anabolischen und katabolischen Prozessen, als auch als Sekundärmetabolite in Mikroben, Pflanzen und Tieren. Ihr Anwendungsspektrum in der Medizin, z.B. als Tumorthapeutika (Taxol) oder Vitamine (Vitamin A), machen Terpene zu einem interessanten Forschungsgebiet. Eine vielversprechende, aber derzeit noch unzureichend erforschte Familie der Terpene, die Fusicoccane, besitzen ein 5-8-5 Ringsystem (Schema 66).^[268] Diterpenoide dieser Familie sind z.B. Cotylenin A (**199**), Fusicoccin A (**200**) oder Brassicinen C (**201**) und werden von verschiedenen filamentösen und phytopathogenen Pilzen synthetisiert.^[269-271] Die erwähnten Naturstoffe werden aus dem gemeinsamen Vorläufer Fusicocca-2,10(14)-dien (**16**)^[272, 273] synthetisiert und sind gut charakterisiert.^[274, 275] Die biosynthetische Reaktion zu **16** wird durch das ungewöhnliche bimodulare Enzym Fusicoccadien Synthase (FS) katalysiert. FS enthält sowohl eine Prenyltransferase-Domäne als auch eine Terpenyclase-Domäne.^[272, 273] Dies ermöglicht die Synthese des Diterpens **16** direkt ausgehend von den Terpengrundbausteinen Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP (**197**)), Isopentenylpyrophosphat (IPP (**196**)) und Geranylgeranyldiphosphat (GGPP (**198**)) (Schema 66).^[272, 273]



Schema 66: Fusicoccadienbiosynthese (**16**) ausgehend von den Vorläufern Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP (**197**)) und Isopentenylpyrophosphat (IPP (**196**)). Die bimodulare Fusicoccadiensynthase (FS) katalysiert die Bildung von Geranylpyrophosphat (GPP (**198**)) und die Zyklisierung zu dem unfunctionalisierten Diterpen (**16**).^[272, 273] Durch zusätzliche enzymatische Derivatisierung von Fusicoccadien werden Cotylenin A (**199**), Fusicoccin A (FCA) (**200**) oder Brassicicen C (**201**) gebildet.^[273] Abbildung aus J. Arens *et al.*^[267]

Des Weiteren zeigen diese Verbindungen herbizide Wirkung.^[270, 276] Verschiedene Studien zeigen apoptotische Eigenschaften oder einen Einfluss auf die Zelldifferenzierung.^[277-280] Besonders Verbindung **199** wurde als potenzielle anti-Tumorverbindung in Mausmodellen identifiziert.^[281] Jedoch ging die Verfügbarkeit dieser Verbindung mit dem Verlust der Proliferationsfähigkeit des Cotylenin produzierenden Pilzes *Cladosporium sp.* 501-7W verloren.^[273, 282] Totalsynthesen dieser komplexen Diterpene wurden für (-)-Cotylenol^[283], (+)-Taxadien^[284] und Fusicoccadien^[283, 285] beschrieben. Diese sind häufig sehr explorativ und nur zur Synthese von analytischen Mengen anwendbar. Erst seit kurzem gelingt es biosynthetisch präparative Mengen mittels gentechnisch veränderten Mikroorganismen zu erhalten. Das prominenteste und bislang einzige Beispiel ist die Biosynthese des Vorläufers für das Malariamedikament Artemisinin.^[286-288] Derzeit gibt es kaum Strategien um komplexe Terpene in präparativen Mengen zu erhalten.

Im Rahmen der Masterarbeit und im weiteren Verlauf der Dissertation von J. Arens soll das Fusicocca-2,10(14)-dien in präparativen Mengen zugänglich gemacht werden. Dazu untersuchte Sie drei potenzielle Fermentationsstämme für die Biosynthese von **16**, wobei

Ergebnisse und Diskussion

sich eine genetisch veränderte Variante der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK2-1c als effektiv erwies, um **16** in präparativen Mengen von 20-30 mg/L zu erhalten.^[266, 267] In einigen Fällen weisen Naturstoffe eine höhere strukturelle Komplexität auf, als für humanmedizinische Zwecke benötigt wird.^[289] Dies scheint auch der Fall bei der Familie der Fusicoccane zu sein. Vorläufige Struktur-Wirkungs-Beziehung zeigen, dass für Verbindung Fusicoccin A das Glycangerüst an der nördlichen Hälfte nicht benötigt wird, im Gegensatz zu der Methoxygruppe an Position C16, um das Zielmolekül ein 14-3-3 Protein-Enzymkomplex zu stabilisieren.^[290-295]

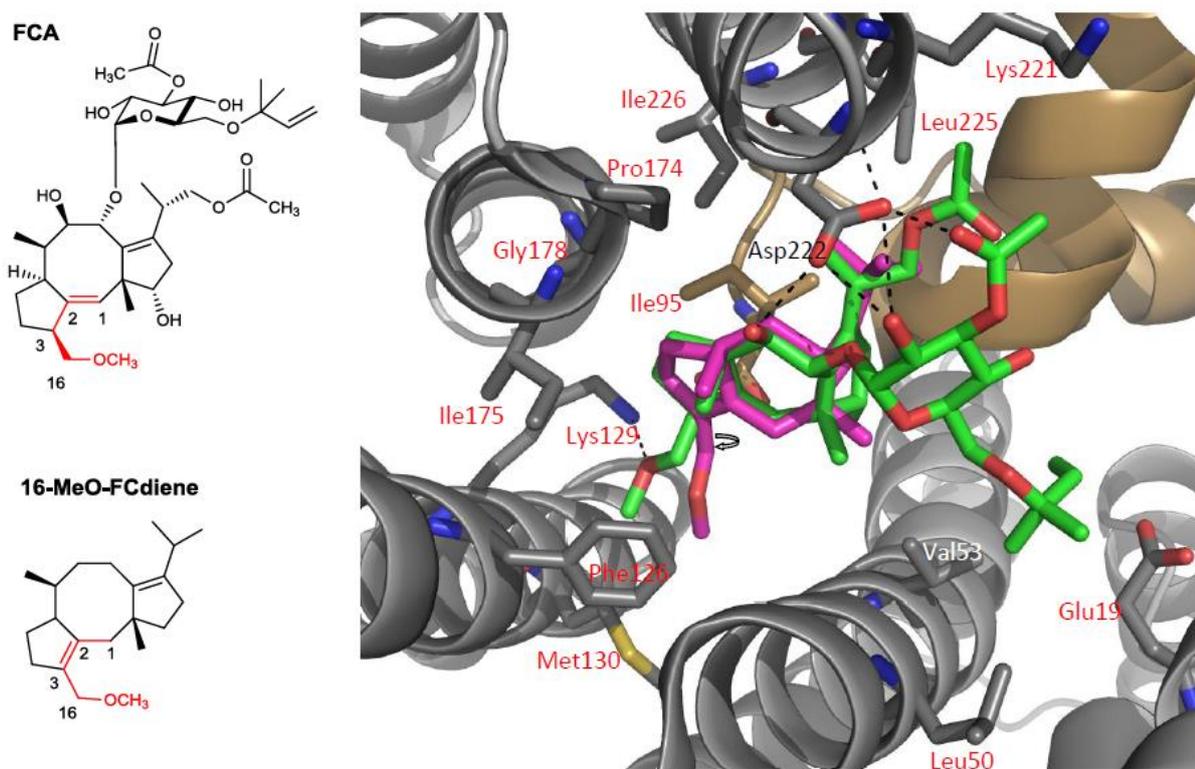
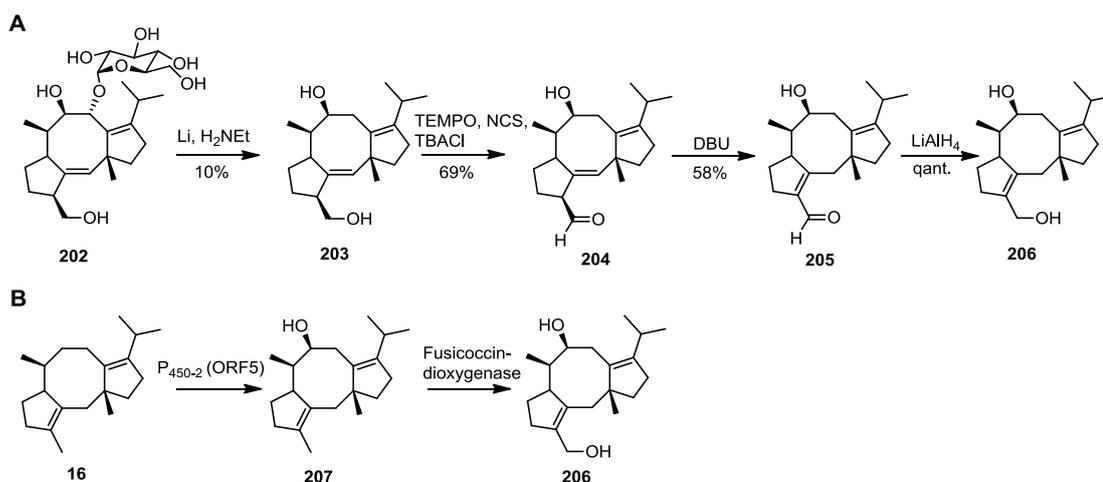


Abbildung 42: Überlagerung der modellierten Struktur von 16-Methoxy-Fusicoccadien (magenta) und Fusicoccin A (grün), umgeben von einem Tabak 14-3-3c Protein (dunkelgrau) und dem CT52-Fragment von PMA2 (bronze, pdb:2098). Sauerstoffatome sind in rot, Stickstoff in blau hervorgehoben. Wasserstoffatome sind nicht gezeigt. Essentielle Aminosäuren die für die Stabilisierung mit verantwortlich sind, sind als Stäbchen visualisiert und rot, weiß oder schwarz beschriftet. Abbildung aus J. Arens *et al.*^[267]

Abbildung 42 zeigt eine Überlagerung der modellierten Struktur (Chem3D Pro 11.0, MM2 MD: Molecular Mechanics 2 Molecular Dynamics) von 16-Methoxy-Fusicoccadien (16-MeO-FCdien, Kohlenstoffgerüst in magenta) mit einer experimentell bestimmten Kristallstruktur von Fusicoccin A. Gezeigt wird wie beide Moleküle das tobacco 14-3-3c Protein (ribbonplot, dunkelgrau), durch Interaktionen mit dem CT52-Fragment von PMA2 stabilisieren. Diese Abbildung zeigt die Möglichkeit, dass Doppelbindungsisomer

Fusicoccadien als Basis zur Generierung einfacher biologischaktiver Analoga zu nutzen, die ähnlich wie die bekannten Fusicoccane (z.B. Fusicoccin A, Cotylenin A) wirken. Der schwarze Pfeil in Abbildung 42 soll die freie Rotation der σ -Bindung zwischen Position C3 und C16 in 16-MeO-FCdien verdeutlichen. Diese kann sich frei zwischen den Bindungswinkeln von 16-MeO-FCdien und FCA an dieser Position bewegen.^[267]

Derzeit sind die Möglichkeiten 16-OMe-FCdien darzustellen begrenzt. Y. Ono *et al.* synthetisierten Intermediate der Fusicoccinbiosynthese, um die Enzyme zu identifizieren, die für die Hydroxylierung von FCdien verantwortlich sind.^[275, 282, 296]

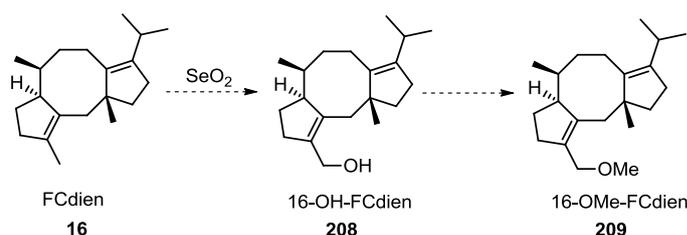


Schema 67: Synthesemöglichkeiten der Verbindung **206**. **A)** Semisynthetischer Ansatz ausgehend von Fusicoccin H.^[275, 282] **B)** Biochemische Synthese von Verbindung **206**.^[282, 296]

Das Ausgangsmaterial für die Semisynthese ist das Fusicoccin H (**202**), mit dem es Y. Ono *et al.*^[282] gelang ein Fusicoccadienderivat (**206**) zu bekommen, welches die allylische Hydroxygruppe trägt (Schema 67A). Biochemisch erfolgt die Hydroxylierung in allylischer Position durch die Fusicoccindioxygenase.^[282] Diese benötigt die hydroxylierte Verbindung **207** als Substrat, welche ausgehend von FCdien durch die P₄₅₀₋₂ (ORF5) hydroxyliert wird (Schema 67B).^[282] Beide Routen um Verbindung **206** zu erhalten sind für präparative Zwecke wenig effizient. Bei der Semisynthese geht man von dem wesentlich komplexeren, aufwendig gereinigten Fusicoccin H aus, dass sich bei der Umsetzung mit Lithium in 10 % Ausbeute in Verbindung **203** überführen lässt. Die enzymatische Variante erreicht bisher nur analytische Ausbeuten, insbesondere die P₄₅₀ katalysierte Reaktion ist komplex. Die notwendigen Enzyme wurden charakterisiert um **206** zu erhalten, jedoch bedarf es weitere Optimierung für einen präparativen Nutzen.

4.10.2 Semisynthetischeransatz zur Synthese des 16-Methoxy-Fusicoccadien

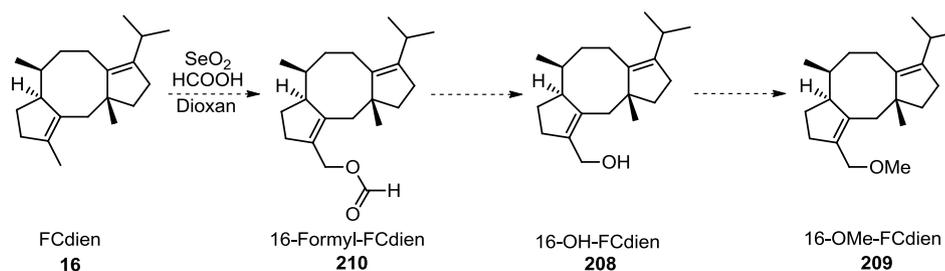
Der Zugang zu 16-OMe-FCdien könnte ausgehend von FCdien ermöglicht werden, vorausgesetzt FCdien ist in präparativen Mengen erhältlich. Durch das erlangte Wissen von J. Arens, Fusicoccadien in präparativen Mengen zu fermentieren^[266, 267], könnte eine kurze einfache Semisynthese zu dem Produkt 16-OMe-FCdien (**209**) ermöglicht werden. Die Syntheseroute sah vor, FCdien mit Hilfe von Selendioxid oder einen anderen geeigneten Oxidationsmittel in allylischer Position zu oxidieren und anschließend zu alkylieren (Schema 68).



Schema 68: Geplantes Syntheschema zur Synthese von 16-OMe-FCdien.

Die allylische Oxidation mit Selendioxid ist nicht sehr spezifisch und kann auch zur Bildung von vielen Nebenprodukten führen. Für einfache Verbindungen wurden allylische Oxidationen an Cyclohexenyl-Systemen durchgeführt, die dem Strukturmotiv annähernd ähnelten. Das Resultat dieser Oxidationen ist häufig nicht sehr spezifisch und führt zu Produktgemischen.^[297-300] Ein weiteres Problem bei der allylischen Oxidation mit Selendioxid ist das Auftreten einer Überoxidation, wenn zu viel Oxidationsmittel vorhanden ist. Deswegen wurden ebenfalls Reaktionen mit katalytischen Mengen Selendioxid in Gegenwart von *tert.*-Butylhydroperoxid (TBHT) getestet. TBHT dient als Oxidationsmittel, welches die reduzierte Selenspezies wieder zurück zu Se(IV) oxidiert und damit wieder bereit stellt für eine allylische Oxidation.^[301]

Vorexperimente an einfachen Modellverbindungen waren nicht übertragbar, sodass eine Optimierung an dem Naturstoff selbst erfolgen musste. Die Oxidation mit Selen ist oft sehr sensitiv und abhängig von der sterischen Umgebung, was ebenfalls zu unerwünschten Nebenreaktionen führen kann. Deswegen sollte auch eine Methode von K. Shibuya *et al.* getestet werden, mit der es möglich ist auch sterisch gehinderte Positionen zu oxidieren.^[302] Dazu wurde eine Oxidation von Selendioxid in Gegenwart von Ameisensäure oder Essigsäure in Dioxan oder Dichlormethan getestet. Der dadurch erhaltene Ester kann durch einfache Verseifung in den Allylalkohol überführt werden (Schema 69). Diese Methode benutzten die Mitarbeiter um P. S. Baran bei der Synthese von (+)-Ingenol in einer der letzten Stufen.^[303]



Schema 69: Syntheschema zur Synthese von 16-OMe-FCdien. Die allylische Oxidation sollte nach der Methode von K. Shibuya *et al.* erfolgen.^[302]

Zu Beginn wurden Testreaktionen im 1 mg Maßstab durchgeführt. Diese Reaktionen wurden dann aufgearbeitet und direkt über GC-MS analysiert, um einen ersten Überblick über Umsatz und Selektivität zu erhalten. Mögliche Oxidationsprodukte sind in Abbildung 43 dargestellt. Für die Testreaktionen wurde jeweils 1 mg FCdien (**16**) in 300 μl Lösemittel gelöst und verschiedene Varianten getestet.

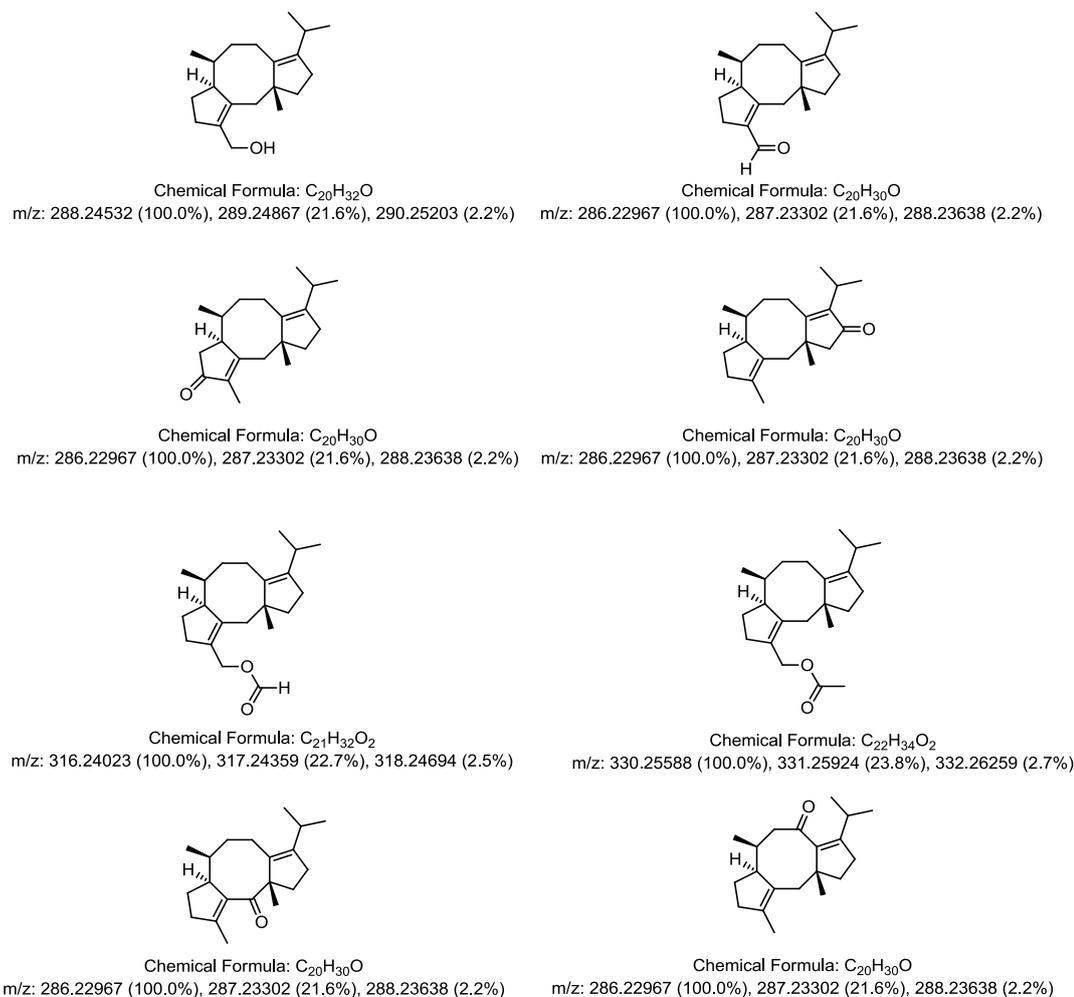


Abbildung 43: Mögliche Oxidationsprodukte des FCdiens durch Selendioxid. Hier sind nur die Monooxidationsprodukte berücksichtigt.

Ergebnisse und Diskussion

Zuerst wurden Reaktionsbedingungen in Dichlormethan und Dioxan getestet, die den Einsatz von sowohl stöchiometrischen Mengen, als auch katalytischen Mengen Selendioxid beinhalten (Tabelle 19). Der Einsatz von katalytischen Mengen Selendioxid unter Verwendung von TBHP führte zur Zersetzung des Startmaterials (Tabelle 19, Eintrag 3 und 6). Des Weiteren konnten keine Signale im GC-MS-Chromatogramm Oxidationsprodukten des FCdiens zugeordnet werden.

Tabelle 19: Reaktionsbedingungen für die allylische Oxidation von FCdien.

| Eintrag | SeO ₂ | TBHP | Lösemittel | Temp. in °C | Bemerkung |
|---------|------------------|---------|------------|-------------|--------------------|
| 1 | 1.0 eq. | - | DCM | RT | Oxidationsprodukte |
| 2 | 3.0 eq. | - | DCM | RT | Oxidationsprodukte |
| 3 | kat. | 1.1 eq. | DCM | RT | Edukt zersetzt |
| 4 | 1.0 eq. | - | Dioxan | RT | Oxidationsprodukte |
| 5 | 3.0 eq. | - | Dioxan | RT | Oxidationsprodukte |
| 6 | kat. | 1.1 eq. | Dioxan | RT | Edukt zersetzt |

Auffällige Unterschiede im Verhalten der Oxidation traten auf, als die Äquivalente von Selendioxid variiert wurden (Tabelle 19, Eintrag 4 und 5). So wurde festgestellt, dass bei Zugabe von 1,0 eq. Selendioxid neben den erwarteten Oxidationsprodukten mit einer m/z von 286, ein Hauptsignal erscheint, das eine m/z von 270 aufweist (Abbildung 44). Nach drei Stunden war das Startmaterial FCdien vollständig umgesetzt. Höchste Intensität zeigt eine m/z von 270, das Signal konnte keinen der erwarteten Produkte zugeordnet werden. Die Masse entspricht einer temporären Hydroxylierung, gefolgt von einer Eliminierung. Belege dafür liegen jedoch nicht vor.

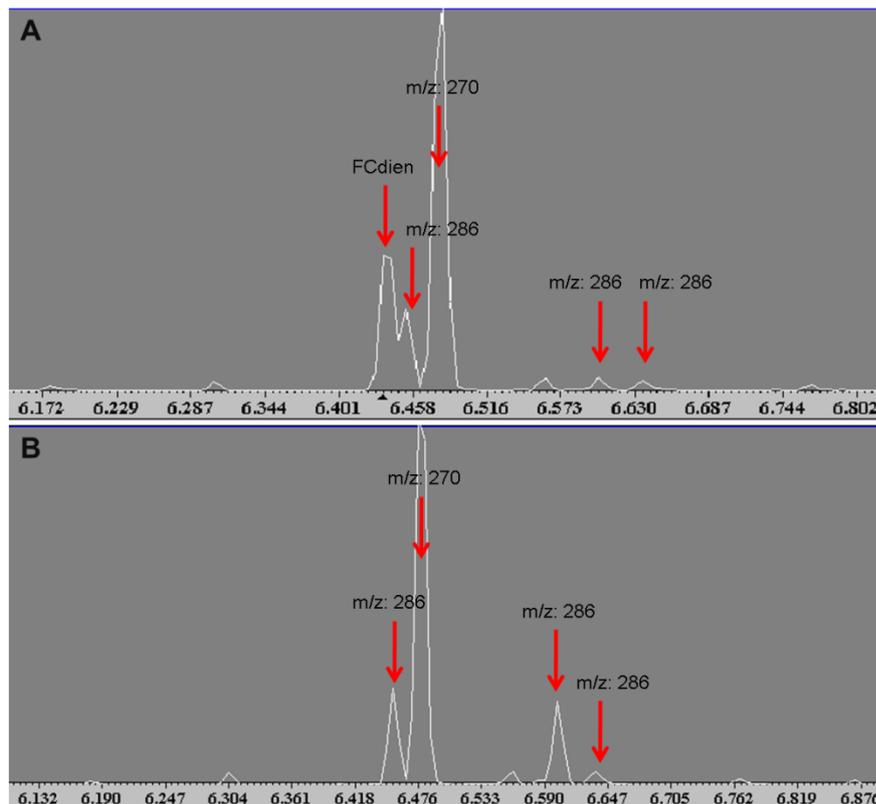


Abbildung 44: GC-MS Chromatogramme im Verlauf der Oxidation mit 1.0 eq. SeO_2 in DCM bei RT. **A)** Reaktionsfortschritt nach 2h. **B)** Reaktionsfortschritt nach 3h. m/z: 286 entspricht einem der Oxidationsprodukte aus Abbildung 43; m/z: 270 neuartiges Produkt und Hauptpeak in der Reaktion.

Wurde die Reaktion mit einem Überschuss an Selendioxid (3,0 eq.) durchgeführt, scheint das Produkt mit einer m/z von 270 nicht gebildet zu werden. Hierbei entspricht das Hauptsignal einem der zu erwartenden Oxidationsprodukte (Abbildung 45). Die Reaktion muss nach zwei Stunden abgebrochen werden, da ansonsten eine Vielzahl an Nebenprodukten auftritt, deren m/z nicht zuzuordnen ist.

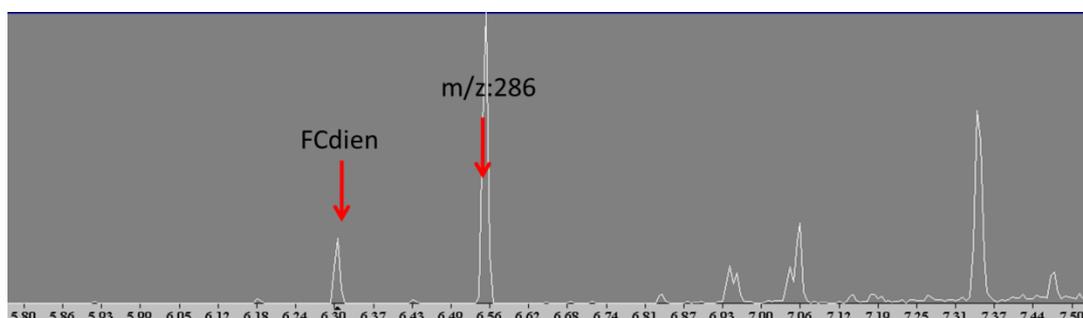


Abbildung 45: GC-MS Chromatogramm im Verlauf der Oxidation mit 3.0 eq. SeO_2 in DCM bei RT nach 2h.

Ergebnisse und Diskussion

Damit die genaue Struktur dieser neuartigen Verbindungen mit einer m/z von 270 und m/z von 286 aufgeklärt werden konnten, wurden die Reaktionen je in einem 12 mg Ansatz durchgeführt. Dies sollte genug Material ergeben, um eine vollständige NMR-Charakterisierung zu ermöglichen, jedoch scheiterten alle Versuche zu Skalierung dieser Reaktion.

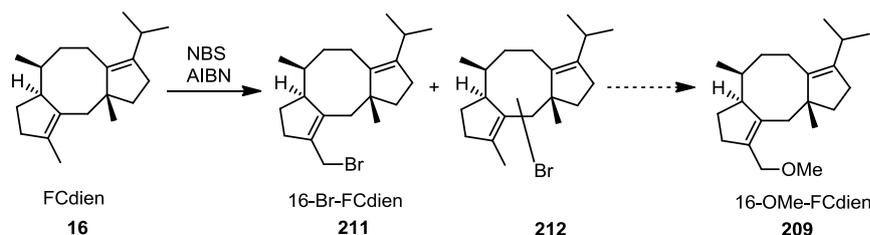
Alternativ wurde die allylische Oxidation des FCdien nach der Methode von K. Shibuya *et al.* mit Ameisensäure oder Essigsäure getestet (Tabelle 20).^[302] Jedoch waren die Resultate nicht sehr vielversprechend. Bei Reaktionen von nur 1,0 eq. Ameisensäure oder Essigsäure bei RT in DCM oder Dioxan wurden nur unspezifische Oxidationsprodukte beobachtet, jedoch nicht die erhofften Ester (Tabelle 20, Einträge 1, 5, 9, 13). Eine Erhöhung der Äquivalente an Ameisensäure oder Essigsäure führten zur Zersetzung des FCdiens (Tabelle 20, Einträge 2-4, 6-7, 10-12, 14-16).

Tabelle 20: Reaktionsbedingungen für die allylische Oxidation von FCdien nach K. Shibuya *et al.* mit Ameisensäure (HCOOH) und Essigsäure (AcOH).^[302]

| Eintrag | SeO ₂ | Säure | Lösemittel | Temp. in °C | Bemerkung |
|---------|------------------|----------------|------------------|-------------|--------------------|
| 1 | 1.0 eq. | 1.0 eq. HCOOH | Dioxan | RT | Oxidationsprodukte |
| 2 | 1.0 eq. | 1.0 eq. HCOOH | Dioxan | 50°C | Edukt zersetzt |
| 3 | 1.0 eq. | 10.0 eq. HCOOH | Dioxan | RT | Edukt zersetzt |
| 4 | 1.0 eq. | 10.0 eq. HCOOH | Dioxan | 50°C | Edukt zersetzt |
| 5 | 1.0 eq. | 1.0 eq. HCOOH | DCM | RT | Oxidationsprodukte |
| 6 | 1.0 eq. | 10.0 eq. HCOOH | DCM | RT | Edukt zersetzt |
| 7 | 1.0 eq. | - | Dioxan/HCOOH 3:1 | 50°C | Edukt zersetzt |
| 8 | 1.0 eq. | - | Dioxan/HCOOH 3:1 | RT | Edukt zersetzt |
| 9 | 1.0 eq. | 1.0 eq. AcOH | Dioxan | RT | Oxidationsprodukte |
| 10 | 1.0 eq. | 1.0 eq. AcOH | Dioxan | 50°C | Edukt zersetzt |
| 11 | 1.0 eq. | 10.0 eq. AcOH | Dioxan | RT | Edukt zersetzt |
| 12 | 1.0 eq. | 10.0 eq. AcOH | Dioxan | 50°C | Edukt zersetzt |
| 13 | 1.0 eq. | 1.0 eq. AcOH | DCM | RT | Oxidationsprodukte |
| 14 | 1.0 eq. | 10.0 eq. AcOH | DCM | RT | Edukt zersetzt |
| 15 | 1.0 eq. | - | Dioxan/AcOH 3:1 | 50°C | Edukt zersetzt |
| 16 | 1.0 eq. | - | Dioxan/AcOH 3:1 | RT | Edukt zersetzt |

4.10.3 Versuche zur Synthese von 16-OMe-FCdien durch allylische Bromierung

Eine alternative Möglichkeit bietet die allylische Bromierung nach Wohl-Ziegler mit N-Bromosuccinimid (NBS) und Azo-bis(isobutyronitril) (AIBN). Obwohl die allylische Bromierung zu Produktgemischen führen kann, wurde zunächst getestet ob FCdien überhaupt zuverlässig bromiert wird und Verbindung **211** von allen anderen Bromierungsprodukten (**212**) isoliert werden kann (Schema 70). Verbindung **211** würde dann im weiteren Verlauf in das 16-OMe-FCdien (**209**) überführt.

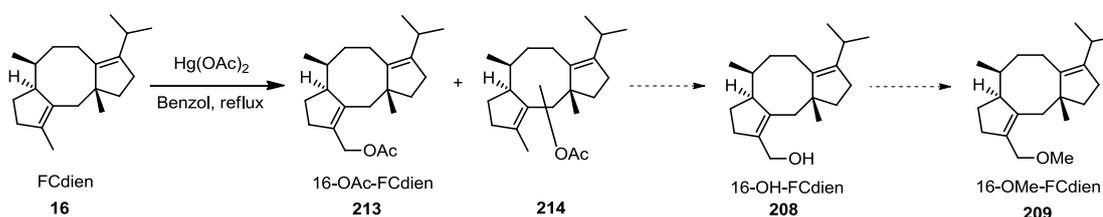


Schema 70: Syntheseveruche zur Darstellung von 16-OMe-FCdien (**209**) mittels allylischer Bromierung.

Jedoch zeigten Testreaktionen keine vielversprechenden Ergebnisse. Die Reaktion führte immer zur Zersetzung des Startmaterials, auch wenn die Reaktionen in unterschiedlichen Lösemitteln (Tetrachlormethan, Dichlormethan) getestet wurden. GC-MS-Analysen konnten keine Spuren der halogenierten Verbindung vom Typ **212** aufweisen.

4.10.4 Versuche zur allylischen Oxidation mit Quecksilber(II)acetat

Oximercurierungen von Olefinen mit Quecksilber(II)acetat ($\text{Hg}(\text{OAc})_2$) sind schon lange bekannt.^[304, 305] Ebenfalls sind Beispiele zur allylischen Oxidation durch Quecksilber(II)acetat bekannt, welche jedoch eine Vielzahl an Produktgemischen ergeben.^[306-309]



Schema 71: Syntheseveruche zur Darstellung von 16-OAc-FCdien (**213**) mittels allylischer Oxidation durch $\text{Hg}(\text{OAc})_2$.

Dennoch wurde versucht eine Acetoxifunktion am FCdien einzuführen (Schema 71). In der Hoffnung **213** von Produkten **214** isolieren zu können. **213** sollte anschließend zu Verbindung **208** verseift und in die Zielverbindung **209** überführt werden. Jedoch schlugen alle Versuche mittels Quecksilber(II)acetat Verbindung **213** zu erhalten fehl.

4.10.5 Weitere Versuche zur allylischen Oxidation mit Cobalt- und Mangansalzen in Gegenwart von TBHP oder Pyridiniumchlorochromat

Basierend auf den zuvor erhaltenen Ergebnissen wurde die Strategie 16-OMe-FCdien zu synthetisieren zurück gestellt. Stattdessen wurde versucht eine Methode zu finden mit der es generell möglich ist FCdien allylisch zu oxidieren und somit potenzielle Michael-Akzeptoren zu synthetisieren (Abbildung 46).

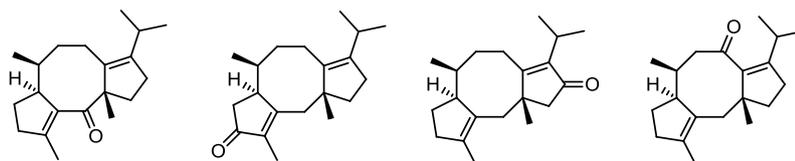


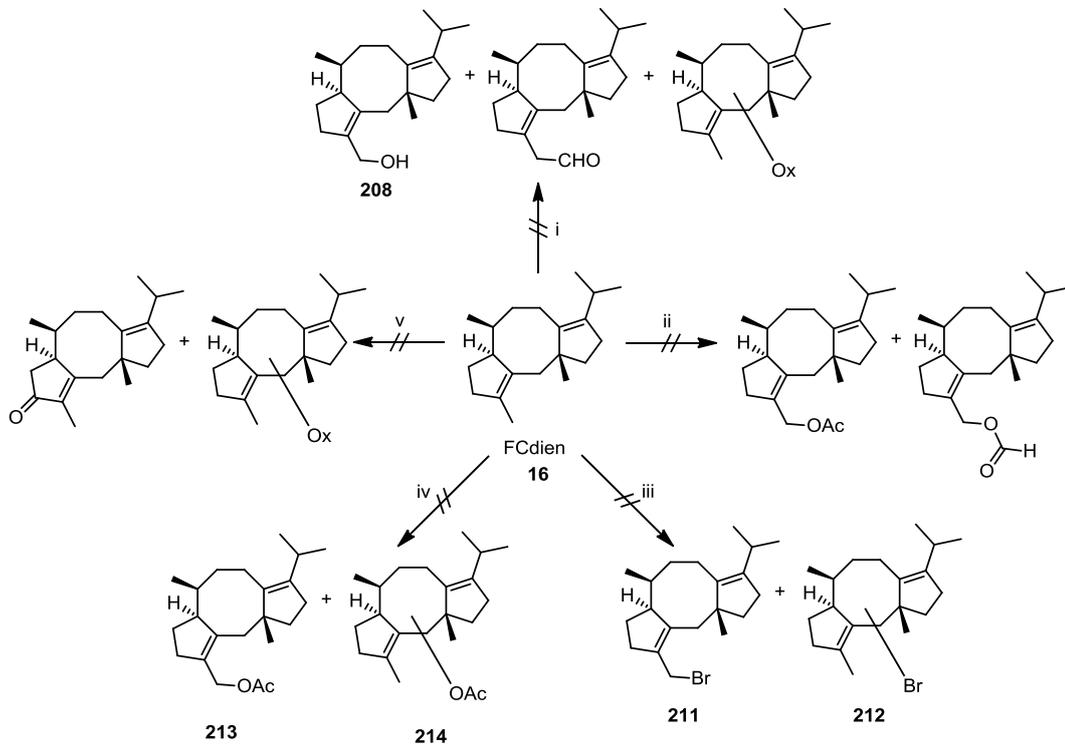
Abbildung 46: Mögliche Produkte durch die allylische Oxidation.

Neben der allylischen Oxidation mit Hilfe von Selendioxid berichteten J. A. R. Salvador und J. H. Clark über eine Cobalt(II)acetat und T. K. M. Shing *et al.* über eine Mangan(III)acetat vermittelte Oxidation in Gegenwart von TBHP.^[310, 311] Auch diese Ansätze führten nur zur Zersetzung des Eduktes. Dies legt die Vermutung nahe, dass FCdien keine Reaktionen toleriert die über radikalische Zwischenstufen verlaufen. W. G. Dauben *et al.* berichteten über eine Methode, Steroide in allylischer Position zu oxidieren.^[312] Dabei verwendeten sie Pyridiniumchlorochromat (PCC).^[313] Im weiteren Verlauf wurden Experimente mit PCC in Dichlormethan durchgeführt. Dabei konnten bei Reaktionszeiten von 24-72 h analog der Oxidation mit 3.0 eq. Selendioxid m/z von 286 gefunden werden, was auf Oxidationsprodukte des FCdien hindeutet. Versuche diese Reaktionen aufzuarbeiten, um eines dieser Oxidationsprodukte zu isolieren und zu charakterisieren gelangen ebenfalls nicht.

4.10.6 Diskussion und Ausblick

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die allylische Oxidation von FCdien derzeit nicht ohne weiteres möglich ist. Versuche zeigten, dass Reaktionen, in denen radikalische Zwischenstufen beteiligt waren, zur Zersetzung des Startmaterials führten. Reaktionen mit Selendioxid, Mangan(III)acetat und Cobalt(II)acetat und TBHP führten ebenso zur Zersetzung des Startmaterials, wie der Versuch der allylischen Bromierung mittels NBS und AIBN. nGC-MS Analyse zeigte, dass Versuche mit Selendioxid und PCC potenzielle Oxidationsprodukte bilden, jedoch gelang die Isolierung und Identifizierung bislang nicht.

Schema 72 zeigt zusammengefasst die Versuche zur allylischen Oxidation und Bromierung von FCdien.



Schema 72: Übersicht über die Versuche zur Darstellung von allylischen FCdien Derivaten. i) SeO₂, DCM; ii) SeO₂, AcOH oder HCOOH, DCM; iii) NBS, AIBN, CCl₄; iv) Hg(OAc)₂, Benzol; v) Mn(III)(OAc)₃ oder SeO₂ oder Co(II)(OAc)₂, TBHP, DCM.

Die partialsynthetische Modifikation von Diterpenen ist in der Literatur nicht hinreichend etabliert, im Gegensatz zur Darstellung von bereits funktionalisierten Diterpenoiden. Die anvisierten Verbindungen stellten sich als aufwändig heraus und erfordern eine sorgfältige Methodenoptimierung oder die Nutzung von enzymatischen Verfahren. Letzteres wird derzeit von J. Arens untersucht.

5 Zusammenfassung

Trotz ihrer hohen strukturellen und funktionellen Diversität unterliegen Polyketide einem gemeinsamen biosynthetischen Ursprung. In der Semisynthese müssen Polyketide chemoselektiv, regioselektiv und stereoselektiv manipuliert werden.^[42, 43, 69] Dies erfordert nicht selten eine ausgefeilte Schutzgruppenstrategie und häufig auch die Entwicklung neuartiger Synthesemethoden. Um dieses Problem zu umgehen, ermöglichen Mutagenesetechniken den Einbau von nicht-natürlichen Bausteinen, die eine Modifikation des Polyketides selektiv ermöglichen.^[14, 44, 45, 47-54] Jedoch sind bedingt durch die Größe und die Multidomänenarchitektur der PKS herkömmliche Mutagenesestrategien ineffektiv.^[119, 314, 315] Die vorliegende Arbeit begann mittels klassischer Mutasynthese die Starteinheit des Tumortherapeutikums Rapamycin zu modifizieren. Dazu sollten ausgehend von *rac*-Cyclohex-3-en-carbonsäure (**24**) und der *cis*- und *trans*-Cyclohexandicarbonsäure (**22** und **23**) DHCHC (**21**) Analoga synthetisiert werden, um neue Rapamycinderivate zu erhalten. Einige der Bausteine enthalten bioorthogonale Reaktivitäten. Durch deren Einbau sollte nachfolgend eine regioselektive Modifikation des Rapamycinderivates erleichtert werden. Die dazu synthetisierten oder kommerziell erworbenen Starteinheitanaloga werden in Abbildung 47 gezeigt.

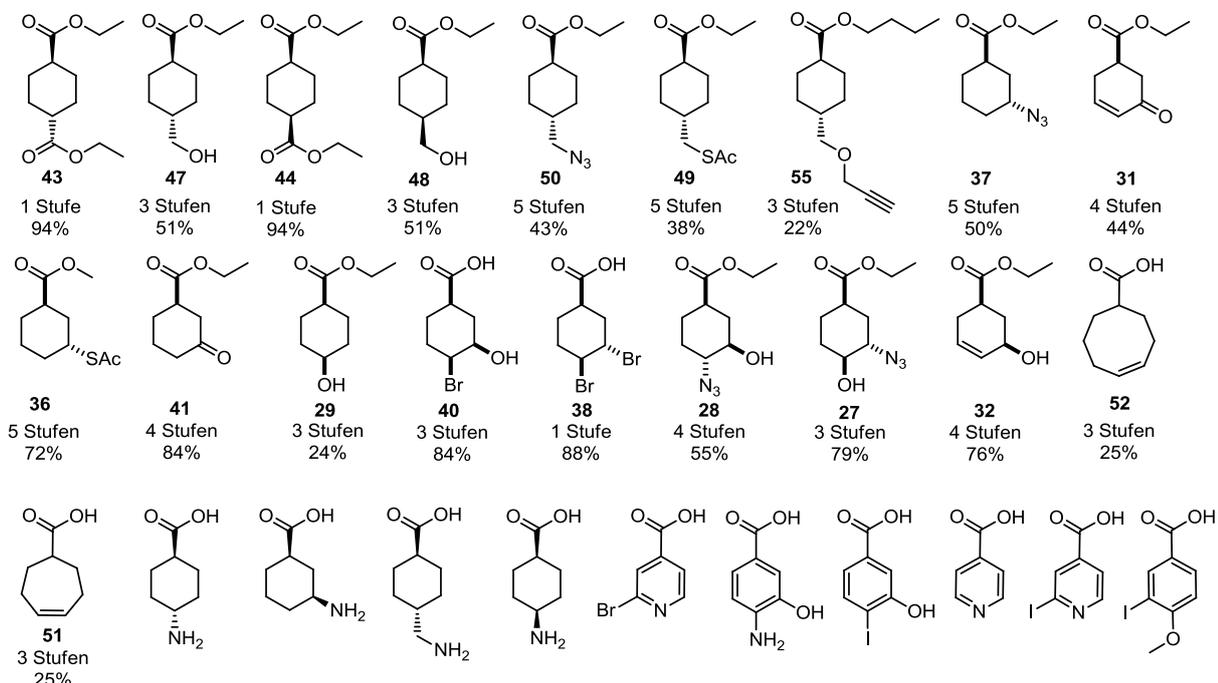
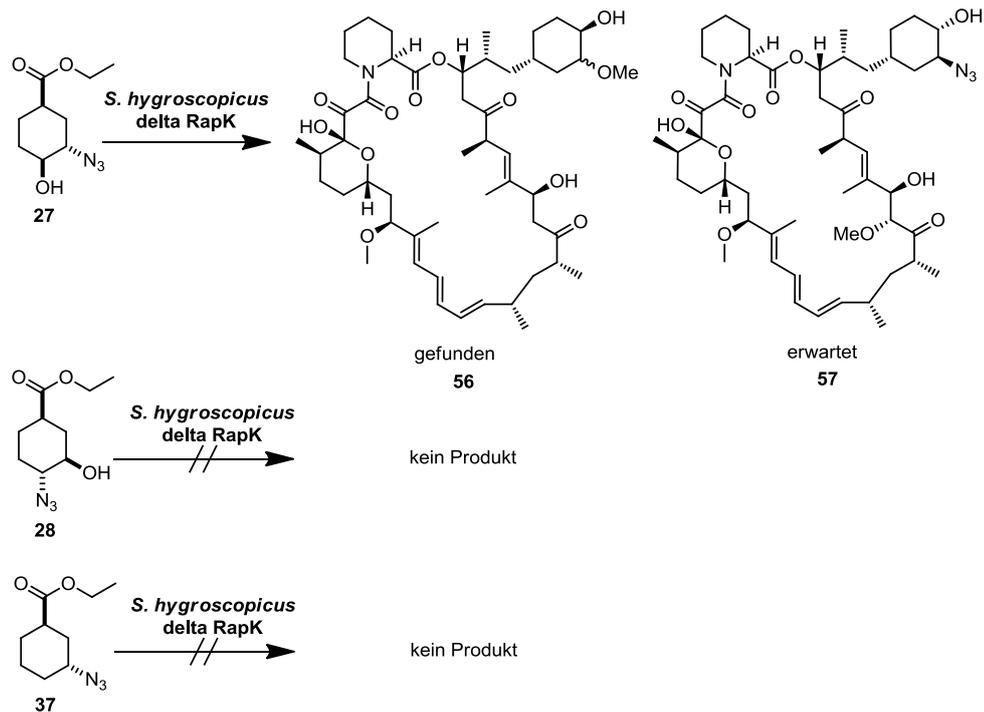


Abbildung 47: Strukturen der getesteten Starteinheitanaloga, inklusive Angaben zur Länge der Syntheseroute und Ausbeute über alle Stufen.

Nur die getestete Verbindung **27** wurde durch eine Blockmutante eingebaut. Dieser Baustein besitzt eine Azid-Funktion. Wiedererwartend ergab der Einbau jedoch kein Rapamycinderivat mit einer bioorthogonalen Funktionalität. Die Struktur des erhaltenen Rapamycinderivates zeigt vielmehr, dass das Azid abgebaut wurde. Die Fütterung der strukturverwandten Analoga **27** und **37** führten hingegen nicht zur Bildung neuer Rapamycinderivate (Schema 73).



Schema 73: Zeigt die Regioisomere **27** und **28** und Verbindung **37**. Nur **27** führte zur Bildung eines neuen Rapamycinderivats.

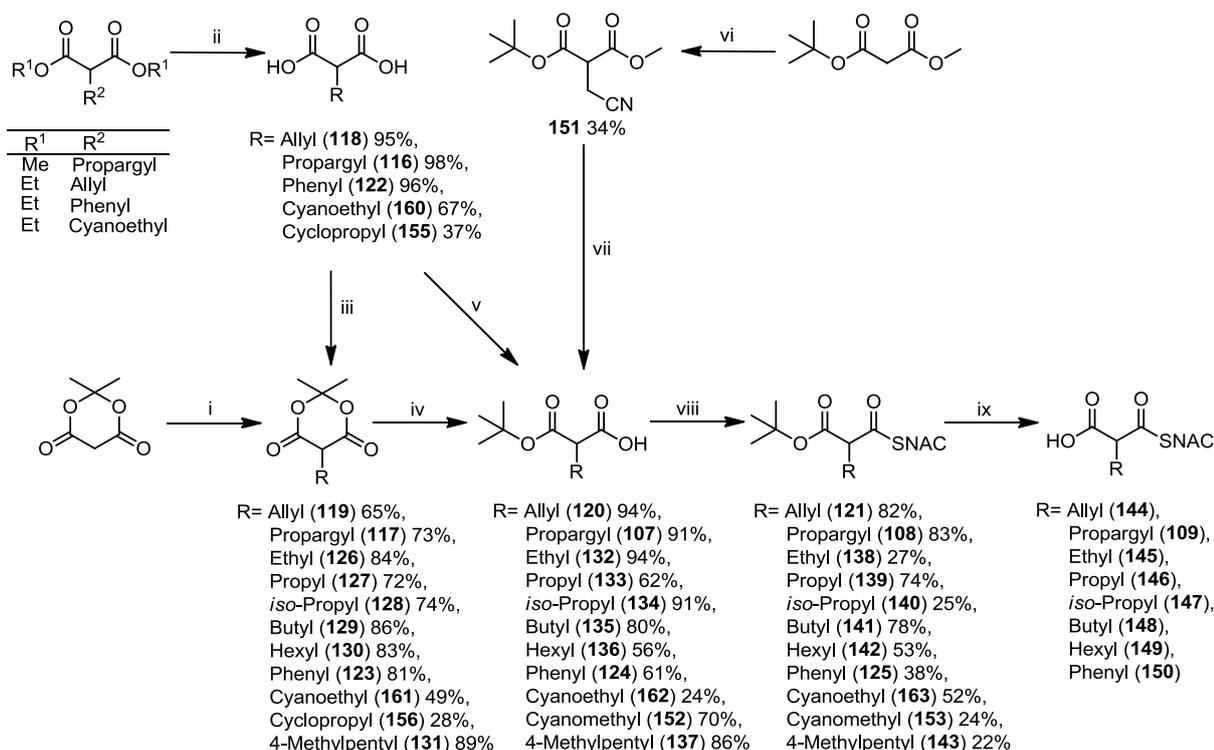
Die Mutasynthese erfordert einen teils unverhältnismäßig hohen molekularbiologischen und chemischen Aufwand, um neue Polyketidderivate aus nicht-natürlichen Start- oder Endeinheiten zu erhalten. Oftmals ist deren Einbau nicht planbar, was die Effizienz der Experimente limitiert und eine Rationalisierung der Experimente verhindert. Außerdem ist die Mutasynthese intrinsisch auf Start- und Endeinheiten der Polyketidbiosynthese limitiert, Verlängerungseinheiten können nicht adressiert werden. Daher stellte sich die Frage, ob es nicht möglich ist, einen wesentlich rationaleren Weg einzuschlagen, der es ermöglicht einen selektiven Einbau zu gewährleisten. Dazu müsste die Substratspezifität einer spezifischen Acyltransferase (AT) innerhalb einer PKS geändert werden, was detaillierte Kenntnisse und möglichst viele Daten über die PKS erfordert. Dieses Konzept wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter der Bezeichnung „enzymgeleitete Mutasynthese“ vorgeschlagen.

Zusammenfassung

Es wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen die zielgerichtete Mutagenese einer AT und zum anderen die Generierung einer *cis-/ trans*-Hybrid PKS.

Bei der zielgerichteten Mutagenese generierte Dr. U. Sundermann die AT₆_{DEBS}-Varianten, mit denen der Zugang zu neuen Erythromycinderivate ermöglicht werden sollten. Durch einen geringeren sterischen Anspruch von Aminosäureresten im katalytischen Zentrum des Enzyms, sollte genügend Platz erzeugt werden, sodass Malonsäurederivate mit verschiedenen Substituenten an C-2 akzeptiert werden konnten. Im Rahmen dieser Arbeit sollten dazu eine Vielzahl an Malonsäurederivaten synthetisiert werden, um die Substratpromiskuität der erzeugten Varianten systematisch zu testen.

Folgendes allgemeines Syntheschema lässt sich für die Synthese der SNAC-aktivierten Malonate unter Berücksichtigung reaktionsbedingter Limitationen anwenden. Schema 59 zeigt die Ausbeuten und Zwischenstufen zur Synthese der lagerstabilen *tert.*-Butylmalonsäure-SNAC-esterderivate **109**, **144-150**.



Schema 74: Syntheseübersicht. i) 1.0 eq. Boranedimethylaminkomplex, 3.0 eq. Aldehyd, 1h, RT; ii) 3.0 eq. LiOH·H₂O, H₂O, 18h, RT; iii) 1.01 eq. Isoprenylacetate, 0.06 eq. H₂SO₄, Lösemittel frei, 18h, RT, 2.0 eq. Aceton, 2.0 eq. Ac₂O, 0.06 eq. H₂SO₄, 18h, RT (für **156**, **161**); iv) *t*BuOH, 6h, 90-100°C; v) 2.5 eq. *t*BuOH, 2.0 eq. DIC, 0.06 eq. CuCl, Ar, RT, 4d, 24%; vi) 2.0 eq. Bromoacetonitril, 1.0 eq. NaH (60% w/t), THF, RT, 18h, Ar, 34%; vii) 1.0 eq. LiOH·H₂O, THF/MeOH/H₂O 7:2:1, RT, 1h, 70%; viii) 1.1 eq. CDI, 0.3 eq. DMAP, 1.2 eq. SNAC, THF, 18h, RT; ix) 2.5 eq. TiCl₄, DCM, 6h.

Die Reaktionen sind robust und können problemlos in Ansätzen bis zu 50 g skaliert werden. In Abbildung 48 sind die Verbindungen, die in den Fütterungsexperimenten eingesetzt wurden inklusive Gesamtausbeute dargestellt. Mit den Verbindungen Allyl-MSNAC und Propargyl-MSNAC erlaubt diese Syntheseroute zwei SNAC-aktivierte Malonsäurederivate in präparativ nutzbaren Maßstab zu synthetisieren, mit denen später potenziell regioselektive Chemie betrieben werden kann.

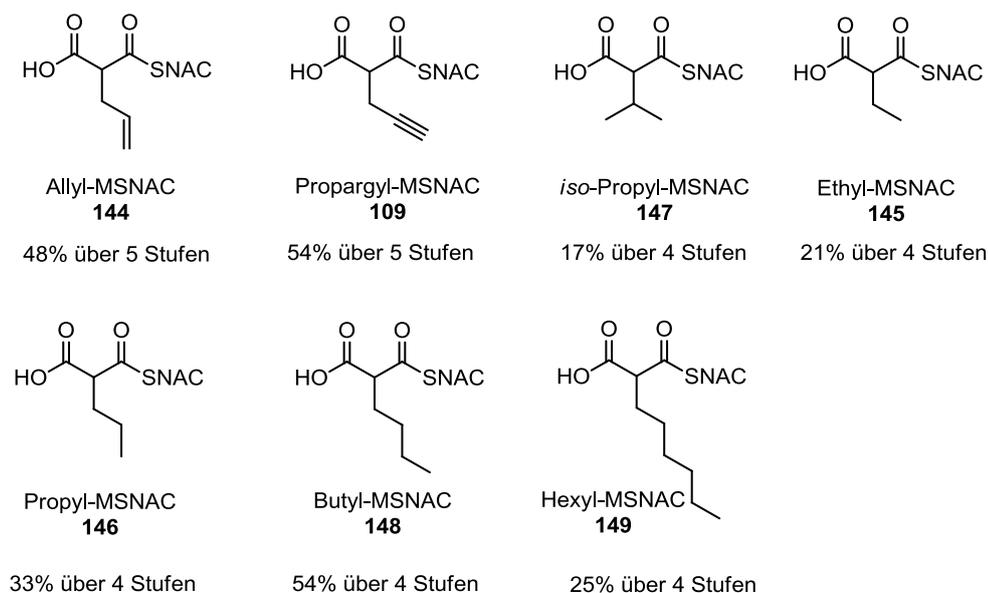


Abbildung 48: Verbindungen **109**, **144-149** unter Angabe der Gesamtausbeuten. Diese Verbindungen wurden in Fütterungsexperimenten eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Punktmutation (V295A), eine signifikante Substratrelaxation in der Selektivität der AT6_{DEBS} verursacht. Die mutierte AT6 kann verschiedene neue Substrate akzeptieren, die sich im Sättigungsgrad der C-C-Bindungen der Malonylseitenkette unterscheiden. Einer der Hauptfaktoren, der den Einbau neuer Substrate kontrolliert, ist die Größe und die Flexibilität der Seitenkette. Große und sterisch anspruchsvolle Seitenketten wie Hexyl-MSNAC und *iso*-Propyl-MSNAC werden weder von der AT6_{DEBS}, noch von den Mutanten V295A, V295L oder V295G, als Substrate akzeptiert. Kürzere, rigide und kleinere Gruppen, wie Propargyl-MSNAC, Ethyl-MSNAC und Allyl-MSNAC werden eingebaut (Abbildung 49).

Zusammenfassung

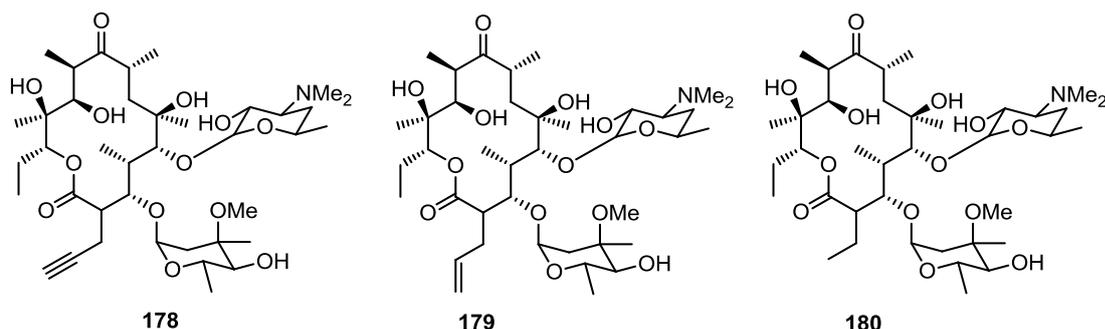


Abbildung 49: Mittels HRMS-Analyse bestätigte Erythromycinderivate.

Die vergleichsweise niedrige Einbaurate kann mit der Tatsache erklärt werden, dass das native Substrat MMCoA, welches immer noch von der V295A Enzymvariante akzeptiert wird, *in vivo* in wesentlich höheren Konzentrationen zu Verfügung steht. Starre Gruppen wie das Propargylmotiv nehmen innerhalb der aktiven Seite eine passende Orientierung ein. Kleine flexible Gruppen, wie in Ethyl-MSNAC richten sich nach der natürlichen Orientierung der Seitengruppe von MMCoA aus.

Somit kann rückwirkend auf die Synthese verschiedener Malonate folgende Schlussfolgerung gezogen werden. Der Einbau von Malonsäurederivaten deren Seitenkette größer als drei Kohlenstoffatome ist wird vermutlich nicht als Substrat der V295A akzeptiert, da das katalytische Zentrum nicht genügend Platz bietet. Somit kann im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Substratspezifität durch Mutagenese geändert werden kann und durch eine einzelne Punktmutation der Einbau nicht-nativer Substrate gelingt. Eine einzige Punktmutation in der aktiven Seite des Enzyms war ausreichend, um Substratpromiskuität hervorzurufen, die es ermöglicht Substrate mit einer begrenzten Größe der Seitenkette zu tolerieren. Dies zeigt, dass das Prinzip der Entwicklung von kleinen Enzymen für spezielle biologische Prozesse, sich auch auf die großen PKS transferieren lässt.^[316-318] Es bedarf aber noch genauerer enzymatischer Studien, um signifikanten präparativen Nutzen aus dieser Strategie zu ziehen.

Für die Generierung einer *cis/trans*-Hybrid-PKS wurden nach Optimierung der Syntheserouten folgende Reportermoleküle im präparativen Maßstab synthetisiert (Abbildung 50).

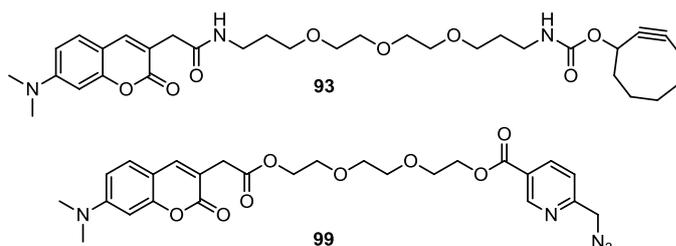
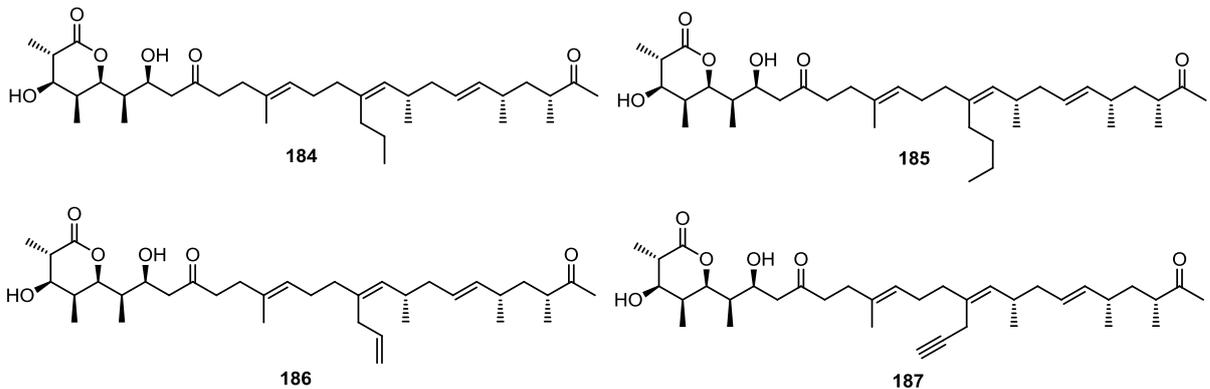


Abbildung 50: Struktur der Reportermoleküle **93** und **99**.

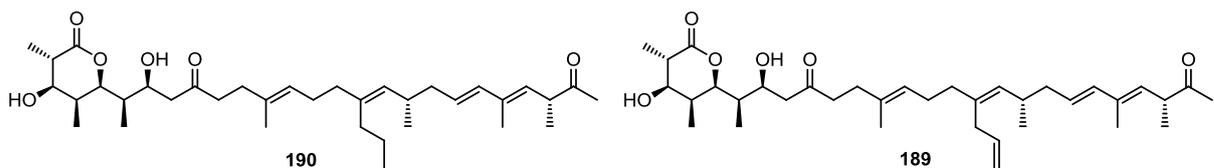
Diese Reportermoleküle sollten verwendet werden, um die Substratspezifität der MCAT-Varianten gegenüber kompatibel funktionalisierten Malonsäurebausteinen zu überprüfen. Jedoch sorgte der rasante Fortschritt im *cis*-AT-Projekt, dass das *cis*-/*trans*-AT-Hybridprojekt und somit auch die Notwendigkeit der Reportermoleküle, zunächst eingestellt wurden.

Des Weiteren wurde die natürliche Substratpromiskuität der AT_{5mon}, sowohl des Premonensinproduzenten, des Premonensinproduzenten Δ ER2⁰, als auch dem Monensinproduzenten *S. cinnamomensis* ausgenutzt um neue Derivate dieser Naturstoffe zu erhalten. Dazu wurden jeweils Propargyl-MSNAC, Allyl-MSNAC, Propyl-MSNAC, Butyl-MSNAC und Hexyl-MSNAC dem Fermentationsmedium zu gesetzt. Dies führte zu neuen Derivaten (Abbildung 51).

Premonensinderivate:



Premonensin ER2⁰ Derivate



Monensinderivate:

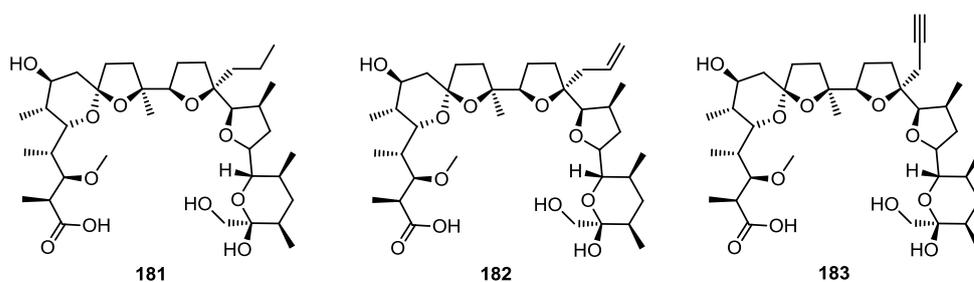
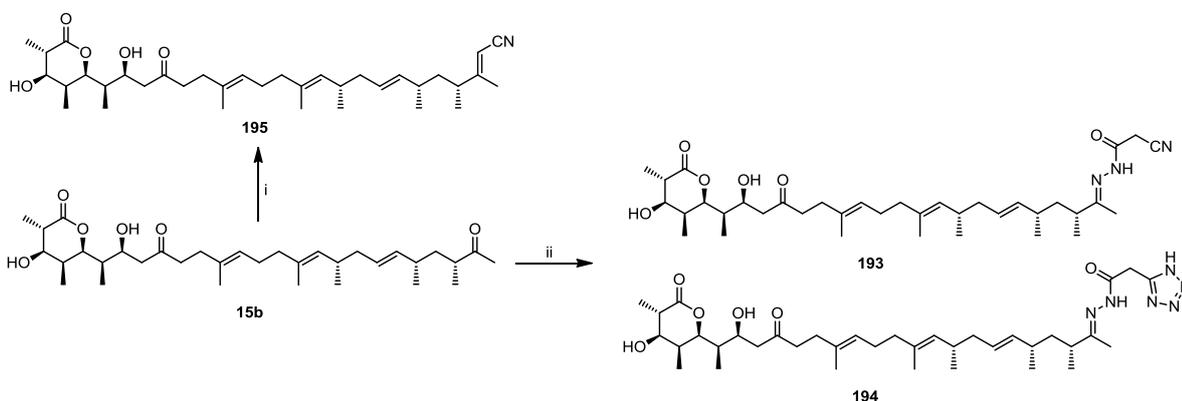


Abbildung 51: Durch die Fütterung von Propargyl-MSNAC, Allyl-MSNAC, Propyl-MSNAC und Butyl-MSNAC erhaltenen Premonensin-, Premonensin Δ ER2⁰- und Monensinderivate.

Zusammenfassung

Ein *in silico* Modell der AT5_{mon} ermöglichte es, einen detaillierten Einblick in den Aufbau dieses Enzyms zu bekommen und den Einbau von nicht-nativen Substraten im Wildtypsystem vorherzusagen. Diese Vorhersagen wurden durch systematisches Screening von nicht-nativen Malonsäurederivaten als *building-blocks* für die Monensin-PKS bestätigt. Die Toleranz eines neuen Propargyl-Motivs in der Struktur des Premonensins und Monensins eröffnet neue Möglichkeiten für die Entdeckung neuer bioaktiver Substrate durch weitere chemische Modifikationen. Durch die Substratpromiskuität der AT5_{mon} erhält man Zugang zu Propargyl-, Allyl-, Butyl-Premonensin.

Unsere Experimente zeigten eine hohe Affinität von Premonensin zur humanen Phosphodiesteraseuntereinheit PDE δ . Dieses Protein spielt eine wichtige Rolle im K-Ras Signalweg.^[237-239] Dessen Inhibierung durch geeignete Substrate zeigt cytotoxische Effekte bei K-RAS abhängigen humanen Pankreaskarzinomen.^[248] PDE δ trägt am Ende seiner ansonsten hydrophoben Bindetasche ein Arginin. So entstand die Idee, Premonensin an seinem Methylketon mit einem negativgeladenen Substituenten zu versehen. Im Fokus stand dabei das Tetrazol, häufig eingesetzt als Bioisoster einer Carbonsäure. Das Methylketon sollte in Konkurrenz zu dem β -Hydroxyketon in Olefinierungsreaktionen oder unter Carbazonbildung umgesetzt werden. Die dafür notwendigen Tetrazolbausteine wurden synthetisiert, Carbazonbindungen, sowie HWE-Reaktionen erfolgten in Testreaktionen mit Modellverbindungen und lieferten teils hohe Ausbeuten. Eine Übertragung auf das chemisch und thermisch labile und nur in geringen Mengen verfügbare Premonensin konnte aufgrund der zeitlichen Beschränkung der Arbeit nicht zu präparativ wertvollen Ergebnissen führen (Schema 75).



Schema 75: Semisynthetische Ansätze zur Derivatisierung von Premonensin B. i) Derivatisierung durch Wittigreaktionen oder HWE-Olefinierung, ii) Derivatisierung mittels Hydrazonen in 1 M Natriumacetatpuffer pH 4,5. Der Maßstab der Reaktionen lag bei ca. 1 mg.

Zusammenfassend kann man sagen, das Premonensin ein sehr fragiles Molekül ist. Es beginnt bei Temperaturen von 40°C sich zu zersetzen. Basen als Additive in Reaktionen werden ebenso wenig toleriert wie basische Lösemittel (Pyridin). Säuren werden bedingt toleriert. Solange der pH nicht kleiner als pH 4,5 ist, ist Premonensin für einen kurzen Zeitraum stabil. Die Zersetzung von Premonensin wird zusätzlich gefördert durch Lewis-Säuren, wie Lithium-, Zink-, oder Titansalzen. Damit sind die Möglichkeiten, Premonensin an dem Methylketon semisynthetisch zu modifizieren sehr begrenzt. Eine wesentlich effizientere Möglichkeit würden die Modifikationen der Allyl- bzw. Propargyl-Seitenkette des Premonensins erzielen. Unter dem Vorbehalt, effektivere PDE δ -Inhibitoren zu erzeugen sind die Seitenkettenmodifikationen aktuell keine Option, jedoch könnte deren Modifikation andere Eigenschaften verstärken.

Für die Versuche der Oxidation des Diterpens Fusicoccadien kann zusammenfassend gesagt werden, dass die allylische Oxidation von FCdien derzeit nicht selektiv möglich ist. Versuche zeigten, dass Reaktionen, in denen radikalische Zwischenstufen beteiligt waren, zur Zersetzung des Startmaterials führten. Reaktionen mit Selendioxid, Mangan(III)acetat bzw. Cobalt(II)acetat unter Zugabe von TBHP führten ebenso zur Zersetzung des Startmaterials, wie der Versuch der allylischen Bromierung mittels NBS und AIBN. GC-MS-Analyse zeigte, dass Versuche mit Selendioxid und PCC Oxidationsprodukte bilden, jedoch gelang die Isolierung und Identifizierung bislang nicht. Die partialsynthetische Modifikation von Diterpenen ist in der Literatur nicht hinreichend etabliert, im Gegensatz zur Darstellung von bereits vor funktionalisierten Diterpenoiden. Die anvisierten Verbindungen sind aufwändig und erfordern eine sorgfältige Methodenoptimierung oder die Nutzung von enzymatischen Verfahren. Letzteres wird derzeit von J. Arens untersucht.

6 Experimenteller Teil

6.1 Analysemethoden

6.1.1 NMR-Spektroskopie

Die Spektren der Verbindungen wurden mit ^1H -NMR bei 400 MHz und ^{13}C -NMR bei 101 MHz an einem Varian Mercury 400 Spektrometer aufgenommen. Die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale erfolgte falls nötig über gCOSY- und gHSQC-Spektren. Die 1D- und 2D-NOESY-Spektren wurden an einem *Bruker 600* (600 MHz) Spektrometer aufgenommen. Als interner Standard dienten die Restprotonen der deuterierten Lösungsmittel $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$ ($\delta_{\text{H}} = 7,26$ ppm, singulett; $\delta_{\text{C}} = 77,0$ ppm, triplett), MeOD-d_4 ($\delta_{\text{H}} = 3,31$ ppm, quintett, $\delta_{\text{H}} = 4,84$ ppm, singulett; $\delta_{\text{C}} = 49,05$ ppm, septett), $\text{D}_2\text{O-d}_2$ ($\delta_{\text{H}} = 4,79$ ppm, singulett), DMSO-d_6 ($\delta_{\text{H}} = 2,50$ ppm, quintett; $\delta_{\text{C}} = 39,50$ ppm, septett). Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm (parts per million) und die Kopplungskonstanten in Hz (Hertz) angegeben. Für die auftretenden Spin-Spin-Kopplungen werden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Duplett), dd (Dublett vom Dublett), dt (Duplett vom Triplet), dtd (Duplett vom Triplet vom Duplett), tt (Triplet vom Triplet) und m (Multiplet).

6.1.2 Massenspektroskopie GC-MS

Für die GC-MS wurde ein Hewlett Packard 6890 Serie GC-System mit einem Hewlett Packard 5973 Mass Selective Detector eingesetzt, bestückt mit einer HP19091M-102 HP-5 (325°C max.) Trace Analysis Säule mit 5% Phenyl-Methylsiloxan. Für die Analyse wurden zwei Methoden verwendet:

Methode 1: DB_50_S

Druck: 2,100 bar

Flussrate: 105 ml/min

Beginnt mit 50°C für 2 min unter anschließendem Erhitzen mit einem Temperaturgradienten von 40°C/min für 5.75 min auf 300°C und einer weiteren Verweilzeit von 14 min bei 300°C.

Methode 2: DB_100_S

Druck: 2,499 bar

Flussrate: 105 ml/min

Beginnt mit 100°C für 1 min unter anschließendem Erhitzen mit einem Temperaturgradienten von 40°C/min für 5 min auf 300°C und einer weiteren Verweilzeit von 11 min bei 300°C.

6.1.3 Massenspektroskopie LC-ESI-MS

6.1.3.1 LC-ESI-MS Analytik

Die Proben wurden mit einer Agilent 1100 Serie und einem Accela HPLC-System (bestehend aus Pumpe, Autosampler, Säulenofen und PDA Detektor) gemessen, welches *online* an ein Orbitrap Massenspektrometer (ausgestattet mit einer Finnigan LTQ XL linear ion trap; Thermo Electron Corporation, Dreieich, Deutschland) gekoppelt war. Parallel erfolgte eine UV Detektion bei 210 nm und 254 nm. Alle eingesetzten Eluenten waren analysenrein (Chromasolv Deutschland). Bis zu 15 µl der jeweiligen Probe wurden mittels Autosampler (T= 10°C) bei einer Flussrate von 500 µl/min auf eine CC12514 Nucleodur C18 Gravity Säule (3 µm, Macherey-Nagel Deutschland) oder bei einer Flussrate von 250µl/min auf eine EC15012 Nucleodur C18 ISIS Säule (3 µm, Macherey-Nagel Deutschland) aufgetragen.

Für die massenspektrometische Detektion wurde die Elektronensprayionisation im positiven Ionisationsmodus für Erythromycin, Prämonensin, Monensin und im negativen Ionisationsmodus für Rapamycin unter Verwendung einer Spannung von 4 kV eingesetzt. Die Spannung der Kapillare wurde auf 41 V und die Kapillartemperatur auf 275°C gesetzt. Die Spektren wurden durch eine Scan-Methode mit einer Massen-zu-Ladungs-Spanne von 200 bis 2000 aufgenommen. Die Auflösung in der Orbitrap wurde auf 60.000 und der FTMS *full AAGC target* auf 500.000 gesetzt. Für die interne Kalibrierung wurde eine *lock mass* von 391,2843 (Diisooctylphthalat) verwendet.

Erythromycin und dessen Derivate

Das Fermentationsmedium wurde mit doppeltem Volumen an EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde mittels "Speedvac" oder *in vacuo* (Wasserbad 30°C) aufkonzentriert. Der Rückstand wurde in 0,5 ml MeOH aufgenommen und falls nötig mittels HPLC-Filter von unlöslichen Rückständen befreit. 5 µl wurden für die Analyse verwendet.

CC12514 Nucleodur C18 Gravity Säule unter Verwendung eines linearen Gradienten, Start bei 80% Eluent A / 20% Eluent B, welcher innerhalb von 10 min zu 0% Eluent A / 100% Eluent B ansteigt. Im Anschluss hieran wurde für die Säule für 5 min mit 0% Eluent A / 100% Eluent B gewaschen bevor sie während weiterer 5 min auf die Ausgangskonditionen reequilibriert wurde.

Experimenteller Teil

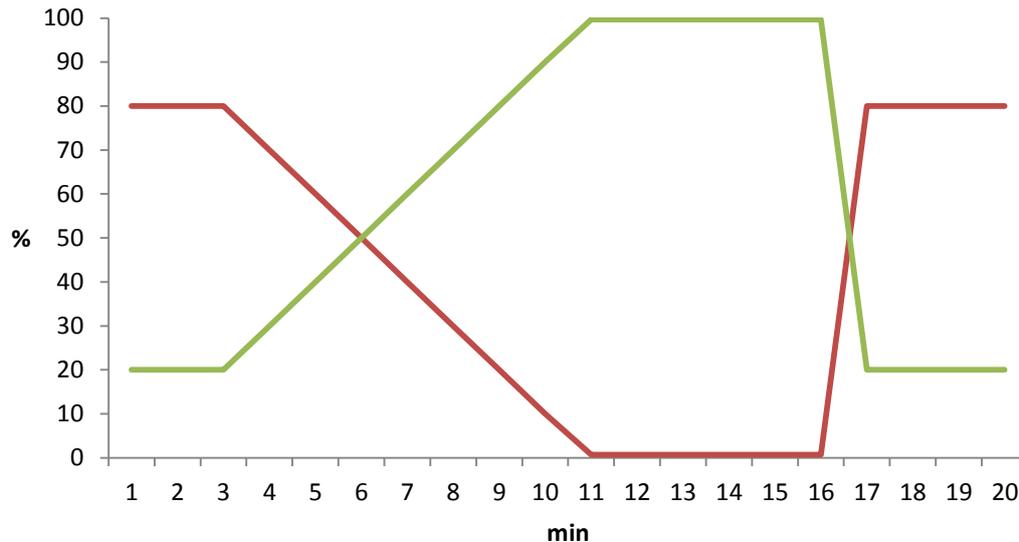


Abbildung 52: Gradient des Eluentengemisches für Erythromycin auf einer CC12514 Nucleodur C18 Gravity Säule mit einer Flussrate von 500 µl/min, — Eluent A: doppeltdeionisiertes Wasser mit 0,1% HCOOH; — Eluent B: Acetonitril mit 0,1% HCOOH; Säulentemperatur: RT.

Folgende Massen wurden fragmentiert:

$m/z = 734$ (Erythromycin, $C_{37}H_{68}NO_{13}^+$)

$m/z = 748$ (2-Ethylerythromycin, $C_{38}H_{70}NO_{13}^+$)

$m/z = 758$ (2-Propargylerythromycin, $C_{39}H_{68}NO_{13}^+$)

$m/z = 760$ (2-Allylerythromycin, $C_{39}H_{70}NO_{13}^+$)

Rapamycin und dessen Derivate

1 ml Fermentationsextrakt wurden in ein 2 ml Polypropylentube überführt und für 30 min bei 4°C und 20.000 G zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein weiteres Polypropylentube überführt und nicht verworfen. Zum Pellet wurden 0,5 ml MeOH gegeben und die Suspension wurde für 3 h bei 1000 rpm geschüttelt. Anschließend für 30 min bei 4°C und 20.000 G zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem Kolben überführt, mit doppeltem Volumen an MeCN versetzt und bei 30°C *in vacuo* aufkonzentriert. Der verbleibende Rückstand wurde in 0,5 ml MeOH aufgenommen.

Beide MeOH-Fractionen wurden zusammengeführt und falls nötig mittels HPLC-Filter von unlöslichen Rückständen befreit. 5 µl wurden für die Analyse verwendet auf einer CC12514 Nucleodur C18 Gravity Säule unter Verwendung eines linearen Gradienten bei 60°C. Start bei 18% Eluent A2 / 82% Eluent B2 welcher innerhalb von 10 min zu 0% Eluent A2 / 100% Eluent B2 anstieg. Im Anschluss hieran, wurde für die Säule für 5 min mit 0% Eluent A2 / 100% Eluent B2 gewaschen, bevor sie für weitere 5 min auf die Ausgangskonditionen reequilibriert wurde.

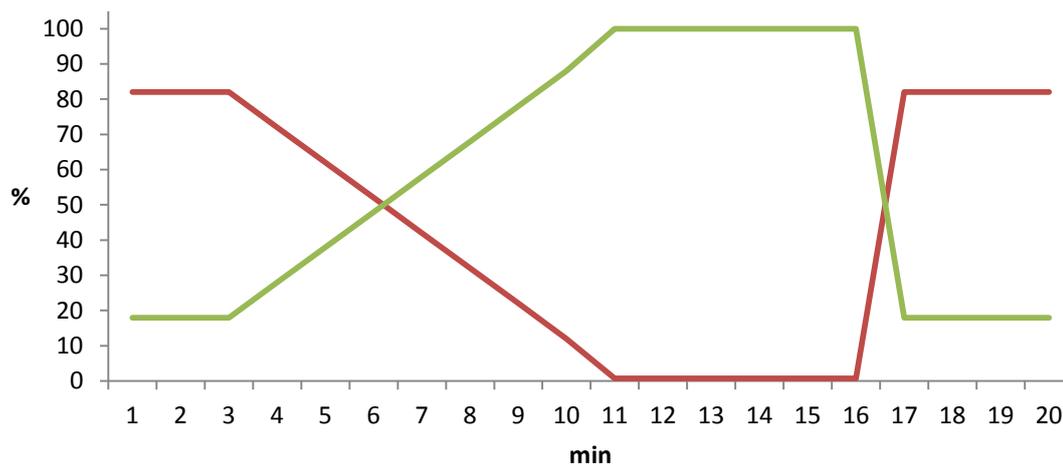


Abbildung 53: Gradient des Eluentengemisches für Rapamycin auf einer CC12514 Nucleodur C18 Gravity Säule mit einer Flussrate von 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ bei 60°C; — Eluent A2: doppeldeionisiertes Wasser mit 10 mM NH_4OH ; — Eluent B2: MeOH mit 10 mM NH_4OH ; Säulentemperatur: 60°C.

Folgende Massen wurden fragmentiert:

$m/z = 936$ (Rapamycin, $\text{C}_{51}\text{H}_{79}\text{NNaO}_{13}^+$)

$m/z = 906$ (RapK Mutante $\text{C}_{50}\text{H}_{77}\text{NNaO}_{12}^+$; nach Fütterung mit Cyclohexancarbonsäure bzw. Verbindung **27**)

Monensin und dessen Derivate

Das Fermentationsmedium wurde mit doppelten Volumen an EtOAc über Nacht extrahiert. Die organische Phase wurde mittels "Speedvac" oder *in vacuo* (Wasserbad 30°C) aufkonzentriert. Der ölige Rückstand wurde mit 5-10 ml *iso*-Hexan verdünnt und mittels eines MeOH/ H_2O 4:1gemisch extrahiert. 0,5 ml des MeOH/ H_2O 4:1 wurden aufgenommen und falls nötig mittels HPLC-Filter von unlöslichen Rückständen befreit. 5 μl wurden für die Analyse verwendet.

CC12514 Nucleodur C18 Gravity Säule unter Verwendung eines linearen Gradienten, Start bei 20% Eluent A / 80% Eluent B, welcher innerhalb von 10 min zu 5% Eluent A / 95% Eluent B ansteigt. Im Anschluss hieran wurde für die Säule für 5 min mit 0% Eluent A / 100% Eluent B gewaschen bevor sie weitere 5 min auf die Ausgangskonditionen reequilibriert wurde.

Experimenteller Teil

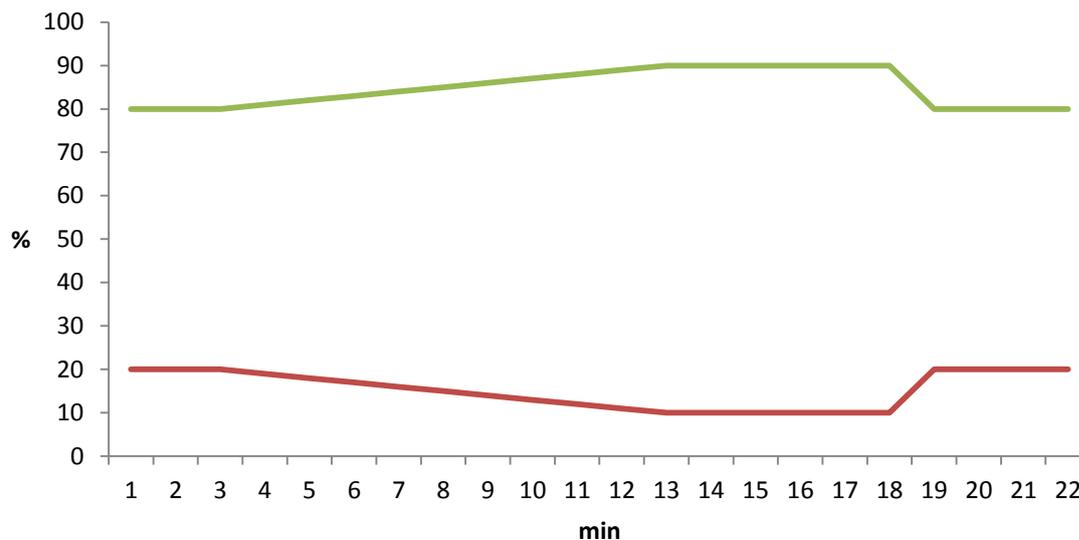


Abbildung 54: Gradient des Eluentengemisches für Rapamycin auf einer CC12514 Nucleodur C18 Gravity Säule mit einer Flussrate von 500 $\mu\text{l}/\text{min}$; — Eluent A: doppeltdeionisiertes Wasser mit 0,1% HCOOH; — Eluent B: MeOH mit 0,1% HCOOH; Säulentemperatur: RT.

Folgende Massen wurden fragmentiert:

$m/z = 703$ (Propargylmonensin, $\text{C}_{37}\text{H}_{60}\text{NaO}_{11}^+$)

$m/z = 705$ (Allylmonensin, $\text{C}_{37}\text{H}_{62}\text{NaO}_{11}^+$)

$m/z = 703$ (Propylmonensin, $\text{C}_{37}\text{H}_{64}\text{NaO}_{11}^+$)

Premonensin und dessen Derivate

Zellrückstände und XAD-Harz wurden über Nacht mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde mittels "Speedvac" oder *in vacuo* (Wasserbad 30°C) aufkonzentriert. Der Rückstand wurde in 0,5 ml MeOH aufgenommen und falls nötig mittels HPLC-Filter von unlöslichen Rückständen befreit. 5 μl wurden für die Analyse auf einer EC15012 Nucleodur C18 ISIS Säule unter Verwendung eines linearen Gradienten benutzt. Start bei 28% Eluent A / 72% Eluent B welcher innerhalb von 16 min zu 0% Eluent A / 100% Eluent B ansteigt. Im Anschluss hieran wurde für die Säule für 4 min mit 0% Eluent A / 100% Eluent B gewaschen, bevor sie weitere 4 min auf die Ausgangskonditionen reequilibriert wurde.

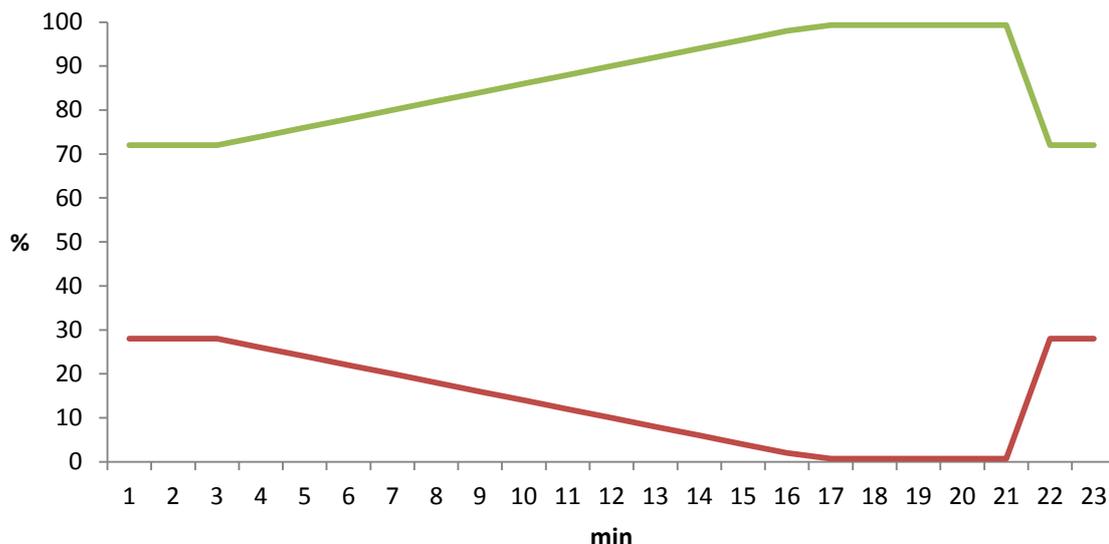


Abbildung 55: Gradient des Eluentengemisches für Premonensin auf einer EC15012 Nucleodur C18 ISIS Säule mit einer Flussrate von 250 $\mu\text{l}/\text{min}$; — Eluent A: doppeltdeionisiertes Wasser mit 0,1 % HCOOH; — Eluent B: Acetonitril mit 0,1 % HCOOH; Säulentemperatur: RT.

Folgende Massen wurden fragmentiert:

$m/z = 587$ (Allylpremonensin, $\text{C}_{36}\text{H}_{59}\text{O}_6^+$)

$m/z = 585$ (Propargylpremonensin, $\text{C}_{36}\text{H}_{57}\text{O}_6^+$)

$m/z = 589$ (Propylpremonensin, $\text{C}_{36}\text{H}_{61}\text{O}_6^+$)

$m/z = 603$ (Butylpremonensin, $\text{C}_{37}\text{H}_{63}\text{O}_6^+$)

6.1.3.2 Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)

Die hochaufgelösten Massenspektren wurden mit *LTQ Orbitrap* gekoppelt und mit einem *Accela* HPLC-System (Säule Hypersil Gold, Länge 50 mm, Innendurchmesser 1 mm, Partikelgröße 1,9 μm , Ionisierungsmethode: Elektrospray Ionisation) aufgenommen. Dabei wurden Wellenlängen im Bereich von 200-600 nm gemessen und Massen im m/z -Bereich von 150-2000 detektiert.

6.1.4 IR-Spektroskopie

Die Proben wurden mit einem *Bruker Tensor 271R*-Spektrometer mittels *ATR*-Verfahren (abgeschwächte Totalreflexion) gemessen. Die genaue Lage der auftretenden Absorptionsbanden wurde in Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] angegeben. Dabei wurde bei der Analyse der Verbindungen nur Bezug auf die charakteristischen Banden bezogen und nur starke

Experimenteller Teil

Signale berücksichtigt. Einzelne Ausnahmen wurden mit den Klassifizierungen mittel (m), schwach (w), oder breit (br) angegeben.

6.1.5 Spezifische optische Drehung $[\alpha]_D^{20}$

Die optische Drehung wurde über ein Schmidt & Haensch Polaritronic HHP Polarimeter bestimmt. Die Messung erfolgte bei $\lambda = 589$ nm durch eine Na-Lampe in einer 10 cm langen Messküvette. Die Konzentration c ist in g/100 ml angegeben.

6.1.6 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunktbestimmung erfolgte an einem Büchi B-540 Gerät mit oben offenen Kapillaren.

6.1.7 Säulenchromatographie

In der Säulenchromatographie kam Silicagel der Firma Acros mit der Partikelgröße von 35-70 μm zur Anwendung, wobei das Silicagel stets in dem Laufmittel dispergiert auf die Säule gegeben wurde.

Ansätze in der Größenordnung von 1 mg-10 mg: Für kleine Ansätze wurden 5 ml Einwegplastikpipetten verwendet. Diese wurden am oberen Ende aufgeschnitten und am unteren Ende der Durchlass mit handelsüblicher Watte versetzt. Anschließend wurden 1.5 ml Silica hinzugegeben. Die Proben wurde in einer minimal Menge an Lösemittel gelöst und 1 ml Silica hinzugegeben. Das Lösemittel wurde vollständig entfernt und das Silica ebenfalls auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde jeweils das doppelte Säulenvolumen als Laufmittel verwendet.

Ansätze in der Größenordnung von 100 mg-30 g: Für diese Ansätze wurden Säulen in der geeigneten Größenordnung verwendet. Dabei wurde jeweils das doppelte Säulenvolumen als Laufmittel verwendet.

6.1.8 Dünnschichtchromatographie (DC)

In der DC kamen Aluminium-DC-Folien mit Silicagel 60 F-245 von der Firma Merk zum Einsatz.

Standardfärbereagenz (KMnO_4 -Lsg.)

Zu 500 ml H_2O wurden unter rühren 500 mg NaOH, 33 g K_2CO_3 , 5 g KMnO_4 , hinzugegeben. Die Lösung wurde anschließend für 15 min gerührt bevor sie verwendet werden kann. Die Lagerung erfolgt in einer Braunglasflasche bei RT.

Färbereagenz für Amine und Azide (Ninhydrin-Lsg.)

0,1 mg Ninhydrin wurden in 100 ml abs. EtOH gelöst. Die Lösung wird kühl und in einer Braunglasflasche gelagert.

Färbereagenz für Monensin und Premonensin (Vanillin-Färbung)

Zu 570 ml Ethanol und 30 ml Wasser wurden langsam 25 ml H₂SO₄ bei RT hinzugegeben. Danach wurde die Lösung auf 0°C gekühlt und 3,8 g Vanillin hinzugegeben und für 10 min bei 0°C gerührt. Die Lösung wurde in einer Braunglasflasche bei 4 °C gelagert.

6.2 Präparative Verfahren und Reagenzien

6.2.1 Präparative Verfahren

Für feuchtigkeitsempfindliche Reaktionen, wurden alle benötigten Glasgeräte zuerst in einem Trockenofen bei 120°C ausgeheizt. Im Anschluss unter Hochvakuum getrocknet und unter Argonatmosphäre gesetzt. Die Reaktionen fanden danach ebenfalls unter Argonatmosphäre statt.

Eine Umhüllung der Apparatur mit Alufolie diente als Lichtschutz bei lichtempfindlichen Reaktionen wie Bromierungen, Iodierungen, oder Verwendung von Ag(I)-Salzen, sowie Reaktionen mit Fluorophoren.

6.2.2 Reagenzien

Abs. DCM wurde mit CaH_2 unter Argon frisch destilliert.

Abs. Diethylether, DMF, MeOH und Toluol kam wie von den Herstellern geliefert zur Anwendung.

Abs. THF: THF (PA-Grade) wurde unter kräftigen rühren über KOH vorgetrocknet und anschließend über CaH_2 refluxiert.

Sofern nicht anderweitig in der Durchführung beschrieben, wurden alle Reagenzien direkt vom Hersteller ohne weitere Aufreinigung verwendet.

6.2.3 Synthese von Lithiumdiisopropylamin (LDA)

2 ml (14,23 mmol) Diisopropylamin wurden unter Argon in 5 ml absolutem THF gelöst und auf -87°C abgekühlt. Im Anschluss wurden tropfenweise 9,78 ml (15,65 mmol) *n*-BuLi (1,5 M Lösung in Hexan) hinzugegeben und für 40 min bei -78°C gerührt. Die milchig weiße Lösung wurde auf RT erwärmt und sofort verwendet.

6.3 Verwendete Puffer für die Fütterungsexperimente mit D₃-Markierung

Die Puffer wurden für jedes Fütterungsexperiment kurz vor Verwendung frisch hergestellt.

6.3.1 Verwendete Puffer für Erythromycin-Varianten

| | |
|--------------------------|------------|
| Glucose | 5 g/l |
| Glucidex | 50 g/l |
| NaHCO_3 | 83,883 g/l |
| Na_2CO_3 | 185,9 mg/l |

6.3.2 Verwendete Puffer für Rapamycin-Varianten

| | | |
|---------------------------------|----------|------------|
| Stärke | (Mais) | 30 g/l |
| Hefe | | 1 g/l |
| Toasted | Nutrisoy | 30 g/l |
| Dextrin | | 19 g/l |
| NaHCO ₃ | | 83,883 g/l |
| Na ₂ CO ₃ | | 185,9 mg/l |
| NaCl | | 10 g/l |

6.4 Umgang und Entsorgung von Aziden, Tetrazolen, Cyaniden, Cr(VI)-Verbindungen und Halogenen

6.4.1 Umgang und Entsorgung von Aziden

Organische Azide können in einigen Fällen stoß- und schlagempfindlich sein. Prinzipiell gilt für organische Azide, dass die Zahl der Stickstoffatome die der Kohlenstoffatome nicht übersteigen sollte. D.h. das Verhältnis (C+O)/N sollte größer als 3:1 sein.^[319] Dies gilt vor allem für Azide mit geringer Molmasse, wie das 2-Azidoethanol und das 2-Azido-1-Iodoethan. Da diese als potenziell explosionsgefährdet gelten, ist beim Aufkonzentrieren und Destillieren Vorsicht walten zu lassen. Deswegen wurden die Reaktionen in hochsiedenden Lösemitteln wie H₂O oder DMF und unter Verwendung eines „Explosionsschild“ durchgeführt. Das Aufkonzentrieren sollte, wann immer möglich, vermieden werden.

Die Azidhaltigen Phasen, die bei der Aufarbeitung anfallen, werden nicht in den normalen Lösemittelabfall gegeben, sondern wie folgt entsorgt. Zum wässrigen Azidabfall werden ungefähr 2,0 eq. NaNO₂ hinzugegeben und unter starkem Rühren langsam kleine Mengen Zitronensäure (alternativ auch Essigsäure) hinzugegeben, bis keine Gasentwicklung (Achtung Nitrosegase!) mehr zu beobachten ist. Die gelbliche Lösung kann im Anschluss normal entsorgt werden.

6.4.2 Umgang und Entsorgung von Tetrazolen

Tetrazole können in einigen Fällen stoß- und schlagempfindlich sein. Prinzipiell gilt für Tetrazole genau wie für Azide, dass die Zahl der Stickstoffatome die der Kohlenstoffatome nicht übersteigen sollte. D.h. das Verhältnis (C+O)/N sollte größer als 3:1 sein.^[319] Tetrazole neigen dazu in fester Form und oder beim starken Erhitzen sich spontan zu zersetzen. Es ist ebenfalls bekannt, dass Tetrazolsalze des Cäsium und Rubidium unter Umständen hoch

explosiv sind. Einige Tetrazole können mit Hydrazin eine hypergolische Flüssigkeit bilden und spontan explodieren.^[320] Aus diesen Gründen wurden die Reaktionen unter Verwendung eines „Explosionsschildes“ durchgeführt und Ansätze größer 500 mg vermieden.

6.4.3 Umgang und Entsorgung von Cr(VI)-Verbindungen

Da Cr(VI)-Verbindungen im Allgemeinen als karzinogen eingestuft sind, sollte stets mit Vorsicht gearbeitet werden und die Bildung von Cr(VI) haltigen Aerosolen unbedingt vermieden werden. Cr(VI)-Abfälle werden gesondert in einen dafür eingerichteten Schwermetallabfall entsorgt.

Glasgeräte, in denen mit Cr(VI) gearbeitet wurde, wurden mit einer 50 gew.% KOH-Lsg. versetzt und der Inhalt solange gerührt, bis kein Bodensatz an Chromschlamm mehr zu erkennen war. Die stark alkalische Cr(VI)-Lösung wurde im Anschluss in den Schwermetallabfall gegeben.

6.4.4 Umgang und Entsorgung von Cyaniden

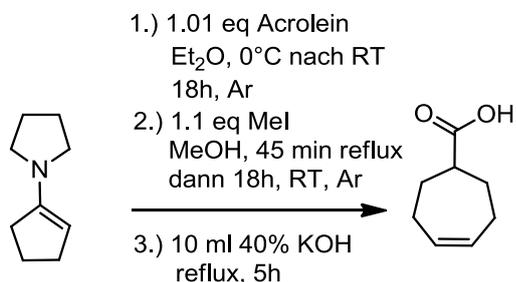
Beim Umgang mit Cyanidsalzen ist besondere Vorsicht geboten, da diese leicht von der Haut resorbierbar sind, wenn diese in DMF oder DMSO gelöst vorliegen. Zusätzlich muss darauf geachtet werden das während der Reaktion und der Aufarbeitung keine Säuren verwendet werden (HCN-Bildung). Für die Entsorgung werden zum wässrigen Cyanidabfall ungefähr 4,0eq. Natriumhypochlorid unter starkem rühren langsam hinzugegeben, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist.

6.4.5 Umgang und Entsorgung von Br₂ und I₂

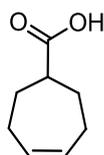
Insbesondere im Umgang mit Elementaren Br₂ sollte darauf geachtet werden, dass für den Falle des Verschüttens immer eine gesättigte Na₂S₂O₃-Lsg. zur schnellen Reduktion griffbereit steht. Des Weiteren ist es empfehlenswert zwei Schichten von Einwegschutzhandschuhen zu tragen, um eventuellen Hautkontakt mit Br₂ zu vermeiden (starke Verätzungen und schwer heilende Wunden möglich). Zu Lösungsmitteln die Spuren von Brom oder Jod enthalten wird unter starkem rühren solange eine ges. Na₂S₂O₃-Lsg. hinzugegeben, bis sich die bräunliche Lösung in eine weiße Suspension umwandelt. Verwendete Kanülen werden ebenfalls vor ihrer ordnungsgemäßen Entsorgung mit einer ges. Na₂S₂O₃-Lsg. durchgespült.

7 Synthese der Verbindungen

7.1 Synthese von Cyclohept-4-encarbonsäure (51)^[80, 81]



5.0 g (36.44 mmol) 1-(Cyclopent-1-en-1-yl)pyrrolidin wurden unter Argonatmosphäre in 20 ml abs. Et₂O gelöst, auf 0°C runtergekühlt und tropfenweise 2.063 g (2.456 ml, 36.80 mmol) frisch destilliertes Acrolein hinzugegeben. Im Anschluss wurde die leicht gelbliche Reaktionslösung für 18h bei RT gerührt. Nach entfernen des Et₂O wurde die zähflüssige Lösung unter Argonatmosphäre mit 20 ml abs. MeOH versetzt und bei RT 5.713 g (2.506 ml, 40.08 mmol) Mel tropfenweise hinzugegeben. Die bräunliche Reaktionslösung wurde für 45 min refluxiert und anschließend für weitere 18 h bei RT gerührt. Nach entfernen des Lösemittels wurde der dunkelbraune Rückstand mit 10 ml 40% wässriger KOH versetzt und für 5 h refluxiert. Nach abkühlen auf RT wurde die dunkelbraune Lösung mit 30 ml H₂O verdünnt, mit DCM gewaschen, auf pH1 mit konzentrierter HCl gebracht und anschließend dreimal mit 100 ml Et₂O extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet. Es wurden 1.251 g eines dunkelbraunen Feststoffes erhalten.



Ausbeute: 1.251 g, 25%

R_f-Wert : 0.75 (Cyclohexan/EtOAc 1:1, KMnO₄)

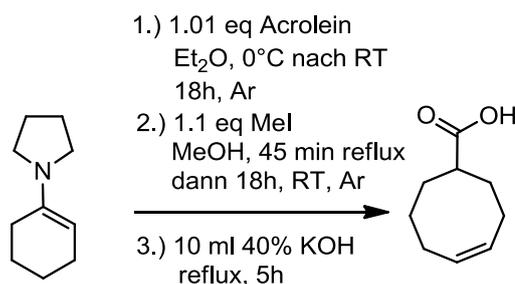
HRMS: Berechnet für: 141.09101 C₈H₁₃O₂ [M+H]⁺; gefunden: 141.09075 C₈H₁₃O₂ [M+H]⁺

GC-MS: t_R = 5.54 min; DB_50_S, m/z: 140, 122, 94, 73, 55, 39

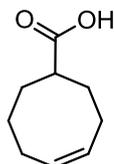
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.63-1.72 (m, 2H), 1.89-2.04 (m, 2H), 2.07-2.14 (m, 2H), 2.28-2.35 (m, 2H), 2.58-2.65 (m, 1H), 5.74-5.81 (m, 2H)

¹³C-NMR: (101MHz, DMSO-d₆) δ = 26.1, 29.0, 46.2, 131.6, 176.8

7.2 Synthese von Cyclooc-4-encarbonsäure (52)^[80, 81]



Die Synthese von Cyclooc-4-encarbonsäure erfolgt analog zur Synthese von Cyclohept-4-encarbonsäure (51) (Kap.7.1). 10.00 g (66.12 mmol) 1-(Cyclohex-1-en-1-yl)pyrrolidin wurden unter Argonatmosphäre in 20 ml abs. Et₂O gelöst, und bei RT tropfenweise 3.74 g (4.457 ml, 66.78 mmol) frisch destilliertes Acrolein hinzugegeben. Im Anschluss wurde die leicht gelbliche Reaktionslösung für 18 h bei RT gerührt. Nach entfernen des Et₂O wurde die zähflüssige Lösung unter Argonatmosphäre mit 15 ml abs. MeOH versetzt und bei RT 10.323 g (4.548 ml, 72.73 mmol) MeI tropfenweise hinzugegeben. Die bräunliche Reaktionslösung wurde für 45 min refluxiert und anschließend für weitere 18 h bei RT gerührt. Nach entfernen des Lösemittels wurde der dunkelbraune Rückstand mit 15 ml 40%iger KOH versetzt und für 5h refluxiert. Nach abkühlen auf RT wurde die dunkelbraune Lösung mit 50 ml H₂O verdünnt, 10 ml ges. Na₂S₂O₃ hinzugegeben und auf pH1 mit konzentrierter HCl gebracht. Anschließend dreimal mit 100 ml CHCl₃ extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet. Es wurden 2.609 g eines hellbraunen Feststoffes erhalten.



Ausbeute: 2.609 g, 25%

R_f-Wert : 0.92 (Cyclohexan) nur UV-sichtbar

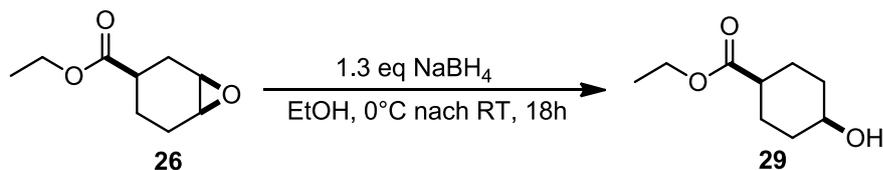
HRMS: Berechnet für: 155.10666 C₉H₁₅O₂ [M+H]⁺; gefunden: 155.10657 C₉H₁₅O₂ [M+H]⁺

GC-MS: t_R = 5.95 min; DB_50_S, m/z: 154, 136, 109, 81, 67, 41

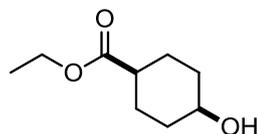
¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.27-1.37 (m, 1H), 1.46-1.51 (m, 2H), 1.63-1.67 (m, 1H), 1.76-1.82 (m, 2H), 1.91-1.96 (dt, J= 14.8, 3.9 Hz, 1H), 2.07-2.13 (m, 3H), 2.27-2.36 (m, 2H), 5.59-5.69 (m, 2H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 23.8, 25.4, 27.4, 28.9, 31.3, 42.8, 129.6, 130.1, 178.1

7.3 Synthese von (1S, 4S) 4-Hydroxycyclohexancarbonsäureethylester (29)^[321]



384 mg (2.26 mmol) (1R*,3R*,6S*)-Ethyl-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-3-carboxylat (**26**)^[79, 322] wurden in 10 ml abs. EtOH gelöst. Anschließend wurden bei 0°C 128 mg (3.39 mmol) NaBH₄ in jeweils 20 mg Portionen hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde für 18 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 90 ml H₂O verdünnt und anschließend dreimal mit 50 ml EtOAc extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/EtOAc 1:0→2:8; Gradient in 5% Schritte). Es wurden 89 mg eines klaren Öls erhalten.



Ausbeute: 89 mg, 24%

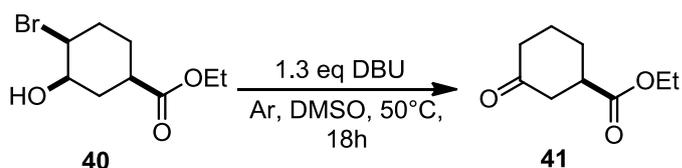
R_f-Wert: 0.54 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)

HRMS: Berechnet für: 173.11722 [M+H]⁺ C₉H₁₇O₃, 155.10666 [M-H₂O]⁺ C₉H₁₅O₂;
 gefunden: 173.11711 [M+H]⁺ C₉H₁₇O₃, 155.10648 [M-H₂O]⁺ C₉H₁₅O₂

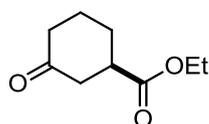
GC-MS: *t_R* = 3.620 min; DB_100_S; m/z: 172, 154, 126, 108, 81, 55

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.23-1.25 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.63-1.66 (m, 6H), 1.93-1.96 (m, 2H), 2.34-2.38 (m, 1H), 3.87 (m, 1H), 4.10-4.14 (q, J = 7.1 Hz, 2H)

¹³C-NMR: (101 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 14.6, 24.1, 32.4, 41.6, 60.6, 67.3, 175.6

7.4 Synthese von (*R*)-3-Oxocyclohexancarbonsäureethylester (**41**)

2.0 g (7.96 mmol) (*1R*^{*},*3R*^{*},*4S*^{*})-4-Bromo-3-hydroxycyclohexancarbonsäureethylester (**40**)^[79] wurden in 20 ml abs. THF unter Argonatmosphäre gelöst und 1.819 g (1.5 ml, 10.05 mmol) DBU hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 18 h bei 50°C gerührt. Nach abkühlen auf RT wurde die gelbliche Reaktionslösung *in vacuo* aufkonzentriert und in 150 ml DCM gelöst. Die organische Phase wurde zweimal mit 100 ml 1M HCl gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/PE, 0:1→15:85; Gradient in 5% Schritte). Es wurden 696 mg eines farblosen Öls erhalten.



Ausbeute: 696 mg, 51%

***R_f*-Wert:** 0.31 (EtOAc/Cyclohexan 2:8, KMnO₄)

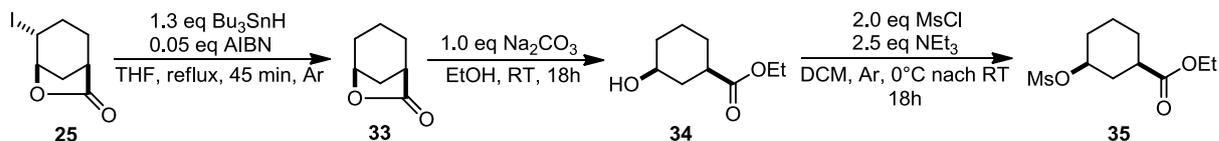
HRMS: Berechnet für: 171.10157 C₉H₁₅O₃ [M+H]⁺, 193.08352 C₉H₁₅O₃Na[M+Na]⁺; gefunden: 171.10145 C₉H₁₅O₃ [M+H]⁺, 193.08349 C₉H₁₅O₃Na[M+Na]⁺

GC-MS: *t_R* = 3.571 min; DB_100_S, m/z: 170, 142, 128, 113, 97, 83, 69, 55

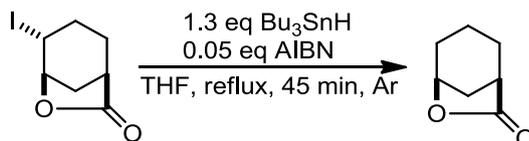
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.20-1.24 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.70-1.82 (m, 2H), 2.02-2.06 (m, 2H), 2.28-2.33 (m, 2H), 2.49-2.51 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 2.73-2.76 (m, 1H), 4.09-4.14 (q, J = 7.1 Hz, 2H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 14.2, 24.5, 27.8, 40.9, 43.2, 43.3, 60.9, 173.8, 209.3

7.5 Synthese von (1*R**,3*S**)-3-(Methylsulfonyloxy)-cyclohexancarbonsäureethylester (35)



7.5.1 Synthese von (1*R**,5*S**)-6-oxabicyclo[3.2.1]octan-7-on (33)^[323]



Die Synthese von (1*R**,5*S**)-6-oxabicyclo[3.2.1]octan-7-on (**33**) erfolgte nach einer für diese Verbindung optimierte Methode in Anlehnung an das Protokoll von Fuchs *et al.*^[323] 4.0 g (15.87 mmol) (1*R**, 3*R**,4*R**)-4-Iodo-6-oxabicyclo[3.2.1.]octan-7-on (**25**)^[75, 79] wurden unter Argonatmosphäre in 80 ml abs. THF gelöst und 5.081 g (17.45 ml, 17.46 mmol) Bu₃SnH (1M in THF) wurden hinzugegeben. Die klare Reaktionslösung wurde auf 60°C erhitzt und 130 mg (0.79 mmol) AIBN wurden hinzugegeben und für 45 min (DC-Kontrolle) refluxiert. Nach abkühlen auf RT wurde die leicht bräunliche Reaktionslösung *in vacuo* aufkonzentriert. Der Rückstand wurde in 1M Na₂S₂O₃-Lösung aufgenommen und dreimal mit 150 ml DCM extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgearbeitet (EtOAc/Cyclohexan 0:1→1:1; Gradient in 5%-Schritte). Es wurden 1.971 g eines weißen Feststoffes erhalten.



Ausbeute: 1.971 g, 98%

R_f-Wert: 0.32 (EtOAc/Cyclohexan 2:8, KMnO₄)

Schmelzpunkt: 121.7-122.5 °C

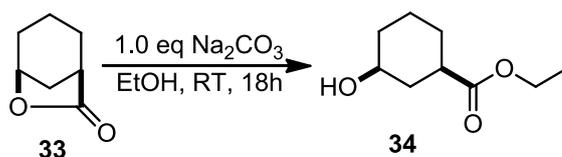
HRMS: Berechnet für: 127.07536 [M+H]⁺ C₇H₁₁O₂, gefunden: 127.07499 [M+H]⁺ C₇H₁₁O₂

GC-MS: *t_R* = 3.033 min; DB_100_S; m/z 126, 97, 82, 67, 54

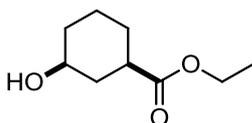
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.53-1.65 (m, 2H), 1.73-1.82 (m, 3H), 1.91-2.02 (m, 2H), 2.37-2.44 (m, 1H), 2.62-2.65 (m, 1H), 4.73-4.76 (t, J = 5.4 Hz, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 18.6, 26.7, 28.2, 37.8, 39.1, 77.9, 179.1

7.5.2 Synthese von (1*R**,3*S**)- 3-Hydroxycyclohexancarbonsäureethylester (34)



1.905 g (15.10 mmol) (1*R**,5*S**)-6-Oxabicyclo[3.2.1]octan-7-on (**33**) wurde in 30 ml EtOH gelöst und 1.761 g (16.61 mmol) Na₂CO₃ wurden so hinzugegeben, dass zu erst 0.5 eq. Na₂CO₃ hinzugegeben wurden und nach 5 h rühren bei RT die letzten 0.5 eq. Na₂CO₃ hinzugegeben wurden. Die weiße Suspension wurde für 18 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Suspension mit konz. HCl auf pH7 angesäuert und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in 200 ml DCM aufgenommen, einmal mit 50 ml H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Es wurden 2.461 g eines klaren lieblich riechenden Öls erhalten.



Ausbeute: 2.4615 g, 95%

R_f-Wert: 0.48 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)

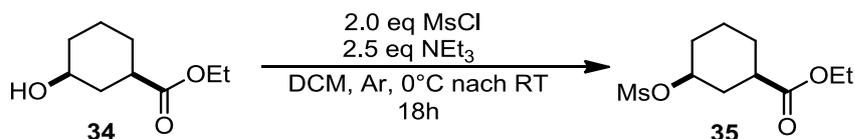
HRMS: Berechnet für: 173.11722 [M+H]⁺ C₉H₁₇O₃, 155.10666 [M-H₂O]⁺ C₉H₁₅O₂, gefunden: 173.11718 [M+H]⁺ C₉H₁₇O₃, 155.10659 [M-H₂O]⁺ C₉H₁₅O₂

GC-MS: *t_R* = 4.044 min; DB_100_S; m/z: 172, 154, 127, 108, 81, 55

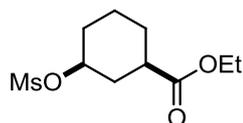
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.23-1.26 (t, J= 7.1 Hz, 3H), 1.29-1.35 (m, 2H), 1.37-1.46 (m, 1H), 1.81-1.90 (m, 2H), 1.92-1.96 (m, 1H), 2.17-2.21 (m, 1H), 2.31-2.38 (m, 1H), 3.58-3.65 (m, 1H), 4.08-4.15 (q, J=7.1 Hz, 2H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 14.3, 23.3, 28.1, 34.9, 37.7, 41.9, 60.5, 69.8, 175.3

7.5.3 Synthese von (1*R**,3*S**)-3-(Methylsulfonyloxy)-cyclohexancarbonsäureethylester (**35**)



2.462 g (11.29 mmol) (1*R**,3*S**)-3-Hydroxycyclohexancarbonsäureethylester (**34**) wurden in 100 ml abs. DCM unter Argonatmosphäre gelöst und auf 0°C abgekühlt. Im Anschluss wurden tropfenweise 3.275 g (2.213 ml, 28.51 mmol) MsCl und 3.616 g (4.953 ml, 30.48 mmol) NEt₃ hinzugegeben. Die Lösung wurde für 18 h (DC-Kontrolle) unter langsames Erreichen von RT gerührt. Im Anschluss wurde die orange gelbliche Lösung mit 100 ml einer ges. NaHCO₃-Lösung verdünnt. Nach der Phasentrennung wurde die wässrige Phase zweimal mit 100 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet eingeeengt und säulenchromatographisch gereinigt (EtOAc/PE 0:1→2:8, Gradient in 5% Schritte). Es wurden 3.503 g eines gelben lieblich riechenden Öls erhalten.



Ausbeute: 3.5039 g, 98%

R_f-Wert: 0.21 (EtOAc/Cyclohexan 2:8, KMnO₄)

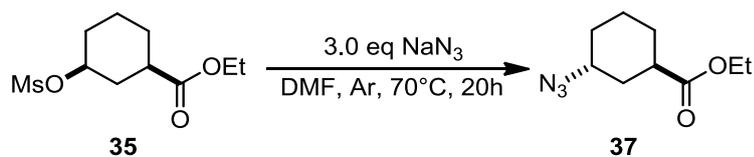
HRMS: Berechnet für: 251.09477 [M+H]⁺ C₁₀H₁₉O₅S, 268.12132 [M+NH₄]⁺ C₁₀H₂₂O₅NS, 273.07672 [M+Na]⁺ C₁₀H₁₉O₅SNa; gefunden: 251.09486 [M+H]⁺ C₁₀H₁₉O₅S, 268.12157 [M+NH₄]⁺ C₁₀H₂₂O₅NS, 273.07668 [M+Na]⁺ C₁₀H₁₉O₅SNa

GC-MS: *t_R* = 5.05 min, DB_100_S, m/z: 205, 175, 154, 126, 108, 81, 67, 55

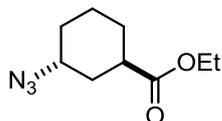
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.23-1.26 (t, J= 7.1 Hz, 3H), 1.31-1.40 (m, 2H), 1.45-1.54 (m, 1H), 1.64-1.73 (m, 1H), 1.93-1.94 (m, 2H), 2.12-2.16 (m, 1H), 2.35-2.43 (m, 2H), 3.01 (s, 3H), 4.10-4.15 (q, J= 7.1 Hz, 2H), 4.60-4.66 (m, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 14.3, 23.3, 27.6, 32.5, 35.1, 39.0, 41.8, 60.8, 80.1, 173.9

7.5.4 Synthese von (1*R**,3*R**)-3-(Azido)-cyclohexancarbonsäureethylester (37)



509 mg (7.84 mmol) NaN₃ wurden zu 627 mg (2.51 mmol) (1*R**,3*S**)- 3-(Methylsulfonyloxy)-cyclohexancarbonsäureethylester(35), gelöst in 5 ml abs. DMF, gegeben. Die Suspension wurde bei 70°C für 20 h gerührt. Nach abkühlen auf RT wurde die Suspension mit 50 ml H₂O verdünnt und dreimal mit 50 ml EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit 50 ml H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/Cyclohexan 0:1→2:8, Gradient in 5% Schritte). Es wurden 277 mg eines hellgelben Öls erhalten.



Ausbeute: 277 mg, 56%

R_f-Wert: 0.95 (Cyclohexan/EtOAc 1:1, KMnO₄)

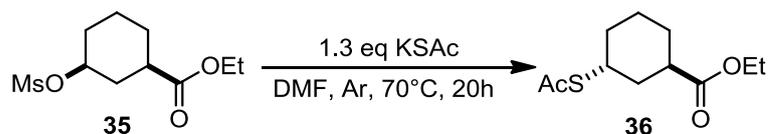
ATR-IR: 2937.45, 2684.13, 2099.02, 1728.42, 1174.11

HRMS: Berechnet für: 198.12370 [M+H]⁺ C₉H₁₆O₂N₃, 170.11756 [(M-N≡N)+H]⁺ C₉H₁₆O₂N; gefunden: 198.12367 [M+H]⁺ C₉H₁₆O₂N₃, 170.11743 [(M-N≡N)+H]⁺ C₉H₁₆O₂N

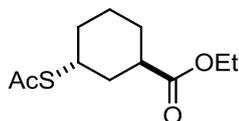
GC-MS: t_R = 3.894 min, DB_100_S, m/z: 198, 168, 152, 124, 98, 81, 55

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.21-1.25 (t, J= 7.1 Hz, 3H), 1.52-1.69 (m, 5H), 1.78-1.86 (m, 3H), 2.62-2.68 (m, 1H), 3.83-3.86 (m, 1H), 4.08-4.13 (q, J= 7.1 Hz, 2H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 14.3, 20.4, 28.0, 29.8, 32.4, 38.3, 57.2, 60.5, 80.1, 173.9

7.5.5 Synthese von (1*R**,3*R**)-3-(Acetylthio)cyclohexancarbonsäureethylester (36)

114.2 mg (0.52 mmol) KSAc wurden zu 100 mg (0.4 mmol) (1*R**,3*S**)- 3-(Methylsulfonyloxy)-cyclohexancarbonsäureethylester(35), gelöst in 5 ml abs. DMF, gegeben. Die Suspension wurde bei 70°C für 20 h gerührt. Nach abkühlen auf RT wurde die braune Lösung mit 50 ml H₂O verdünnt und dreimal mit 50 ml EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit 50 ml H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/Cyclohexan 0:1→2.5:97.5, Gradient in 2.5% Schritte). Es wurden 74 mg eines hellgelben Öls erhalten.



Ausbeute: 74.4 mg, 81%

R_f-Wert: 0.61 (Cyclohexan/EtOAc 1:1, KMnO₄)

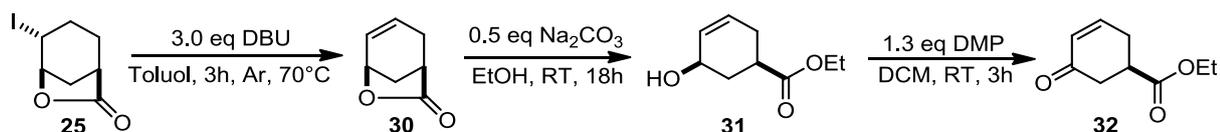
HRMS: Berechnet für: 231.10494 [M+H]⁺ C₁₁H₁₉O₃S, 253.08689 [M+Na]⁺ C₁₁H₁₈O₃NaS; gefunden: 231.10525 [M+H]⁺ C₁₁H₁₉O₃S, 253.08712 [M+Na]⁺ C₁₁H₁₈O₃NaS

LC-ESI-MS: *t_R* = 9.43-9.77 min; pos. Mod; m/z: 231.08 [M]⁺

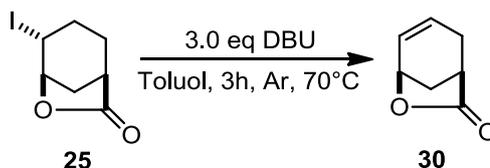
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.24-1.27 (t, J = 7.1 Hz, 3H, 9-H), 1.48-1.61(m, 2H), 1.66-1.71 (m, 2H), 1.75-2.04 (m, 4H), 2.31 (s, 3H), 2.51-2.57 (m, 1H), 3.94-3.96(m, 1H), 4.10-4.16 (q, J = 7.1 Hz, 2H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 14.1, 21.9; 26.8, 27.9, 30.7, 31.1, 33.6, 39.6, 40.3, 60.2, 174.9, 194.8

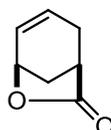
7.6 Synthese (*R*^{*})-5-Oxocyclohex-3-encarbonsäureethylester (32)



7.6.1 Synthese von (*1R*^{*}, *5R*^{*})-6-Oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-7-on (30)^[324]



5.0 g (19.84 mmol) (*1R*^{*}, *3R*^{*}, *4R*^{*})-4-Iodo-6-oxabicyclo[3.2.1]octan-7-on (**25**)^[75, 79] wurden unter Argonatmosphäre in 20 ml abs. Toluol gelöst. Im Anschluss wurden 9.060 g (8.9 ml, 59.51 mmol) DBU hinzugegeben und die klare Reaktionslösung wurde für 3 h bei 70°C gerührt. Nach abkühlen auf RT wurde die weiße Suspension abfiltriert und zweimal mit 50 ml Toluol gewaschen. Das Filtrat wurde *in vacuo* aufkonzentriert. Der Rückstand wurde in 100 ml EtOAc gelöst und zweimal mit 50 ml 1M HCl gewaschen, einmal mit ges. NaHCO₃-Lsg., einmal mit 50 ml H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Es wurden 2.341 g eines gelblichen Öls erhalten.



Ausbeute: 2.341 g, 95%

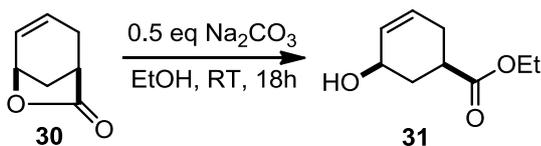
R_f-Wert: 0.62 (Cyclohexan/EtOAc 1:1, KMnO₄)

HRMS: Berechnet für: 124.05188 [M⁺] C₇H₈O₂; gefunden: 124.05192 [M⁺] C₇H₈O₂

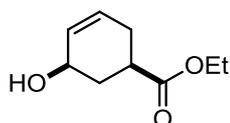
LC-ESI-MS: *t_R* = 5.299 min, DB_50_S, m/z: 124, 95, 80, 65, 39

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 2.07-2.10 (dd, J= 11.1 Hz, 1H), 2.44-2.51 (m, 3H), 2.87-2.89 (m, 1H), 4.72-4.76 (m, 1H), 5.80-5.85 (m, 1H), 6.18-6.23 (m, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ =29.3, 34.6, 38.2, 73.4, 129.5,130.4,179.5

7.6.2 Synthese von (1*R**,5*R**)-5-Hydroxycyclohex-3-encarbonsäureethylester (31)

2.306 g (18.57 mmol) (1*R**, 5*R**)-6-Oxabicyclo[3.2.1]oct-3-en-7-on(**30**) wurden in 20 ml abs. EtOH gelöst und 1.968 g (18.6 mmol) Na₂CO₃ hinzugegeben. Nach 18 h bei RT wurde der Feststoff abfiltriert und die Lösung *in vacuo* aufkonzentriert. Zu dem Rückstand wurden 50 ml H₂O hinzugegeben und dreimal mit 50 ml DCM extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet. Es wurden 2.615 g eines gelblichen Öls erhalten.



Ausbeute: 2.615 g, 82%

R_f-Wert: 0.3 (Cyclohexan/EtOAc 8:2, KMnO₄)

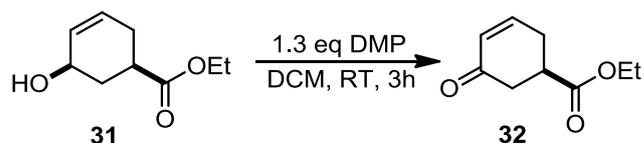
HRMS: Berechnet für: 153.09101 [(M-H₂C)+H]⁺ C₉H₁₃O₂, 171.10157 [M+H]⁺ C₉H₁₅O₃;
 gefunden: 153.09088 [(M-H₂C)+H]⁺ C₉H₁₃O₂, 171.10146 [M+H]⁺ C₉H₁₅O₃

LC-ESI-MS: *t_R* = 5.853 min, DB_50_S, *m/z*: 169, 152, 125, 97, 78, 55, 41

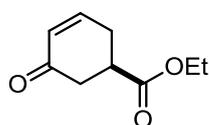
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.23-1.27 (t, J= 7.1 Hz, 3H), 1.68-1.76 (ddd, J= 12.8, 10.6, 8.0 Hz, 1H), 2.25-2.28 (m, 3H), 2.46-2.51 (m, 1H), 2.65-2.72 (m, 1H), 4.11-4.16 (q, J= 7.1 Hz, 2H), 4.25-4.42 (m, 1H), 5.74-5.75 (m, 2H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 14.3, 27.6, 34.3, 38.0, 60.2, 66.14, 127.0, 131.0, 175.4

7.6.3 Synthese von (*R**)-5-Oxocyclohex-3-encarbonsäureethylester (**32**)



500 mg (2.94 mmol) (*1R**,*5R**)-5-Hydroxycyclohex-3-encarbonsäureethylester (**31**) wurden in 30 ml abs.DCM gelöst und 3.115 g (7.34 mmol) DMP hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel *in vacuo* entfernt und der Rückstand in 50 ml H₂O aufgenommen, dreimal mit 50 ml EtOAc extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/EtOAc 1:0→3:7, Gradient in 5% Schritte).



Ausbeute: 289 mg, 58%

R_f-Wert: 0.3 (Cyclohexan/EtOAc 8:2, KMnO₄)

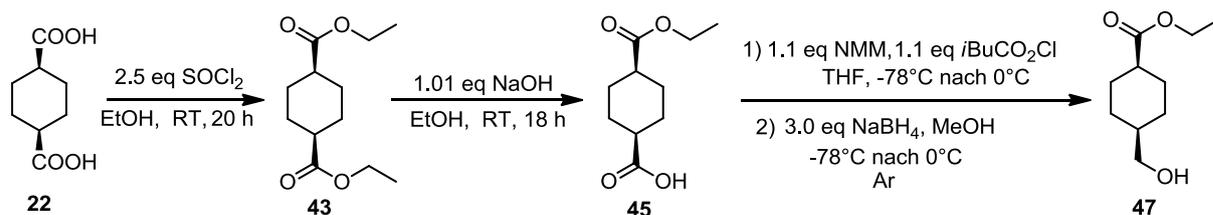
HRMS: Berechnet für: 169.08592 [M+H]⁺ C₉H₁₃O₃; gefunden: 169.08582 [M+H]⁺ C₉H₁₃O₃

LC-ESI-MS: *t_R* = 5.901 min, DB_50_S, m/z: 168, 140, 123, 95, 68, 39

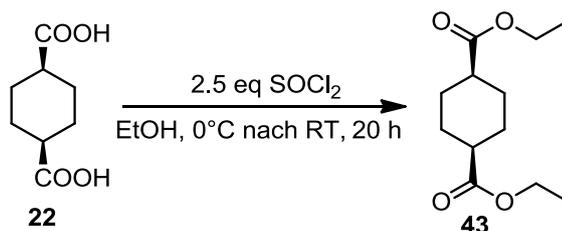
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.23-1.27 (t, J= 7.1 Hz, 3H), 2.60-2.64 (m, 3H), 2.67-2.72 (m, 1H), 3.03-3.09 (m, 1H), 4.13-4.18 (q, J= 7.1 Hz, 2H), 6.02-6.06 (d, J= 11.5 Hz, 1H), 6.92-6.97 (m, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 14.3, 28.1, 39.8, 39.9, 61.2, 130.0, 147.1, 173.1, 197.15

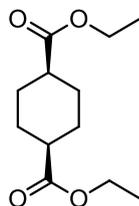
7.7 Synthese von (1s, 4s)-4-(Hydroxymethyl)-cyclohexancarbonsäureethylester (47)



7.7.1 Synthese von (1s,4s)-Diethylcyclohexan-1,4-dicarboxylat (43)



10.0 g (58.08 mmol) *cis*-1,4-Cyclohexandicarbonsäure wurden in 150 ml abs. EtOH gelöst. Im Anschluss wurden 17.274 g (10.533 ml, 145.2 mmol) SOCl₂ tropfenweise bei 0°C hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 20 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung *in vacuo* entfernt, in 300 ml EtOAc aufgenommen und zweimal mit 100 ml ges. NaHCO₃ und einmal mit 100 ml H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Es wurden 12.506 g eines klaren Öls erhalten.



Ausbeute: 12.506 g, 94%

R_f-Wert: 0.84 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)

HRMS: Berechnet für: 229.14344 C₁₂H₂₁O₄ [M+H]⁺, 251.12538

C₁₂H₂₁O₄Na [M+Na]⁺; gefunden: 229.14339 C₁₂H₂₁O₄ [M+H]⁺, 251.12547

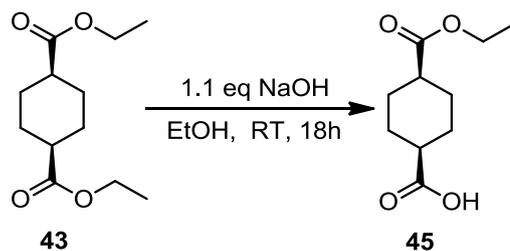
C₁₂H₂₁O₄Na [M+Na]⁺

GC-MS: *t_R* = min; DB_100_S, m/z: 229, 200, 155, 126

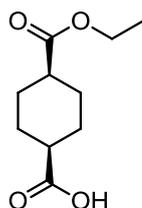
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.21-1.24 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 1.62-1.68 (m, 4H), 1.85-1.92 (m, 4H), 2.41-2.42 (m, 2H), 4.12-4.18 (q, J = 7.1 Hz, 4H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 14.3, 26.1, 28.2, 40.8, 42.6, 60.3, 175.1

7.7.2 Synthese von (1*s*, 4*s*)-Cyclohexandicarbonsäuremonoethylester (45)

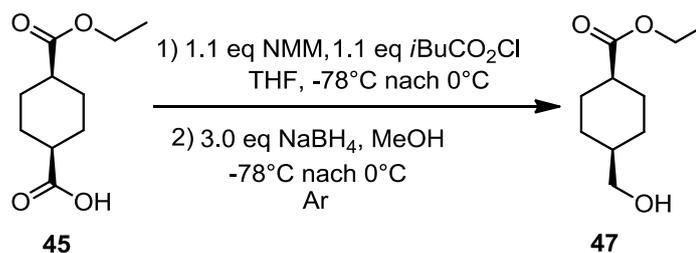


12.507 g (54.79 mmol) (1*s*, 4*s*)-Cyclohexandicarbonsäurediethylester wurden in 125 ml abs. EtOH gelöst. Zu der klaren Lösung wurden 2.213 g (55.33 mmol) NaOH unter Eiskühlung hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 18 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde das Lösemittel der milchig weißen Reaktionslösung *in vacuo* eingeeengt. Der Rückstand wurde in H₂O aufgenommen und auf pH 1 angesäuert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 50 ml EtOAc extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/Cyclohexan 0:1→2:8; Gradient in 10% Schritten). Es wurden 6.11 g eines weißen Feststoffes erhalten.

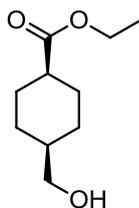


- Ausbeute:** 6.11 g; 56%
- R_f-Wert:** 0.5 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)
- Schmelzpunkt:** 50.1-53.1°C
- HRMS:** Berechnet für: 201.11214 C₁₀H₁₇O₄, [M+H]⁺; gefunden: 201.11207 C₁₀H₁₇O₄, [M+H]⁺
- ¹H-NMR:** (400 MHz, MeOD-d₄) δ = 1.24-1.27 (t, J= 7.1 Hz, 3H), 1.42-1.47 (m, 1H), 1.65-1.72 (m, 3H), 1.84-1.93 (m, 3H), 2.02-2.04 (m, 1H), 2.24-2.30 (m, 1H), 2.46-2.51 (m, 1H), 4.08-4.14 (q, J= 7.1 Hz 2H)
- ¹³C-NMR:** (101MHz, MeOD-d₄) δ = 14.5, 27.1, 29.2, 29.3, 41.7, 42.0, 43.7, 43.8, 61.4, 176.8, 178.9

7.7.3 Synthese von (1s, 4s)-4-(Hydroxymethyl)-cyclohexancarbonsäureethylester (47)



Unter Argon wurden 2.158 g (10.07 mmol) (1s,4s)-4-Ethoxycarbonyl-cyclohexancarbonsäure in 50 ml abs. THF gelöst und auf -78°C abgekühlt. Nach 10 min wurden zuerst tropfenweise (5 min) 1.516 g (1.44 ml, 11.07 mmol) *iso*-Butylchloroformiat und tropfenweise (5 min) 1.7 g (1.218 ml, 17.07 mmol) NMM hinzugegeben. Nach weiteren 40 min bei -78°C wurde die weiße Suspension für 20 min bei -20°C gerührt und für 20 min bei 0°C gerührt. Die weiße Suspension wurde wieder auf -78°C runtergekühlt und 1.143 g (30.02 mmol) NaBH_4 hinzugegeben und für 1 h bei -78°C gerührt. Dann wurden tropfenweise 31 ml abs. MeOH hinzugegeben (1 h). Im Anschluss wurde die Suspension für 4 h bei -78°C , für 1 h bei 0°C gerührt. Nach 5 h (DC-Kontrolle) wurde die Reaktionslösung mit 50 ml ges. NH_4Cl -Lösung gequentscht. Die flüchtigen Lösungsmittel wurden *in vacuo* evaporiert. Die wässrige Phase wurde für 18 h bei RT gerührt und im Anschluss dreimal mit 50 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit 50 ml H_2O und einmal mit 50 ml ges. NaCl -Lsg. gewaschen, über Na_2SO_4 -getrocknet und säulenchromatographisch aufgearbeitet (EtOAc/Cyclohexan 0:10 \rightarrow 1.5: 8.5; Gradient in 2.5% Schritte). Es wurden 1.104 g eines farblosen Öls erhalten.



Ausbeute: 1.104 g, 59%

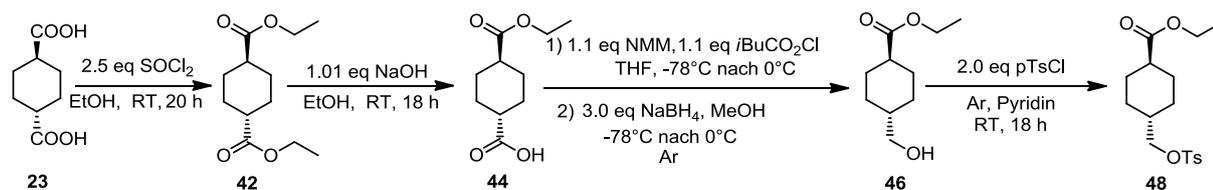
R_f -Wert : 0.42 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO_4)

GC-MS: $t_R = 4.597$ min; DB_100_S; m/z: 184, 96

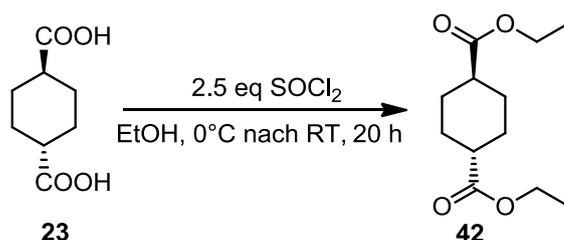
$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) $\delta = 1.23\text{--}1.26$ (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.29–1.34 (m, 2H), 1.52–1.64 (m, 6H), 1.98–2.02 (m, 2H), 2.53–2.57 (m, 1H), 3.48–3.50 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 4.08–4.16 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (101 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) $\delta = 14.4, 26.0, 26.2, 38.8, 40.5, 60.3, 67.2, 175.5$

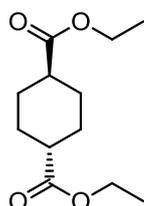
7.8 Synthese von (1*r*, 4*r*)- 4-(Hydroxymethyl)-cyclohexancarbonsäureethylester (48)



7.8.1 Synthese von (1*r*,4*r*)-Diethylcyclohexan-1,4-dicarboxylat (42)



10.0 g (58.08 mmol) *trans*-1,4-Cyclohexandicarbonsäure wurden in 150 ml abs. EtOH gelöst. Im Anschluss wurden 3.455 g (2.107 ml, 29.04 mmol) tropfenweise bei 0°C hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 20 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung *in vacuo* entfernt, in 300 ml EtOAc aufgenommen und zweimal mit 100 ml ges. NaHCO₃-Lsg. und einmal mit 100 ml H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Es wurden 12.322 g eines weißen Feststoffes erhalten.



Ausbeute: 6.478 g, 93%

R_f-Wert: 0.84 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)

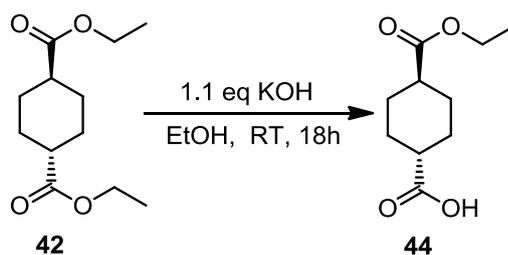
Schmelzpunkt: 41.0-42.6°C

HRMS: Berechnet für: 229.14344 C₁₂H₂₁O₄ [M+H]⁺, 251.12538
 C₁₂H₂₁O₄Na [M+Na]⁺; gefunden: 229.14339 C₁₂H₂₁O₄ [M+H]⁺,
 251.12547 C₁₂H₂₁O₄Na [M+Na]⁺

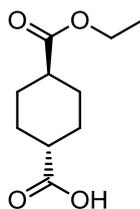
GC-MS: *t_R* = min; DB_100_S, m/z: 229, 200, 155, 126

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.26-1.30 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 1.42-1.53 (m, 4H), 2.02-2.10 (m, 4H), 2.30-2.35 (m, 2H), 4.12-4.18 (q, J = 7.1 Hz, 4H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 14.5, 29.2, 43.8, 61.5, 177.2

7.8.2 Synthese von (1*r*, 4*r*)-Cyclohexandicarbonsäuremonoethylester (**44**)

12.322 g (53.98 mmol) (1*r*, 4*r*)-Cyclohexandicarbonsäurediethylester (**42**) wurden in 100 ml abs. EtOH gelöst. Zu der klaren Lösung wurden 3.059 g (54.52 mmol) KOH gelöst in 80 ml abs. EtOH unter Eiskühlung hinzugegeben. Die Reaktion wurde für 18h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die milchig weiße Reaktionslösung *in vacuo* eingeeengt. Der Rückstand wurde in H₂O aufgenommen und auf pH 1 angesäuert. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 50 ml EtOAc extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/Cyclohexan 0:1→2:8) (Gradient in 10 % Schritten). Es wurden 7.192 g eines weißen Feststoffes erhalten.



Ausbeute: 7.192g; 66%

R_f-Wert: 0.5 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)

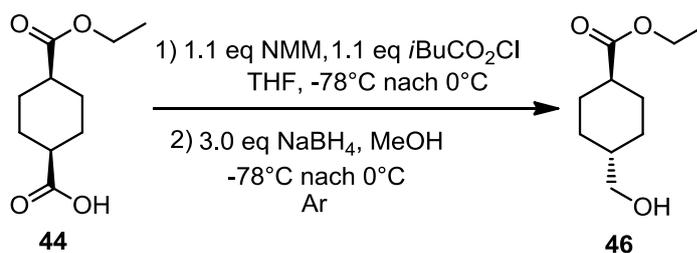
Schmelzpunkt: 87.3-87.7°C

HRMS: Berechnet für: 201.11214 C₁₀H₁₇O₄, [M+H]⁺; gefunden: 201.11207 C₁₀H₁₇O₄, [M+H]⁺

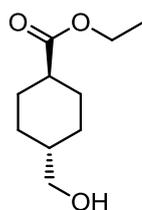
GC-MS: DB_100_S, m/z: 200, 155, 126

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.22-1.26 (t, J= 7.1 Hz, 3H), 1.39-1.50 (m, 4H), 2.02-2.04 (m, 4H), 2.22-2.32 (m, 2H), 4.08-4.14 (q, J= 7.1 Hz, 4H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₄) δ = 14.5, 29.2, 43.7, 61.5, 177.3, 179.3

7.8.3 Synthese von (1*r*, 4*r*)-4(-Hydroxymethyl)-cyclohexancarbonsäureethylester (46)

Unter Argon wurden 5.506 g (27.4996 mmol) (1*r*,4*r*)-4-Ethoxycarbonylcyclohexancarbonsäure (**44**) in 100 ml abs. THF gelöst und auf -78°C abgekühlt. Nach 5 min wurden zuerst tropfenweise (5 min) 4.131 g (3.908 ml, 30.249 mmol) Chloro-*iso*-butylformiat und tropfenweise (5 min) 3.059 g (3.325 ml, 30.249 mmol) NMM hinzugegeben. Nach weiteren 30 min bei -78°C wurde die weiße Suspension durch entfernen des Trockeneisbades unter langsamen Erreichen von RT für 1 h gerührt. Die weiße Suspension wurde wieder auf -78°C runtergekühlt und 3.1 g (82.498 mmol) NaBH₄ hinzugegeben und für 1 h bei -78°C gerührt. Dann wurden tropfenweise 55 ml abs. MeOH über 2 h hinzugegeben und für weitere 2 h bei -78°C gerührt. Im Anschluss wurde die Suspension auf RT erwärmt. Die Reaktionslösung wurde mit 50 ml ges. NH₄Cl-Lsg. gequenchet. Die flüchtigen Lösungsmittel wurden *in vacuo* evaporiert. Die wässrige Phase wurde für 18 h unter RT gerührt und im Anschluss dreimal mit 100 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit 50 ml H₂O und einmal 50 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgearbeitet (EtOAc/Cyclohexan 0:10→1.5:8.5; Gradient in 2.5% Schritten). Es wurden 4.028 g eines farblosen Öls erhalten.



Ausbeute: 4.028 g, 79%

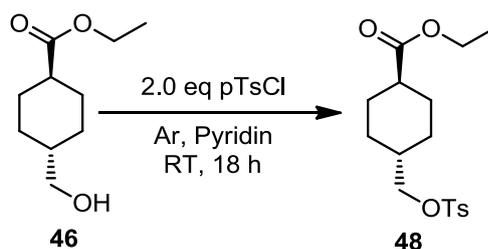
R_f-Wert : 0.42 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)

HRMS: Berechnet für: 215.1647 [M+H]⁺ C₁₂H₂₃O₃, gefunden: 215.16410 [M+H]⁺
C₁₂H₂₃O₃

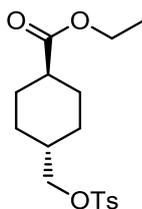
GC-MS: *t_R* = 4.597 min; DB_100_S; m/z: 184, 96

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 0.89-0.99 (ddd, J = 25.3, 13.1, 3.1 Hz, 2H), 0.94-1.02 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.34-1.47 (m, 3H), 1.81-1.85 (dd, J = 13.6, 3.1 Hz, 2H), 1.95-1.99 (dd, J = 13.6, 3.1 Hz, 2H), 2.14-2.21 (tt, J = 12.3, 3.6 Hz, 1H), 3.39-3.41 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 4.05-4.10 (q, J = 7.1 Hz, 2H)

¹³C-NMR: (101 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 14.3, 28.5, 28.6, 39.8, 43.5, 60.2, 68.2, 176.1

7.8.4 Synthese von (1*r*, 4*r*)-Ethyl-4-(tosyl)-cyclohexancarboxylat (**48**)

3.973 g (21.33 mmol) (1*r*, 4*r*)-Ethyl-4-(hydroxymethyl)-cyclohexancarboxylat (**46**) wurden unter Argonatmosphäre in 50 ml abs. Pyridin gelöst. Im Anschluss wurden bei 0°C tropfenweise 6.1 g (31.99 mmol) pTsCl gelöst in 20 ml abs. Pyridin tropfenweise (5 min) hinzugegeben. Nach 45 min bei 0°C wurde die gelbliche Lösung für 18 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde das Pyridin *in vacuo* entfernt. Der verbleibende orange Feststoff wurde mit 200 ml EtOAc aufgenommen und dreimal mit 0.1 M NaOH ausgewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet, eingengt und säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/EtOAc 10:0→95:5; Gradient in 5% Schritte). Es wurden 5.683 g eines farblosen Öls erhalten.



Ausbeute: 5.683 g, 78%

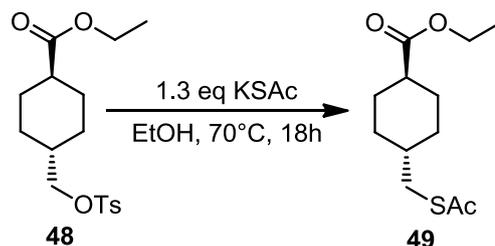
HRMS: Berechnet für: 341.14172 [M+H]⁺ C₁₇H₂₅O₅S, 363.12367 [M+Na]⁺ C₁₇H₂₄O₅NaS; gefunden: 363.12382 [M+Na]⁺ C₁₇H₂₄O₅NaS

GC-MS: *t_R* = 9.75 min; pos. Mod; *m/z*: 340.80 [M+H]⁺

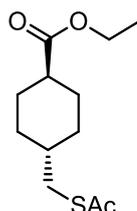
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 0.90-1.00 (qd, *J* = 12.9, 3.3 Hz, 2H), 1.20-1.23 (t, *J* = 7.4, 3H), 1.32-1.42 (qd, *J* = 13.1, 4.0 Hz, 2H), 1.60-1.67 (m, 1H), 1.76-1.80 (dd, *J* = 13.6, 2.8 Hz, 2H), 1.95-1.99 (dd, *J* = 13.6, 2.8 Hz, 2H), 2.14-2.20 (tt, *J* = 12.2, 3.5, 1H), 2.44 (s, 3H), 3.81-3.82 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.06-4.11 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.32-7.34 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.75-7.77 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H)

¹³C-NMR: (101 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 14.3, 21.7, 28.1, 28.2, 36.7, 43.0, 60.3, 74.9, 127.9, 129.9, 133.2, 144.8, 175.7

7.8.5 Synthese von (1*r*, 4*r*)-4-((Acetylthio)methyl)cyclohexancarbonsäureethylester (49)



1.0 g (2.94 mmol) (1*r*, 4*r*)-4-(Tosyl)-cyclohexancarbonsäureethylester (**48**)^[79] wurden in 20 ml abs. EtOH gelöst. Im Anschluss wurden 402 mg KSAc hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wurde auf 60°C erhitzt und 18 h gerührt. Nach abkühlen der gelblichen Reaktionslösung auf RT, wurde das Lösemittel entfernt, der verbleibende Rückstand in 50 ml H₂O aufgenommen und dreimal mit 100 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/EtOAc 99:5; isokratisch). Es wurden 561 mg eines übelriechenden gelblichen Öls erhalten.



Ausbeute: 561.8 mg, 78%

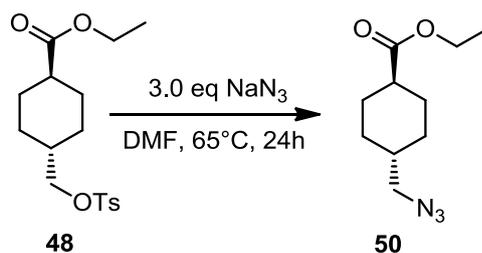
R_f-Wert: 0.58 (EtOAc/Cyclohexan2:8, KMnO₄)

HRMS: Berechnet für: C₁₂H₂₁O₃S, 245.12059 [M+H]⁺; gefunden: C₁₂H₂₁O₃S, 245.12077 [M+H]⁺

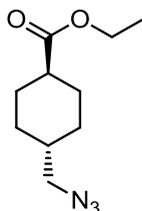
LC-ESI-MS: *t_R* = 9.65-9.98 min; pos. Mod; *m/z*: 244.96 [M+H]⁺

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 0.90-1.04 (m, 2H), 1.20-1.25 (m, 3H), 1.34-1.48 (m, 3H), 1.85-1.99 (m, 4H), 2.14-2.23 (m, 1H), 2.32 (s, 3H), 2.78-2.80 (dd, *J* = 6.7, 1.4 Hz, 2H), 4.06-4.12 (m, 2H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 14.3, 28.7, 30.8, 31.5, 35.6, 37.4, 43.3, 60.3, 175.9, 195.9

7.8.6 Synthese von (1*r*, 4*r*)-4-(Azidomethyl)-cyclohexancarbonsäureethylester (50)

2.0 g (5.87 mmol) (1*r*, 4*r*)-4-(Tosyl)-cyclohexancarbonsäureethylester (**48**) wurden in 30 ml abs. DMF gelöst und 1.146 g (17.62 mmol) NaN₃ hinzugegeben. Die Suspension wurde für 24 h bei 65°C gerührt. Nach abkühlen auf RT wurde die Suspension mit 100 ml H₂O verdünnt und dreimal mit 100 ml EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit 50 ml H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/Cyclohexan 0:10→5:95; Gradient in 5% Schritte). Es wurden 1.086 g eines gelben Öls erhalten.



Ausbeute: 1.086 g, 88%

R_f-Wert: (EtOAc/Cyclohexan1:1)

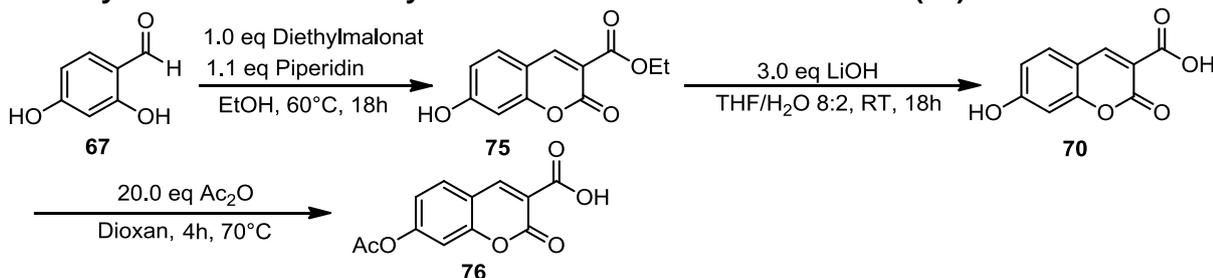
HRMS: Berechnet für: C₁₀H₁₈O₂N₃ 212.1395 [M+H]⁺; gefunden: C₁₀H₁₈O₂N₃ 212.13936 [M+H]⁺

LC-ESI-MS: *t_R* = 9.68-9.98 min; pos. Mod; m/z: 211.91 [M+H]⁺

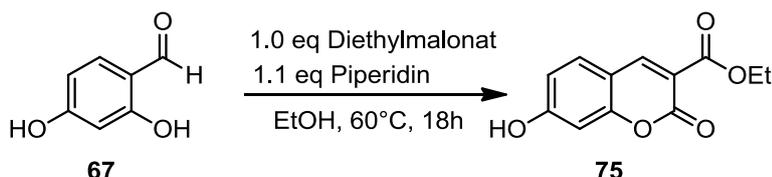
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 0.96-0.106 (qd, J= 13.0, 3.4 Hz, 2H), 1.22-1.25 (td, J= 7.1, 0.6 Hz, 3H), 1.38-1.48 (qd, J= 13.1, 3.4 Hz, 2H), 1.50-1.60 (m, 1H), 1.83-1.87 (dd, J= 13.5, 2.8 Hz, 2H), 1.99-2.03 (dd, J= 13.6, 2.7 Hz, 2H), 2.17-2.25 (tt, J= 12.3, 3.6 Hz, 1H), 3.13-3.15 (d, J= 6.5 Hz, 2H), 4.08-4.13 (q, J= 7.1, 0.6 Hz, 2H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 14.3, 28.5, 29.7, 37.5, 43.3, 57.8, 60.3, 175.8

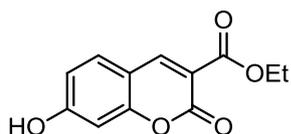
7.9 Synthese von 7-Acetoxy-2-oxo-2H-chromen-3-carbonsäure (76)



7.9.1 Synthese von 7-Hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-carbonsäureethylester (75)



1.0 g (7.24 mmol) 2,4-Dihydroxybenzaldehyd (**67**) wurden in 10 ml abs. EtOH gelöst. Im Anschluss wurden zuerst 1.159 g (1.099 ml, 7.24 mmol) Diethylmalonat und dann 637.8 mg (733.37 μ l, 7.40 mmol) Piperidin tropfenweise hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 18 h bei 60°C gerührt (DC-Kontrolle) und anschließend mit konz. HCl-Lsg. gequentscht, bis ein bräunlicher Niederschlag entstand. Das Präzipitat wurde aus der dunkelroten Reaktionslösung abfiltriert, viermal mit 10 ml EtOAc gewaschen und am HV getrocknet. Die verbleibende Reaktionslösung wurde mit 50 ml H₂O versetzt und 18 h stehen gelassen. Das Präzipitat wurde ebenfalls abfiltriert, viermal mit 10 ml EtOAc gewaschen und dann HV getrocknet. Es wurden 1.395 g eines grauen Feststoffes erhalten.



Ausbeute: 1.395 g, 82%

R_f-Wert: 0.35 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, UV-sichtbar, KMnO₄)

Schmelzpunkt: 171.8-173.2°C

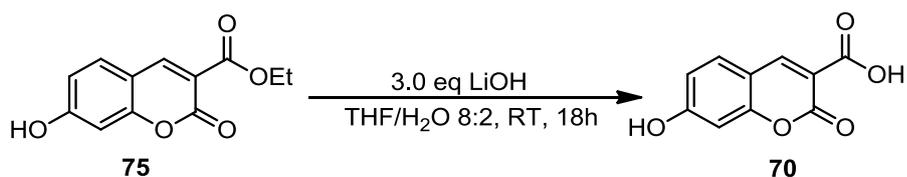
HRMS: Berechnet für: 235.06010 [M+H]⁺ C₁₂H₁₁O₅, 257.04204 [M+Na]⁺ C₁₂H₁₁O₅Na; gefunden: 235.06030 [M+H]⁺ C₁₂H₁₁O₅, 257.04203 [M+Na]⁺ C₁₂H₁₁O₅Na

GC-MS: t_R = 6.42 min; DB_100_S; m/z: 234, 217, 189, 162, 134, 105, 76, 54

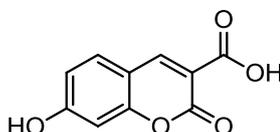
¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.27-1.31 (t, J= 6.9 Hz, 3H), 4.23-4.28 (q, J= 6.9 Hz, 2H), 6.72 (s, 1H), 6.82-6.84 (d, J= 8.4 Hz, 1H), 7.73-7.75 (d, J= 8.4 Hz, 1H), 8.65 (s, 1H), 11.06 (s, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, DMSO-d₆) δ = 14.1, 16.8, 101.8, 110.4, 112.1, 113.9, 132.1, 149.4, 156.4, 157.1, 162.9, 164.0

7.9.2 Synthese von 7-Hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-carbonsäure (70)



1.925 g (43.80 mmol) LiOH·H₂O wurden in 100 ml THF/H₂O 8:2 gelöst. Im Anschluss wurden 3.419 g (14.60 mmol) 7-Hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-carbonsäureethylester (**75**) hinzugegeben. Die gelbliche Lösung wurde für 18 h bei RT gerührt bevor unter Eiskühlung solange konz. HCl hinzugegeben wurde, bis sich ein weißer Niederschlag bildete. Die weiße Suspension wurde abfiltriert und das Filtrat einmal mit EtOAc gewaschen und dann HV getrocknet. Es wurden 2.014 g eines weißen Feststoffes erhalten.



Ausbeute: 2.014 g, 67%

R_f-Wert: 0.16 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)

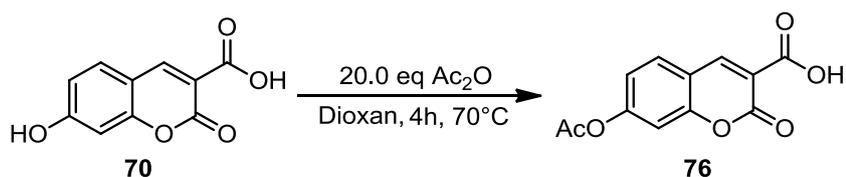
Schmelzpunkt: 262.6-265.5°C, ab 276.2 °C Zersetzung

GC-MS: *t_R* = 5.08 min; DB_100_S; m/z: 190, 162, 134, 105, 78, 51.

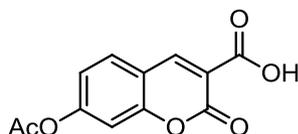
¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 6.74-6.75 (d, J= 2.2 Hz, 1H), 6.84-6.86 (dd, J= 8.6, 2.3 Hz, 1H), 7.73-7.75 (d, J= 8.6 Hz, 1H), 8.65 (s, 1H), 11.08 (s, 1H, OH), 12.83 (bs, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, DMSO-d₆) δ = 101.8, 110.6, 112.5, 114.0, 132.0, 149.4, 156.9, 157.5, 163.9, 164.1

7.9.3 Synthese von 7-Acetoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carbonsäure (**76**)^[148]



Die Synthese wurde leicht modifiziert nach E. Koller und O. Wolfbeis durchgeführt.^[148] 887 mg (4.30 mmol) 7-Hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-carbonsäure (**70**) wurden unter Argonatmosphäre zu 30 ml abs. Dioxan gegeben. Zu dieser braunen Suspension wurden bei RT 8.786 g (8.135 ml, 86.06 mmol) Ac₂O hinzugegeben und die Suspension wurde für 6 h bei 70°C gerührt. Nach abkühlen auf RT wurde das Lösemittel der bräunlichen Lösung *in vacuo* entfernt, 20 ml H₂O hinzugegeben und für 30 min bei RT gerührt. Das Präzipitat wurde abfiltriert, zweimal mit 10 ml H₂O gewaschen und dann HV getrocknet. Es wurden 749 mg eines braunen Feststoffes erhalten.



Ausbeute: 749 mg, 70%

R_f-Wert: 0.66 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, UV-Sichtbar, KMnO₄)

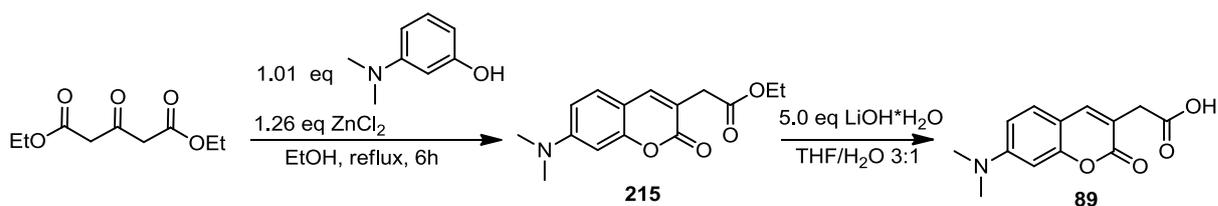
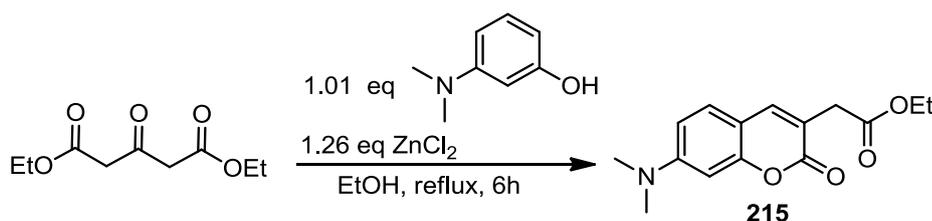
Schmelzpunkt: 267°C Zersetzung

HRMS: Berechnet für: 249.03936 [M+H]⁺ C₁₂H₈O₆, 271.02131 [M+Na]⁺ C₁₂H₈O₆;
gefunden: 249.03960 [M+H]⁺ C₁₂H₈O₆, 271.02152 [M+Na]⁺ C₁₂H₈O₆

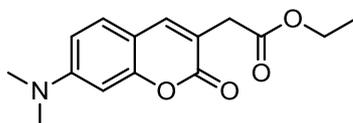
GC-MS: *t_R*=6.69-6.88 min; pos. Mod. 248.03 [M+H]⁺

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 2.31 (s, 3H, CH₃), 7.22-7.24 (dd, J= 8.5, 1.8 Hz, 1H), 7.33 (d, J= 1.8 Hz, 1H), 7.97-7.99 (d, J= 8.5 Hz, 1H), 8.80 (s, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, DMSO-d₆) δ = 20.9, 109.9, 115.7, 116.5, 119.1, 131.4, 148.7, 154.9, 155.3, 155.7, 163.0, 168.6

7.10 Synthese von 2-(7-(Dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)essigsäure (89)^[157]7.10.1 Synthese von Ethyl 2-(7-(dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetat(215)^[157]

4.8 g (35.57 mmol) 2-Dimethylaminophenol (zuvor frisch gesäult), 7.113 g (7.128 ml, 39.13 mmol) Acetoaceton-diethylester und 6.109 g (44.82 mmol) ZnCl₂, gelöst in 15 ml abs. EtOH, wurden für 6 h unter Rückfluss gerührt. Nach abkühlen auf RT wurde das EtOH *in vacuo* aufkonzentriert. Das verbleibende bräunliche Öl wurde in 200 ml H₂O gelöst und dreimal mit 150 ml EtOAc extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet, auf Silica aufgezogen und säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/Cyclohexan 0:1→2:8, Gradient in 5 %Schritte). Es wurden 4.74 g eines dunkelroten Feststoffes erhalten.



Ausbeute: 4.74 g, 48%

R_f-Wert : 0.64 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, UV-sichtbar gelb, KMnO₄)

HRMS: Berechnet für: 276.12303 [M+H]⁺ C₁₅H₁₈O₄N, 298.10498 [M+Na]⁺

C₁₅H₁₇O₄NNa gefunden: 276.12256 [M+H]⁺ C₁₅H₁₈O₄N, 298.10464 [M+Na]⁺

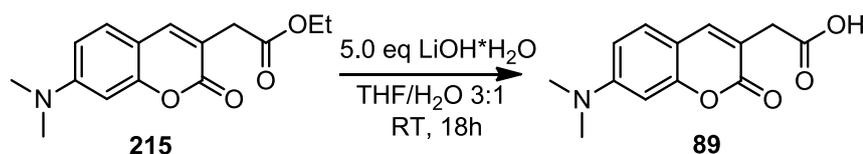
C₁₅H₁₇O₄NNa

LC-ESI-MS: *t_R* = 8.15-8.57, pos. Mod, m/z: 276.08 [M+H]⁺

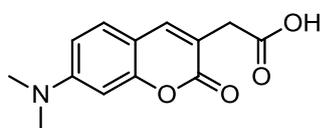
¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 1.16-1.20 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 3.87 (s, 2H), 4.08-4.13 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 6.05 (s, 1H), 6.55 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.71-6.73 (dd, J = 9.6, 2.5 Hz), 7.42-7.44 (d, J = 9.0 Hz, 1H)

¹³C-NMR: (101 MHz, DMSO-d₆) δ = 14.0, 36.9, 39.7, 60.8, 97.5, 107.9, 109.1, 109.6, 125.9, 149.6, 152.8, 155.4, 160.6, 169.3

7.10.2 Synthese von 2-(7-(Dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)essigsäure (**89**)^[157]



2.414 g (8.77 mmol) Ethyl-2-(7-(dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetat (**215**) wurden in 100 ml THF/H₂O 3:1 gelöst und 1.157 g (26.31 mmol) LiOH·H₂O hinzugegeben. Die gelbliche Lösung wurde für 18 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde das THF *in vacuo* entfernt und die verbleibende wässrige Lösung mit konz. HCl auf pH1 gebracht. Die dadurch resultierenden gelben Kristalle wurden am HV getrocknet. Es wurden 1.773 g eines gelben Feststoffes erhalten.



Ausbeute: 1.773 g, 82%

R_f-Wert: 0.0 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, UV-sichtbar, gelb ; KMnO₄)

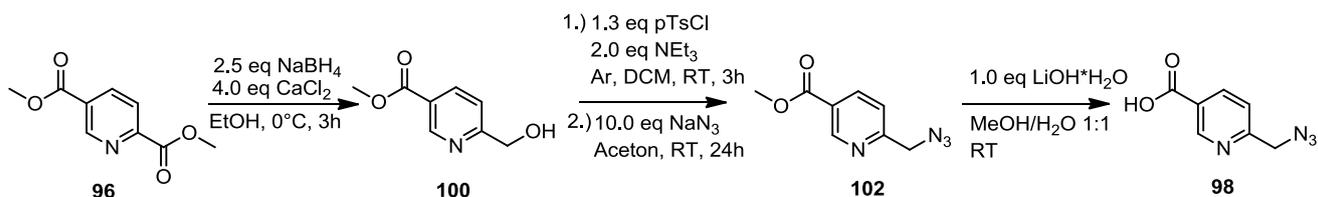
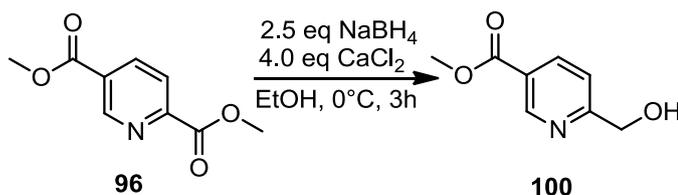
Schmelzpunkt: Ab 165°C Zersetzung

HRMS: Berechnet für: 248.09173 [M+H⁺] C₁₃H₁₄O₄N, gefunden: 248.09126 [M+H⁺] C₁₃H₁₄O₄N

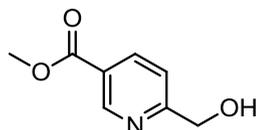
LC-ESI-MS: *t_R* = 6.72-7.04, pos.Mod, m/z: 248.11 [M+H]⁺

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 2.30 (s, 6H), 3.03 (s, 2H), 5.30 (s, 1H), 5.97 (d, J= 2.5 Hz, 1H), 5.98-6.01 (dd, J= 9.0, 2.5 Hz), 6.74-6.76 (d, J= 9.0 Hz, 1H)

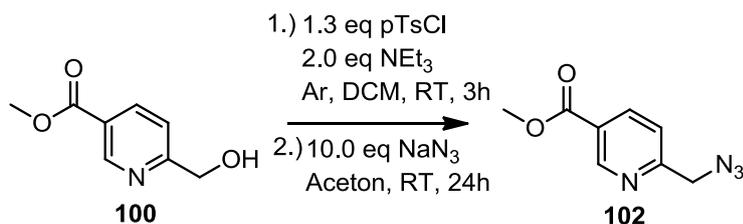
¹³C-NMR: 101MHz, DMSO-d₆) δ = 37.4, 39.8, 97.5, 108.2, 109.2, 109.6, 126.0, 150.3, 152.8, 155.4, 160.7, 170.7

7.11 Synthese von 6-((Azido)methyl)nicotinat (**98**)^[142]7.11.1 Synthese von 6-(Hydroxymethyl)nicotinsäuremethylester (**100**)^[142]

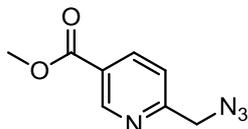
10.0 g (51.24 mmol) Dimethyl-2,5-pyridindicarboxylat (**96**) wurden zusammen mit 22.746 g (204.95 mmol) CaCl₂ zu 500 ml abs. Ethanol gegeben und auf 0°C gekühlt. Zu dieser weißen Suspension wurden alle 10 min 485 mg NaBH₄ bis die gesamt benötigte Menge an NaBH₄ (4.846 g, 128.09 mmol) hinzugegeben wurde (2h). Die gelbliche Suspension wurde für eine weitere Stunde bei 0°C gerührt. Im Anschluss wurde die gelbliche Suspension mit 300 ml H₂O verdünnt und dreimal mit 300 ml CHCl₃ extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und anschließend säulenchromatographisch (Cyclohexan/EtOAc 1:0→9:1; Gradient in 10% Schritte) aufgereinigt. Es wurden 6.146 g eines weißen Feststoffes erhalten.



| | |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ausbeute: | 6.1469 g, 72% |
| R_f-Wert: | 0.4 (EtOAc/Cyclohexan 8:2, KMnO ₄) |
| Schmelzpunkt: | 70.8°C-71.0°C |
| HRMS: | Berechnet für: 168.06552 [M+H] ⁺ C ₈ H ₁₀ O ₃ N; gefunden: 168.06540 [M+H] ⁺ C ₈ H ₁₀ O ₃ N |
| GC-MS: | t _R = 7.946 min; DB_50_S, m/z: 166, 152, 138, 122, 108, 92, 78, 63, 51 |
| ¹H-NMR: | (400 MHz, CDCl ₃ -d ₁) δ = 3.94 (s, 3H), 4.82 (s, 2H), 7.36-7.38 (dd, J= 8.2, 0.8 Hz, 1H), 8.26-8.29 (J= 8.1, 2.1 Hz), 9.13 (d, J= 1.2 Hz, 1H) |
| ¹³C-NMR: | (101MHz, CDCl ₃ -d ₁) δ = 52.5, 64.4, 120.2, 125.0, 137.9, 150.0, 163.8, 165.7 |

7.11.2 Synthese von 6-((Azido)methyl)nicotinsäuremethylester (**102**)^[142]

1.0 g (5.18 mmol) 6-(Hydroxymethyl)nicotinsäuremethylester (**100**) wurden unter Argonatmosphäre bei 0°C in 50 ml abs. DCM gelöst und 1.483 g (7.78 mmol) pTsCl hinzugegeben. Zu der klaren Lösung wurden portionsweise 277 mg (6.58 mmol) NaH hinzugegeben und nach Zugabe für weitere 30 min bei 0°C gerührt und für weitere 3h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die hellbraune Lösung aufkonzentriert und in 20 ml Aceton gelöst. Zu dieser Lösung wurden 3.888 g (59.80 mmol) NaN₃ hinzugegeben und für 24h bei RT gerührt. Die weiße Suspension wurde mit 100 ml einer wässrigen NaHCO₃-Lsg. (H₂O/ges.NaHCO₃-Lsg. 9:1) verdünnt und dreimal mit 100 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch (PE/EtOAc 1:0→95:5, Gradient in 2.5% Schritte) aufgereinigt. Es wurden 714 mg eines gelblichen Feststoffes erhalten.



Ausbeute: 488 mg, 62%

R_f-Wert: 0.61 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)

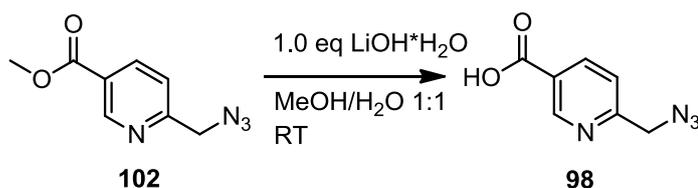
Schmelzpunkt: 40°C

HRMS: Berechnet für: 193.07200 [M+H]⁺ C₈H₉O₂N₄; gefunden: 193.07198
[M+H]⁺ C₈H₉O₂N₄

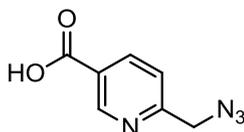
GC-MS: *t_R* = 8.415 min; DB_100_MST, m/z: 192, 164, 150, 137, 122, 106, 92, 78, 59

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 3.93 (s, 3H), 4.55 (s, 2H), 7.24-7.44 (d, J= 8.1Hz, 1H), 8.29-8.31 (dd, J= 8.1, 2.0 Hz, 1H), 9.16 (s, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 52.6, 55.5, 121.4, 125.3, 138.3, 150.9, 160.2, 165.5

7.11.3 Synthese von 6-((Azido)methyl)nicotinat (**98**)^[142]

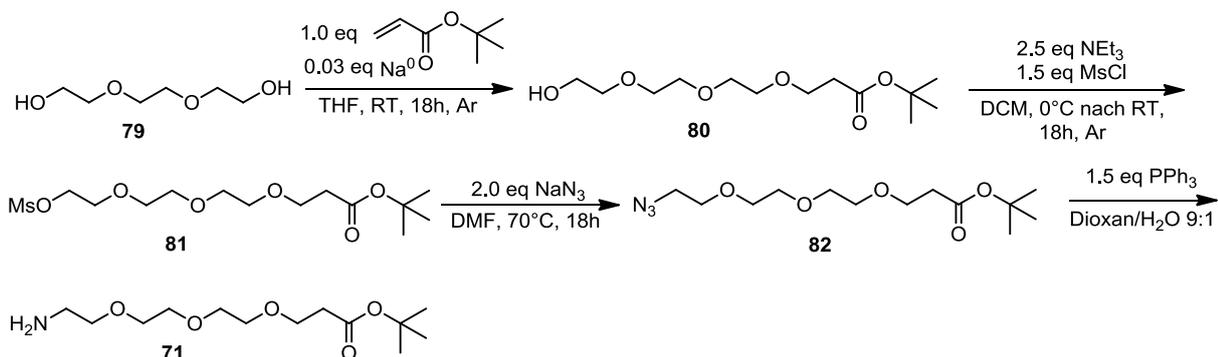
353 mg (1.84 mmol) 6-((Azido)methyl)nicotinsäuremethylester (**102**) wurden in 8 ml MeOH/H₂O 1:1 gelöst und 42.9 mg (1.84 mmol) LiOH·H₂O hinzugegeben und für 1 h bei RT gerührt (DC-Kontrolle). Nach entfernen des MeOH, wurde der Rückstand in 50 ml H₂O aufgenommen und einmal mit 25 ml EtOAc gewaschen. Im Anschluss wurde die wässrige Phase gefriergetrocknet. Der dadurch resultierende braune Feststoff wurde in MeOH gelöst und auf Silica aufgezogen und säulenchromatographisch (EtOAc/MeCN/AcOH 99.9:0:0.1→90:10:0.1, Gradient in 2.5% Schritte) aufgereinigt. Es wurden 351 mg eines weißen Feststoffes erhalten.



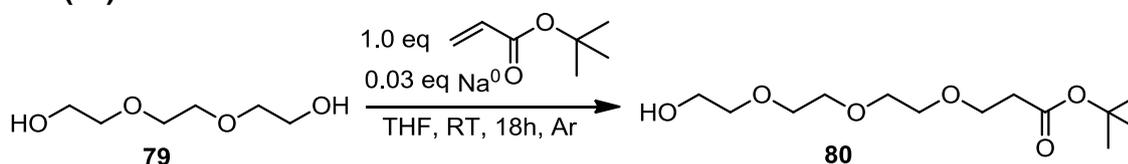
| | |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ausbeute: | 351 mg, 74% |
| R_f-Wert: | 0-0.32 (EtOAc/AcOH 99.9:0.01, KMnO ₄) |
| Schmelzpunkt: | Ab 100°C zersetzung |
| HRMS: | Berechnet für: 179.05635 [M+H] ⁺ C ₇ H ₇ O ₂ N ₄ ; gefunden: 179.05610 [M+H] ⁺ C ₇ H ₇ O ₂ N ₄ |
| GC-MS: | t _R = 5.732 min; DB_50_MST, m/z: 150, 143, 136, 123, 105, 94, 78, 66, 51 |
| ¹H-NMR: | (400 MHz, CDCl ₃ -d ₁) δ = 4.58 (s, 2H), 7.55-7.58 (d, J= 8.1 Hz, 1H), 8.37-8.40 (dd, J= 8.1, 2.1 Hz, 1H), 9.09-9.1 (dd, J= 2.1, 0.8 Hz, 1H) |
| ¹³C-NMR: | (101MHz, CDCl ₃ -d ₁) δ = 55.9, 123.3, 127.5, 139.9, 151.5, 161.4, 167.6 |

Synthese der Verbindungen

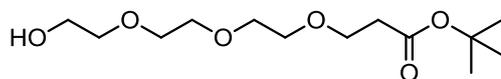
7.12 Synthese von *tert.*-Butyl 3-(2-(2-(3-aminopropoxy) ethoxy) ethoxy) propyl)-carbammat (71)



7.12.1 Synthese von *tert.*-Butyl 3-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoat (80)^[325]



55 mg (2.3 mmol) Na⁰ wurden zu 37.543 g (33.521 ml, 250 mmol) Triethylenglycol (**79**), gelöst in 50 ml abs. THF, unter Argonatmosphäre gegeben und auf 40°C erwärmt, bis das Na⁰ vollständig gelöst war. Nach abkühlen auf RT wurden tropfenweise 10.894 g (12.352 ml, 85.0 mmol) *tert.*-Butylacrylat hinzugegeben. Die gelbliche Reaktionslösung wurde für 18 h bei RT gerührt bevor das Lösemittel *in vacuo* entfernt wurde. Der verbleibende ölige Rückstand wurde mit 150 ml ges. NaCl-Lsg. aufgenommen und dreimal mit 100 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen, über Mg₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 1:0→99:1). Es wurden 23.659 g eines klaren Öls erhalten.



Ausbeute: 23.659 g, 34%

R_f-Wert: 0.67 (DCM/MeOH 9:1, KMnO₄)

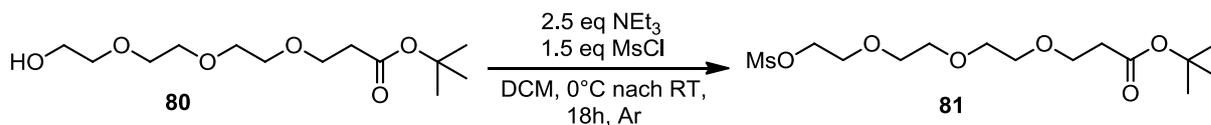
HRMS: Berechnet für: 279.18022 [M]⁺ C₁₃H₂₇O₆, 301.16216 [M+Na]⁺ C₁₃H₂₇O₆Na;
gefunden: 279.18071 [M]⁺ C₁₃H₂₇O₆, 301.16247 [M+Na]⁺ C₁₃H₂₇O₆Na

LC-ESI-MS: t_R = 6.58 min; pos. Mod; m/z: 278.95 [M+H]⁺

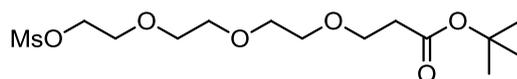
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.43 (s, 9H), 2.47-2.50 (dt, J= 6.6, 1.0 Hz, 2H), 3.57-3.65 (breites m, 10H), 3.69-3.71 (m, 4H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 28.2, 36.3, 61.8, 66.9, 70.4, 70.43, 70.6, 70.7, 72.6, 80.6, 170.9

7.12.2 Synthese von *tert*-Butyl 3-(2-(2-(2-methylsulfonylethoxy) ethoxy) ethoxy) propanoat (**81**)



16.313 g (58.61 mmol) 3-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoat (**80**) wurden in 160 ml abs. DCM unter Argonatmosphäre gelöst und auf 0°C abgekühlt. Im Anschluss wurden tropfenweise 10.070 g (6.804 ml, 87.91 mmol) MsCl und 14.826 g (146.52 mmol, 20.310 ml) NEt₃ (zuvor frisch destilliert über NaH) hinzugegeben. Nach 1 h bei 0°C wurde die gelblich orange Suspension für 18 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die orange Reaktionslösung mit 200 ml einer ges. NaHCO₃-Lsg. verdünnt und dreimal mit 200 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, eingeeengt und säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/Cyclohexan 0:1→9:1; Gradient in 10% Schritte). Es wurden 18.705 g eines gelblichen Öls erhalten.



Ausbeute: 18.705 g, 89%

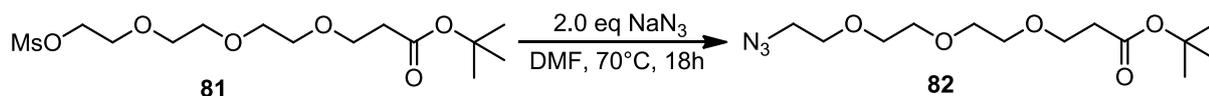
R_f-Wert: 0.88 (DCM/MeOH 9:1, KMnO₄)

HRMS: Berechnet für: 357.15776 [M+H]⁺C₁₄H₂₉O₈S, 374.18431 [M+NH₄]⁺C₁₄H₃₂O₈NS, 379.13971 [M+Na]⁺C₁₄H₂₈O₈NaS; gefunden: 357.15873 [M+H]⁺C₁₄H₂₉O₈S, 374.18524 [M+NH₄]⁺C₁₄H₃₂O₈NS, 379.14007 [M+Na]⁺C₁₄H₂₈O₈NaS

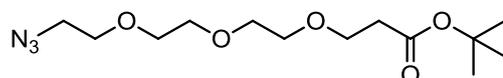
LC-ESI-MS: *t_R* = 7.60 min; pos. Mod; m/z: 356.84 [M]⁺

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.43 (s, 9H), 2.46-2.49 (t, J= 6.5 Hz, 2H), 3.06 (s, 3H), 3.57-3.66 (breites m, 8H), 3.67-3.70 (t, J= 6.5 Hz, 2H), 3.74-3.76 (m, 2H), 4.35-4.37 (m, 2H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 28.2, 36.4, 37.82, 67.0, 69.1, 69.4, 70.5, 70.62, 70.65, 70.7, 80.6, 170.9

7.12.3 Synthese von *tert*-Butyl 3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoat (**82**)

8.553 g (131.57 mmol) NaN_3 wurden zu 15.632 g (43.86 mmol) *tert*-Butyl-3-(2-(2-(2-methylsulfonylethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoat (**81**) gelöst in 50 ml abs. DMF gegeben. Die Suspension wurde bei 70°C für 18 h gerührt. Nach abkühlen auf RT wurde die Suspension mit 100 ml H_2O verdünnt und dreimal mit 100 ml EtOAc extrahiert. Die organischen Phasen wurden einmal mit 100 ml H_2O gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 1:0→99:1; Gradient in 1% Schritte). Es wurden 9.774 g eines gelblichen Öls erhalten.



Ausbeute: 9.774 g, 73%

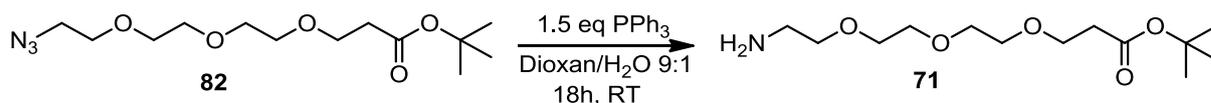
R_f -Wert: 0.84 (DCM/MeOH 9:1, KMnO_4)

HRMS: Berechnet für: 304.18670 $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_5\text{N}_3$, 321.21325 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$
 $\text{C}_{13}\text{H}_{29}\text{O}_5\text{N}_4$, 326.16864 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}_5\text{N}_3\text{Na}$; gefunden: 304.18709 $[\text{M}+\text{H}]^+$
 $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{O}_5\text{N}_3$, 321.21377 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ $\text{C}_{13}\text{H}_{29}\text{O}_5\text{N}_4$, 326.16884 $[\text{M}+\text{Na}]^+$
 $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{O}_5\text{N}_3\text{Na}$

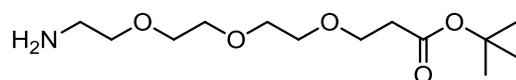
LC-ESI-MS: t_R = 8.58 min; pos. Mod; m/z: 303.98 $[\text{M}]^+$

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, CDCl_3) δ = 1.41-1.42 (s, 9H), 2.44-2.49 (m, 2H), 3.33-3.37 (m, 2H), 3.58-3.70 (breites m, 12H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 28.6, 36.4, 50.8, 66.9, 70.1, 70.4, 70.6, 70.7, 70.7, 80.5, 170.9

7.12.4 Synthese von *tert*-Butyl 3-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoate(71)

1.0 g (3.30 mmol) *tert*-Butyl 3-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoate (**82**) wurden in 20 ml Dioxan/H₂O 9:1 gelöst. Im Anschluss wurden 1.123 g (4.29 mmol) PPh₃ hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 18 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde *in vacuo* aufkonzentriert und säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/[EtOAc/CH₃COOH/MeOH/H₂O 3:3:3:1] 1:0→2:8; Gradient in 20% Schritte). Die vereinigten organischen Phasen wurden mehrmals mit Toluol coevapuriert um Spuren von H₂O zu entfernen. Es wurden 1.048 g eines rötlichen Öls erhalten.



Ausbeute: 1.048 g, 92%

R_f-Wert: 0.51 (EtOAc/CH₃COOH/MeOH/H₂O 3:3:3:1, KMnO₄)

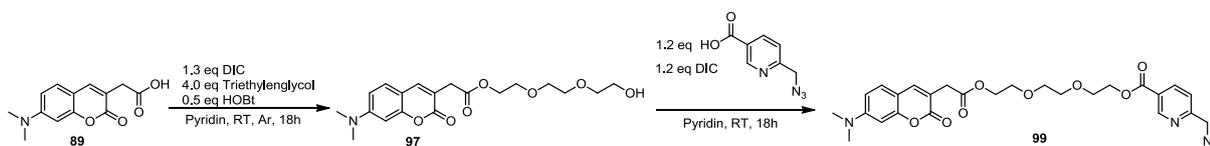
HRMS: Berechnet für: 278.19620 [M+H]⁺; gefunden: 278.19643 [M+H]⁺

LC-ESI-MS: *t_R* = 4.58 min; pos. Mod; m/z: 278.14 [M+H]⁺

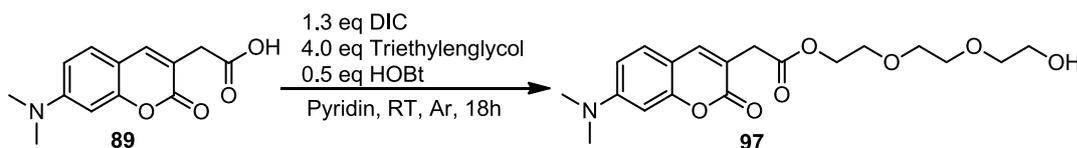
¹H-NMR: (400 MHz, MeOD-d₄) δ = 1.46 (s, 9H), 2.48-2.51 (m, 2H), 3.11-3.14 (m, 2H), 3.62-3.72 (breites m, 12H)

¹³C-NMR: (101MHz, MeOD-d₄) δ = 22.5, 28.4, 37.2, 40.6, 67.8, 67.9, 71.2, 71.4, 71.5, 81.8, 172.8

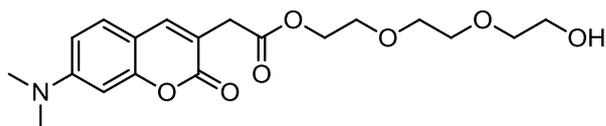
7.13 Synthese von 2-(2-(2-(2-(7-(Dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl) acetoxy)ethoxy)ethoxy) ethyl 6-(azidomethyl) nicotinat (99)



7.13.1 Synthese von 2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-2-(7-(Dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetat (97)



770 mg (3.11 mmol) 2-(7-(Dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)essigsäure (**89**) wurden in 15 ml abs. Pyridin unter Argonatmosphäre gelöst und 510.9 mg (625 µl, 4.05 mmol) DIC hinzugegeben. Nach 15 min wurden 210 mg (1.56 mmol) HOBt und 1.871 g (1.637 ml, 12.46 mmol) Triethylenglycol hinzugegeben, und die gelblich orange Lösung wurde für 18 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Pyridin *in vacuo* entfernt und der Rückstand in 100 ml EtOAc aufgenommen und einmal mit 50 ml ges. NaCl gewaschen. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 50 ml EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, auf Silica aufgezogen und säulenchromatographisch gereinigt (PE/EtOAc 1:0→8:2→6:4→1:1, anschließend Gradient in 5% Schritte bis auf 75% EtOAc). Es wurden 703 mg eines neongelben Öls erhalten.



Ausbeute: 703 mg, 60%

R_f-Wert: 0.25 (EtOAc/MeOH 9 :1, KMnO₄ oder UV-Lampe)

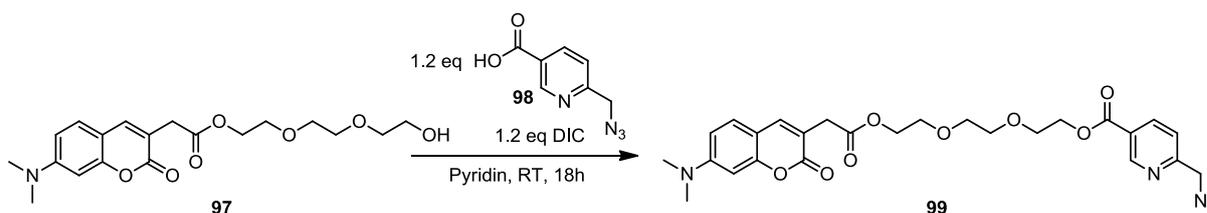
HRMS: Berechnet für: 380.17038 C₁₉H₂₆O₇N [M+H]⁺, 402.15232 C₁₉H₂₅O₇N [M+Na]⁺; gefunden: 380.17047 C₁₉H₂₆O₇N [M+H]⁺, 402.15191 C₁₉H₂₅O₇N [M+Na]⁺

LC-ESI-MS: t_R = 6,60-6,93 min; pos. Mod; m/z: 380,08 [M+H]⁺

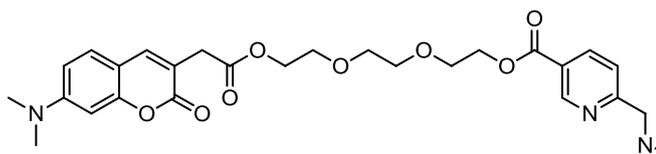
¹H-NMR: (400 MHz, MeOD-d₄) δ = 3.04 (s, 6H), 3.52-3.54 (m, 2H), 3.57 (s, 4H); 3.63-3.69 (m, 5H); 3.82 (s, 2H), 4.26-4.28 (m, 2H); 6.04 (s, 1H), 6.49 (d, 2.6 Hz, 1H); 6.69-6.72 (dd, 9.0, 2.6 Hz, 1H); 7.45-7.47 (dd, 9.0 Hz, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, MeOD-d₄) δ = 38.4, 40.2, 62.2, 65.6, 69.9, 71.4, 71.5, 73.7, 98.7, 109.6, 110.5, 110.6, 111.2, 126.9, 151.6, 154.7, 157.1, 164.1, 170.9

7.13.2 Synthese von 2-(2-(2-(2-(7-(Dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-6-(azidomethyl) nicotinat (**99**)



45.8 mg (0.18 mmol) 6-(Azidomethyl)nicotinsäure (**98**) wurden in 3 ml abs. Pyridin unter Argonatmosphäre gelöst und 22.48 mg (27.5 μ l, 0.18 mmol) DIC hinzugegeben. Nach 5 min wurden 52 mg (0.18 mmol) 2-(2-(2-Hydroxyethoxy)ethoxy)ethyl 2-(7-(dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetat (**97**) hinzugegeben. Die gelblich orange Lösung wurde für 18h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Pyridin *in vacuo* entfernt in MeOH gelöst und auf Silica aufgezogen und säulenchromatographisch gereinigt (PE/EtOAc 1:0 \rightarrow 8:2 \rightarrow 6:4 \rightarrow 1:1, anschließend Gradient in 5% Schritte bis auf 75% EtOAc). Es wurden 11 mg eines neongelben Öls erhalten



Ausbeute: 11 mg, 15%

R_f -Wert: 0.88 (EtOAc/MeOH 9:1, KMnO_4 oder UV-Lampe)

HRMS: Berechnet für: 540.20889 $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_8\text{N}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 562.19083 $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{O}_8\text{N}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$; gefunden: 540.20888 $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_8\text{N}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 562.19013 $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{O}_8\text{N}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$

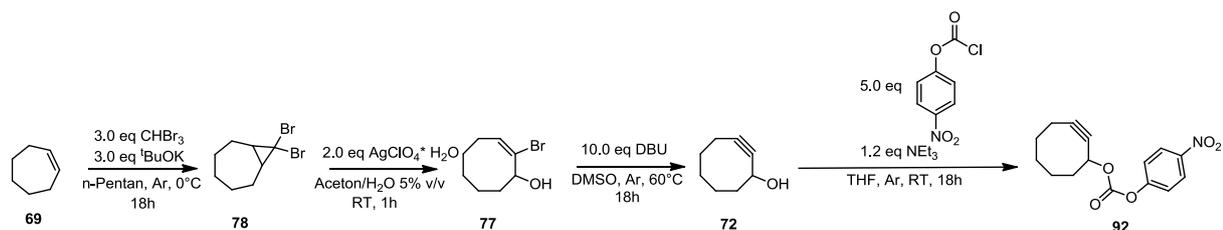
LC-ESI-MS: $t_R = 8,45\text{-}8,90$ min; pos. Mod; m/z : 540,07 $[\text{M}+\text{H}]^+$

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, MeOD-d_4) $\delta = 3.05$ (s, 6H), 3.30-3.31 (m, 2H), 3.58-3.68 (m, 5H), 3.80-3.83 (m, 4H), 4.24-4.26 (m, 2H), 4.46-4.48 (m, 2H), 4.54 (s, 2H), 6.04 (m, 1H), 6.49-6.50 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 6.70-6.73 (dd, $J = 9.0, 2.6$ Hz, 1H), 7.46-7.48 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.49-7.51 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.31-8.33, (dd, $J = 8.1, 2.2$ Hz, 1H), 9.05-9.06 (dd, $J = 2.1$ Hz, 0.8 Hz, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (101MHz, MeOD-d_4) $\delta = 40.2, 55.9, 65.6, 65.7, 69.9, 70.1, 71.6, 71.7, 98.7, 109.6, 110.5, 110.6, 123.1, 126.8, 127.0, 139.6, 151.3, 154.7, 155.0, 157.1, 161.6, 164.1, 166.1, 170.9$

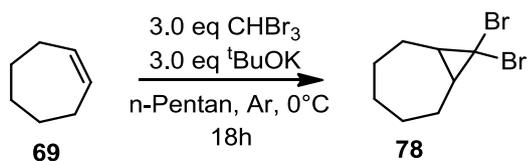
Synthese der Verbindungen

7.14 Synthese von Cyclooct-2-yn-1-yl (4-nitrophenyl) carbonat (92)^[146]



Genereller Umgang mit Cyclooctinen

Da es sich bei diesen Verbindungen um gespannte Ringsysteme handelt, sollten sie nur möglichst für einen kurzen Zeitraum unter milden Temperaturen (Wasserbad 30°C) aufkonzentriert werden um eine akkurate Ausbeutebestimmung zu gewährleisten. Sie sind in Lösung (mindestens 2 ml/100 mg) bei -20°C für einige Tage bis Wochen lagerbar, jedoch nur wenige Minuten bis Stunden, wenn sie aufkonzentriert werden.

7.14.1 Synthese von 8,8-Dibromobicyclo[5.1.0]octan (78)^[146]

Unter Argonatmosphäre wurden 18.46 g (164.51 mmol) ^tBuOK und 6.4 ml Cyclohepten in 150 ml abs. *n*-Pentan vorgelegt. Die Suspension wurde auf 0°C abgekühlt und tropfenweise 41.576 g (14.378 ml, 164.51 mmol) CHBr₃ gelöst in 100 ml abs. *n*-Pentan über einen Zeitraum von 2 h zugegeben. Im Anschluss wurde die braune Lösung für 18 h bei RT gerührt. Die orange/braune Reaktionslösung wurde mit 100 ml H₂O gequenscht und mit konz. HCl auf neutralem pH gebracht. Im Anschluss wurde die wässrige Phase noch dreimal mit 100 ml PE extrahiert. Die organischen Phasen wurden zweimal mit 100 ml H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (reines Cyclohexan). Es wurden 14.393 g eines klaren Öls erhalten.



Ausbeute: 14.393g, 97%

R_f-Wert: 0.92 (Cyclohexan) nur UV-sichtbar

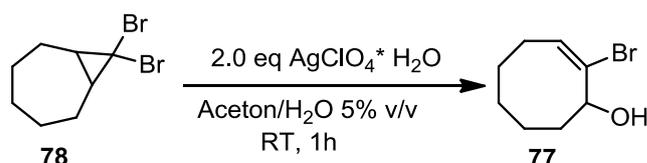
HRMS: Berechnet für: 265.93002 C₈H₁₂⁷⁹Br₂ [M]⁺, 267.92798 C₈H₁₂⁷⁹Br₁⁸¹Br₁ [M]⁺, 269.92593 C₈H₁₂⁸¹Br₂ [M]⁺; gefunden: 265.92949 C₈H₁₂⁷⁹Br₂ [M]⁺, 267.92790 C₈H₁₂⁷⁹Br₁⁸¹Br₁ [M]⁺, 269.92580 C₈H₁₂⁸¹Br₂ [M]⁺

GC-MS: *t_R* = 3.934 min; DB_100_S, m/z: 268, 212, 187, 172, 147, 133, 107, 82, 67, 51

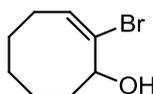
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.14-1.25 (m, 3H), 1.32-1.44 (m, 2H), 1.66-1.75 (m, 2H), 1.80-1.91 (m, 3H), 2.23-2.27 (m, 2H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 28.1, 29.0, 32.4, 34.8, 40.8

7.14.2 Synthese von (E)-2-Bromocyclooct-2-enol (**77**)^[151]



500 mg (1.87 mmol) 8,8-Dibromobicyclo[5.1.0]octan(**78**) wurden unter Argonatmosphäre in 10 ml Aceton/H₂O 5% v/v gelöst. Im Anschluss wurden 844 mg (3.73 mmol) AgClO₄·H₂O hinzugegeben und die Lösung wurde für 4 h bei RT unter Lichtausschluss gerührt. Die gräulich grüne Suspension wurde mit 300 ml EtOAc verdünnt und dreimal mit 100 ml 1N HCl gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/Cyclohexan 0:1 → 2:8; Gradient in 5% Schritten). Zur Ausbeutebestimmung wurde die Lösung aufkonzentriert, danach jedoch wieder in 5 ml CHCl₃ oder CDCl₃ gelöst und bei mindestens -20°C gelagert. Es wurden 205 mg eines weißen instabilen Feststoffes erhalten.



Ausbeute: 205 mg, 54%

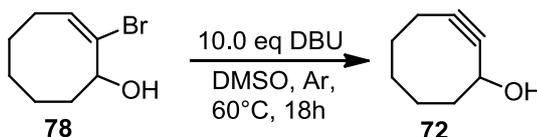
R_f-Wert: 0.46 (EtOAc/Cyclohexan 2:8, KMnO₄)

HRMS: Berechnet für: 204.01443 C₈H₁₃O₁⁷⁹Br₁ [M]⁺, 206.01238 C₈H₁₃O₁⁸¹Br₁ [M]⁺;
 gefunden: 204.01425 C₈H₁₃O₁⁷⁹Br₁ [M]⁺, 206.01216 C₈H₁₃O₁⁸¹Br₁ [M]⁺

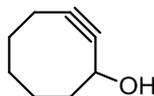
GC-MS: *t_R* = 3.888 min; DB_100_S, m/z: 204, 175, 148, 125, 107, 81, 53

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 0.77-0.86 (m, 1H), 1.22-1.30 (m, 1H), 1.43-1.55 (m, 1H), 1.67-1.92 (m, 3H), 1.99-2.07 (m, 1H), 2.28-2.33 (m, 1H), 2.62-2.73 (qd, J= 11.9, 5.4 Hz, 1H), 4.16-4.20 (dd, J= 10.4, 5.2 Hz, 1H), 6.09-6.13 (dd, J= 11.7, 4.2 Hz, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 26.4, 28.3, 33.4, 36.7, 42.9, 77.5, 129.5, 134.4

7.14.3 Synthese von Cyclooct-2-ynol (**72**)^[146]

163 mg (0.8 mmol) (*E*)-2-Bromocyclooct-2-enol (**78**) wurden unter Argonatmosphäre in 5 ml abs. DMSO gelöst. Im Anschluss wurden 2.0 eq. (238 μ l) DBU hinzugegeben und die hell blaue Lösung wurde auf 60°C erwärmt, bevor weitere 8.0 eq. (960 μ l) DBU hinzugegeben und für 18 h bei 60°C gerührt wurden. Nach abkühlen auf RT wurde die gelbliche Lösung mit 50 ml H₂O versetzt, mit konz. HCl auf pH1 gebracht und dreimal mit 50 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zweimal mit 50 ml einer 1M HCl-Lsg und einmal mit 50 ml einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen, bevor sie über Na₂SO₄ getrocknet wurde. Es wurden 90.4 mg eines klaren Öls erhalten, welches in 5 ml CHCl₃ oder CDCl₃ gelöst und bei mindestens -20°C gelagert werden sollte.



Ausbeute: 90 mg, 91%

R_f-Wert: 0.5 (Cyclohexan/EtOAc 8:2, KMnO₄)

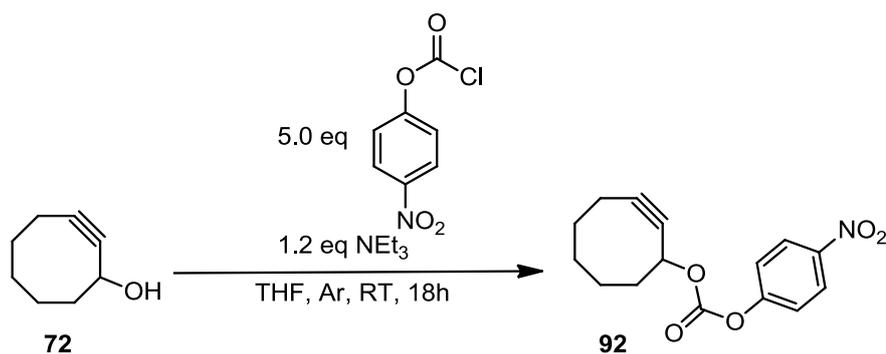
HRMS: Berechnet für: 125.09609 C₈H₁₃O[M+H]⁺, 107.08553 C₈H₁₁ [M-H₂O]⁺;
gefunden: 125.09572 C₈H₁₃O[M+H]⁺, 107.08057 C₈H₁₁ [M-H₂O]⁺

GC-MS: *t_R* = 2.905 min; DB_100_S; m/z: 123, 186, 95, 81, 67, 53

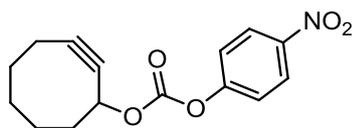
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.44-1.53 (m, 1H), 1.57-1.62 (m, 2H), 1.65-1.79 (m, 1H), 1.82-1.96 (m, 3H), 2.08-2.28 (m, 3H), 4.43-4.46 (m, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 20.8, 26.0, 29.8, 34.5, 45.3, 64.7, 94.2, 99.8

7.14.4 Synthese von Cyclooct-2-yn-1-yl (4-nitrophenyl) carbonat (**92**)^[146, 147]



132 mg (1.06 mmol) Cyclooct-2-ynol (**72**) gelöst in 5 ml CHCl₃ wurden zusammen mit 139.83 mg (191.54 µl, 1.38 mmol) NEt₃ tropfenweise unter Argonatmosphäre zu 1.071 g (5.31 mmol) Paranitrophenolchloroformat, gelöst in 10 ml abs. THF, gegeben. Nach Zugabe wurde die Reaktionslösung für 18 h bei RT gerührt. Zu dieser weißen Suspension wurde Silica gegeben, das Lösemittel *in vacuo* entfernt und das Silica auf die Säule gegeben (PE/EtOAc 95:5; Gradient in 2.5% Schritten). Es wurden 259 mg eines klaren Öls erhalten.



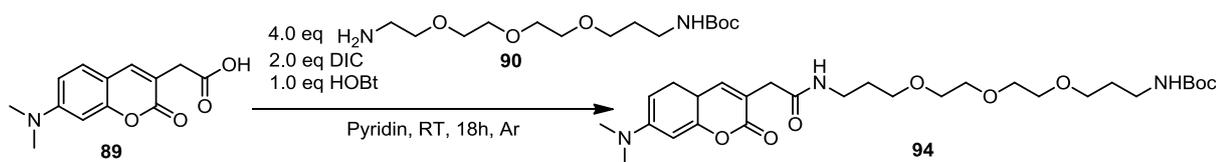
Ausbeute: 259 mg, 84%

R_f-Wert: 0.71 (Cyclohexan/EtOAc 9:1, KMnO₄)

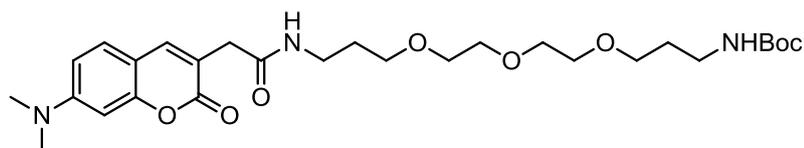
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.59-1.67 (m, 2H), 1.73-1.86 (m, 2H), 1.91-1.98 (m, 2H), 2.16-2.26 (m, 3H), 2.28-2.36 (m, 2H), 5.30-5.34 (m, 1H), 7.38-7.40 (d, J= 9.2 Hz, 1H), 8.25-8.28 (d, J= 9.2 Hz, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 20.8, 26.1, 29.6, 34.2, 41.5, 60.6, 72.2, 89.3, 104.2, 121.9, 125.4, 151.8, 155.6

7.15.1 Synthese von tert-Butyl (1-(7-(dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azahexadecan-16-yl)carbammat (94)



160 mg (0.65 mmol) 2-(7-(Dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)essigsäure (**89**) wurden in 15 ml abs. Pyridin gelöst und 123 mg (151 μ l, 0.98 mmol) DIC hinzugegeben. Nach 15 min wurden 87.9 mg (0.65 mmol) HOBt und 834 mg (2.60 mmol) tert-butyl 3-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)propanoat (**90**)^[156] hinzugegeben, und die gelblich orange Lösung wurde für 18 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Pyridin *in vacuo* entfernt und der Rückstand in 50 ml EtOAc aufgenommen und einmal mit 50 ml ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die wässrige Phase wurde zweimal mit 50 ml EtOAc extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, auf Silica aufgezogen und säulenchromatographisch gereinigt (PE/EtOAc 1:0→8:2→6:4→1:1→8:2→0:1; anschließend EtOAc/MeOH 97.5: 2.5). Es wurden 243 mg eines neongelben Öls erhalten



Ausbeute: 243 mg, 68%

R_f-Wert: 0.08 (EtOAc; KMnO₄)

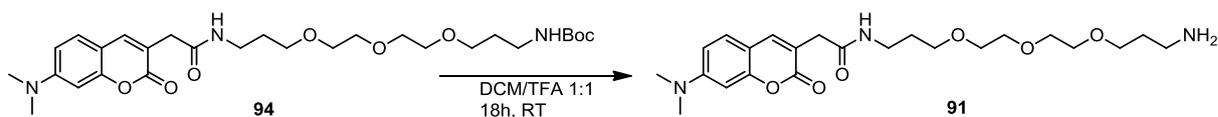
HRMS: Berechnet für: 550.31229 C₂₈H₄₄O₈N₃ [M+H]⁺, 572.29424 C₂₈H₄₃O₈N₃Na [M+Na]⁺; gefunden: 550.31293 C₂₈H₄₄O₈N₃ [M+H]⁺, 572.29431 C₂₈H₄₃O₈N₃Na [M+Na]⁺

LC-ESI-MS: *t_R* = 9,29-9,67 min; pos. Mod; m/z: 549,9 [M]⁺

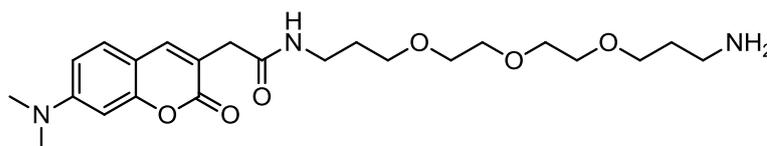
¹H-NMR: (400 MHz, MeOD-d₄) δ = 1.42 (s, 9H), 1.67-1.79 (m, 5H), 3.06 (m, 6H), 3.09-3.12 (m, 3H), 3.47-3.51 (m, 5H), 3.53-3.56 (m, 5H), 3.59-3.62 (m, 5H), 3.67 (s, 2H), 6.05 (s, 1H), 6.54-6.55 (d, J= 2.5 Hz, 1H) 6.73-6.76 (dd, J= 9.0, 2.5 Hz, 1H), 7.55-7.57 (d, J= 9.0 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H)

¹³C-NMR: (101 MHz, MeOD-d₄) δ = 28.8, 30.2, 30.3, 30.9, 38.2, 38.6, 40.2, 40.3, 49.8, 69.8, 71.2, 71.5, 79.8, 98.7, 109.7, 110.4, 110.5, 126.9, 152.8, 154.7, 157.2, 158.4, 164.2, 170.9

7.15.2 Synthese *N*-(3-(2-(2-(3-Aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-2-(7-(dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl) acetamid (**91**)



243 mg (0.442 mmol) *tert.*-Butyl-(1-(7-(Dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azahexadecan-16-yl)carbamat (**94**) wurden in 10 ml DCM/TFA 1:1 gelöst und 18 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde das Lösemittel entfernt und 197 mg eines gelblichen Öls erhalten.



Ausbeute: 197 mg, 99%

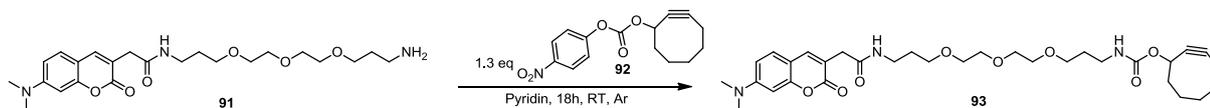
HRMS: Berechnet für: 450.25986 C₂₃H₃₆O₆N₃ [M+H]⁺; gefunden: 450.25923 C₂₃H₃₆O₆N₃ [M+H]⁺

LC-ESI-MS: *t*_R = 7.02-7.43 min; pos. Mod; *m/z*: 450.23 [M+H]⁺

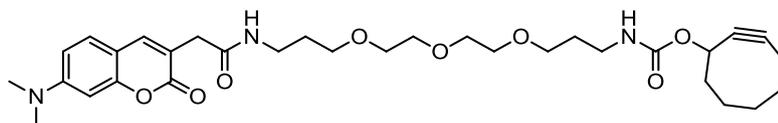
¹H-NMR: (400 MHz, MeOD-*d*₄) δ = 1.73-1.79 (m, 2H), 1.84-1.92 (m, 2H), 3.03-3.06 (m, 2H), 3.07 (s, 6H), 3.46-3.51 (m, 2H), 3.52-3.55 (m, 2H), 3.60-3.64 (m, 9H), 3.68 (s, 2H), 6.04 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 6.75-6.78 (dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz, 1H), 7.59-7.56 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, MeOD-*d*₄) δ = 27.9, 30.4, 31.1, 37.9, 40.1, 40.2, 69.5, 70.4, 70.9, 71.0, 71.3, 98.8, 110.3, 110.6, 126.9, 153.0, 154.8, 157.2, 164.3, 171.1

7.15.3 Synthese Cyclooct-2-yn-1-yl (1-(7-(dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)-2-oxo-7,10,13-trioxa-3-azahexadecan-16-yl)carbamat (93)



185.45 mg (0.44 mmol) *N*-(3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-2-(7-(dimethylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetamid (**91**) wurden in 5 ml abs. Pyridin gelöst und bei 0°C 165 mg (0.57 mmol) Cyclooct-2-yn-1-yl(4-nitrophenyl)carbonat (**92**) gelöst in 1.2 ml CHCl₃ hinzu getropft. Nach 18 h bei RT wurde die gelbliche Suspension *in vacuo* aufkonzentriert, mit 10 ml DCM verdünnt und auf Silica aufgezogen. Anschließend säulenchromatographisch aufgereinigt (PE/EtOAc 1:0→9:1, Gradient in 2.5% Schritte). Es wurden 201 mg eines braunen Öls erhalten.



Ausbeute: 201 mg; 80%

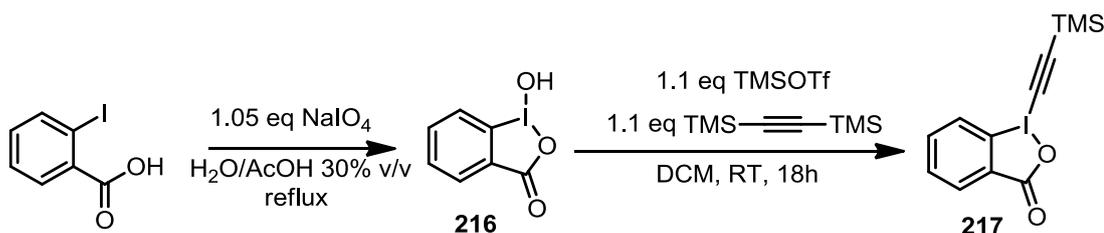
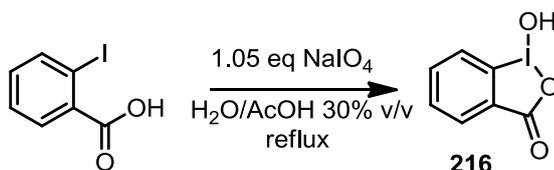
R_f-Wert: 0.29 (EtOAc/MeOH 9:1, KMnO₄)

HRMS: Berechnet für: 600.32794 C₃₂H₄₆O₈N₃ [M+H]⁺, 622.30989 C₃₂H₄₅O₈N₃Na [M+Na]⁺, 617.35449 C₃₂H₄₉O₈N₄ [M+NH₄]⁺; gefunden: 600.32805 C₃₂H₄₆O₈N₃ [M+H]⁺, 622.30916 C₃₂H₄₅O₈N₃Na [M+Na]⁺, 617.35427 C₃₂H₄₉O₈N₄ [M+NH₄]⁺

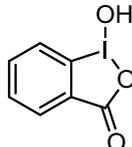
LC-ESI-MS: *t_R* = 9.50-9.87 min; pos. Mod; *m/z*: 600.1 [M+H]⁺

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.08-1.18 (m, 7H), 1.23-1.27 (m, 2H), 1.44-1.64 (m, 3H), 2.44 (s, 6H), 2.52-2.55 (m, 2H), 2.68-2.70 (m, 4H), 2.85-2.89 (m, 5H), 2.92-2.95 (m, 5H), 2.98-3.00 (m, 5H), 3.06 (s, 2H), 4.50-4.54 (m, 1H), 5.42 (s, 1H), 5.89-5.90 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 6.10-6.13 (dd, *J* = 9.1, 2.5 Hz), 6.93-6.95 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 20.7, 20.8, 26.3, 28.6, 29.5, 29.7, 34.3, 38.6, 38.9, 40.2, 40.4, 41.9, 67.0, 69.4, 70.0, 70.1, 70.3, 77.3, 98.2, 109.3, 110.2, 125.8, 126.7, 142.7, 144.4, 150.2, 153.1, 156.0, 162.1, 168.6, 174.8

7.16 Synthese von TMS-EBX (217)^[200]7.16.1 Synthese von 1-Hydroxyl-1,2-benziodoxol-3(1H)-on (216)^[200]

7.4 g (29.84 mmol) 2-Iodobenzoensäure und 6.7 g (31.33 mmol) NaIO_4 wurden zu 45 ml $\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}$ (30 % v/v) gegeben und für 4 h refluxiert. Nach abkühlen auf 50°C wurden 120 ml eiskaltes H_2O hinzugegeben. Die weiße Suspension wurde abfiltriert und anschließend dreimal mit 30 ml eiskaltem H_2O und dreimal mit 30 ml eiskaltem Aceton gewaschen und am HV übernacht getrocknet. Es wurden 7.596 g eines weißen Feststoffes erhalten.



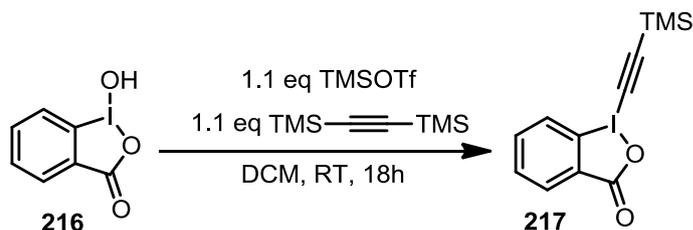
Ausbeute: 7.5936 g, 96%

R_f -Wert: 0.39 (EtOAc/Cyclohexan 2:8, KMnO_4)

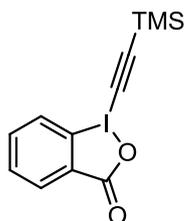
HRMS: Berechnet für: 233.10196 $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 255.08391 $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 250.12851 $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$; gefunden: 233.10219 $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 255.08382 $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 250.12895 $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 7.68-7.72 (td, $J=7.5, 1.0$ Hz, 1H), 7.84-7.86 (d, $J= 8.1$ Hz, 1H), 7.94-7.98 (ddd, $J= 8.2, 7.2, 1.5$ Hz), 8.00-8.03 (dd, $J= 7.5, 1.5$ Hz, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 120.4, 126.3, 130.4, 131.1, 131.5, 134.4, 167.7

7.16.2 Synthese von 1-[(Trimethylsilyl)ethynyl]-1,2-benziodoxol-3(1H)-on (TMS-EBX) (**217**)^[200]

Zu 7.82 g (29.6 mmol) 1-Hydroxyl-1,2-benziodoxol-3(1H)-on (**216**) gelöst in 100 ml abs. DCM wurden bei RT unter Argonatmosphäre tropfenweise 7.24 g (5.89 ml, 32.6 mmol) TMSOTf hinzugegeben und 1 h bei RT gerührt. Zu dieser Lösung wurden bei RT tropfenweise 5.55 g (7.38 ml, 32.6 mmol) Bis(trimethylsilyl)acetylen hinzugegeben, woraufhin sich eine weiße Suspension bildet. Nach vollständiger Zugabe wurde die gelblichweiße Suspension über Nacht gerührt. Zu dieser weißen Suspension wurde soviel ges. NaHCO₃-Lsg. unter rühren hinzugegeben, bis sich der Niederschlag vollständig löst. Die organische Phase wurde separat aufbewahrt und die wässrige Phase wurde ein weiteres Mal mit 100 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden ein weiteres Mal mit 100 ml ges. NaHCO₃-Lsg gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Der gelblich weiße Feststoff wurde in Acetonitril vollständig gelöst und auf 1/5 des Gesamtvolumens aufkonzentriert (Wasserbad 40°C). Der dadurch resultierende weiße Feststoff wurde abfiltriert und am HV getrocknet. Es wurden 7.31 g eines weißen Feststoffes erhalten.

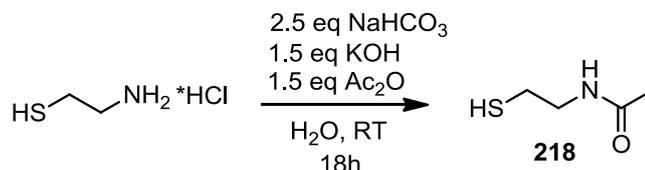


Ausbeute: 7.31 g, 72%

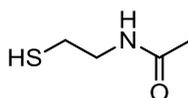
¹H-NMR: (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 0.31 (s, 9H), 7.72-7.79 (m, 2H), 8.17-8.20 (m, 1H), 8.38-8.40 (m, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, DMSO-d₆) δ = 0.35, 55.1, 66.5, 114.5, 115.8, 127.2, 131.4, 132.3, 135.1, 166.2

7.17 Synthese von CoA-Mimetika

7.17.1 Synthese von N-Acetylcysteamin (SNAC) (218)^[114]

20.00 g (176 mmol) Cysteaminehydrochlorid, 36.97 g (440 mmol) NaHCO₃ und 11.62 g (259 mmol) KOH wurden zu 500 ml bidest. H₂O gegeben. Nachdem sich alles vollständig gelöst hatte, wurden unter Eiskühlung langsam 19.77 g (18.31 ml, 259 mmol) Ac₂O tropfenweise hinzugegeben. Nach 18 h rühren bei RT wurde die leicht rosa gefärbte Lösung unter Eiskühlung mit konz. HCl auf pH1 angesäuert. Die klare Lösung wurde dreimal mit 150 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel *in vacuo* entfernt um 20.47 g (98%) des Produktes als klares übelriechendes Öl zu erhalten.



Ausbeute: 20.47 g, 98%

R_f-Wert: 0.42 (MeOH/DCM 1:9, KMnO₄; Vanilinfärbung : gelblich bis rötlich)

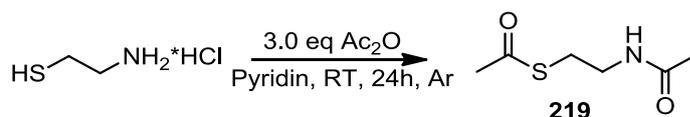
HRMS: Berechnet für: 120.04776 C₄H₁₀ONS [M+H]⁺; gefunden: 120.04730 C₄H₁₀ONS [M+H]⁺

GC-MS: *t_R* = 5.329 min; DB_50_S; m/z: 119, 102, 76, 60, 43

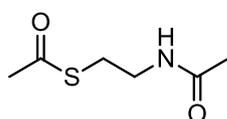
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁): δ = 1.34–1.38 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 1.97 (s, 3H), 2.60–2.66 (m, 2H), 3.36–3.40 (m, 2H), 6.33 (bs, 1H)

¹³C-NMR: (101 MHz, CDCl₃-d₁): δ = 23.1, 24.5, 42.6, 170.5

7.17.2 Synthese von S-(2-Acetamidoethyl)ethanethioat (AcSNAC) (219)



20 g (176 mmol) Cysteaminehydrochlorid wurden in 250 ml Pyridin gelöst. Im Anschluss wurden über einen Zeitraum von 2 h unter Eiskühlung 53.915 g (49.921 ml, 528 mmol) Ac₂O hinzuge tropft und die Reaktionslösung für weitere 18 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und der verbleibende Rückstand mit ges. NaCl-Lsg. versetzt und viermal mit 100 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch (DCM/MeOH 1:0 → 99:1, Gradient in 1% Schritten) gereinigt. Es wurden 24.505 g eines braunen Öls erhalten.



Ausbeute: 24.505 g, 86%

R_f-Wert: 0.4 (MeOH/DCM 1:9, KMnO₄)

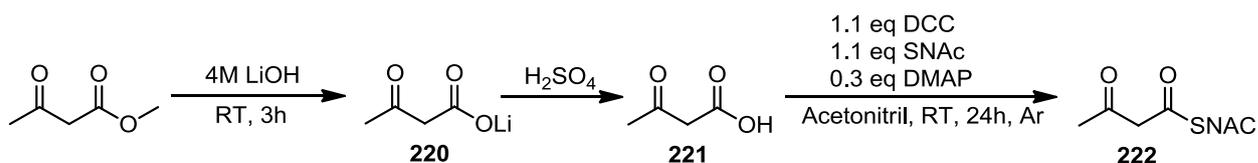
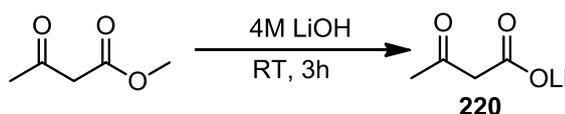
HRMS: Berechnet für: 162.05833 [M+H]⁺ C₆H₁₂O₂NS, 184.04027 [M+Na]⁺ C₆H₁₂O₂NSNa; gefunden: 162.05828 [M+H]⁺ C₆H₁₂O₂NS, 184.04023 [M+Na]⁺ C₆H₁₂O₂NSNa

GC-MS: t_R = 6.181 min; DB_50_S; m/z: 162, 119, 102, 76, 60, 43

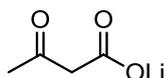
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.94 (s, 3H), 2.33 (s, 3H), 2.98-3.01 (t, J= 6.3Hz, 2H), 3.37-3.42 (q, J=6.3 Hz, 2H), 6.08 (bs, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ =23.3, 28.9, 30.7, 39.63, 170.4, 196.3

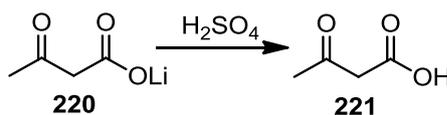
7.17.3 Synthese von S-(2-Acetamidoethyl) 3-oxobutanethioat(222) (AcAcSNAC)

7.17.3.1 Synthese von Lithium 3-oxobutanoat (220)^[326]

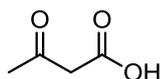
5.385 g (5.0 ml, 46.37 mmol) Acetylacetonmethylester wurden zu einer 4M LiOH-Lsg. hinzugegeben und 3h bei RT gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle) wurde die klare Lösung am Wasserbad (40°C) aufkonzentriert. Der weiße Feststoff wurde dreimal mit 50 ml MeOH versetzt und abdekantiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden gefiltert und *in vacuo* aufkonzentriert. Es wurden 2.66 g in Form eines weißen Pulvers erhalten.



Ausbeute: 2.66 g, 53%

7.17.3.2 Synthese von 3-Oxobutanoat (221)^[327]

1.0 g (9.25 mmol) Lithium-3-oxobutanoat (220) wurden in einer minimal Menge H₂O gelöst. Die klare Lösung wurde mit konz. H₂SO₄ auf pH1 angesäuert, mit NaCl gesättigt und dreimal mit 50 ml Et₂O extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet. Nach aufkonzentrieren (Wasserbad 30°C) erhielt man 259 mg eines klaren, Temperatur sensitives Öls welches sofort weiter verwendet wurde.

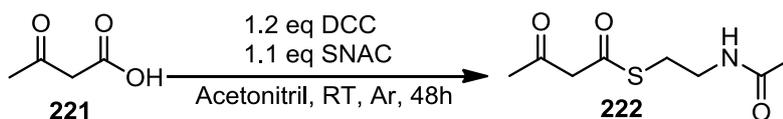


Ausbeute: 259 mg, 27%

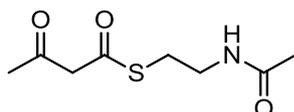
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 2.29 (s, 3H), 3.51 (s, 2H), 8.71 (bs, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 30.4, 49.2, 171.7, 201.7

7.17.3.3 Synthese von S-(2-Acetamidoethyl)-3-oxobutanethioat (**222**)^[327]



S-(2-Acetamidoethyl)-3-oxobutanethioat (**221**) wurde nach leichter Modifikation der Synthesevorschrift von Liu *et al.* synthetisiert.^[327] 259 mg (2.53 mmol) Acetessigsäure wurden in 10 ml abs. Acetonitril gelöst und 361 mg (3.04 mmol) SNAC hinzugegeben. Anschließend wurden bei 0°C tropfenweise 628 mg (3.04 mmol) DCC gelöst in 10 ml Acetonitril hinzugegeben. Die weiße Suspension wurde für 48 h bei RT gerührt, der weiße Feststoff abfiltriert. Die verbleibende Lösung wurde *in vacuo* aufkonzentriert, in einer Minimalmenge DCM gelöst und direkt säulenchromatographisch gereinigt (DCM/MeOH 1:0→99.5:0.5→99:1→97.5:2.5→95:5). Es wurden 162 mg eines gelblichen Öls erhalten.



Ausbeute: 162.0 mg, 32%

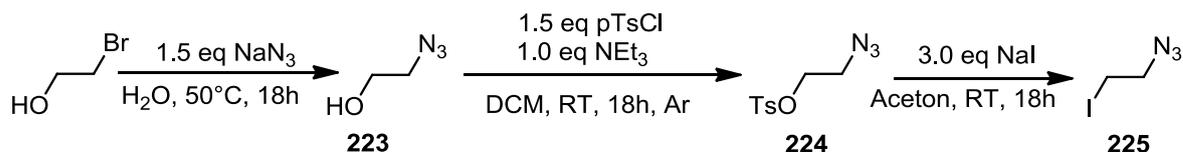
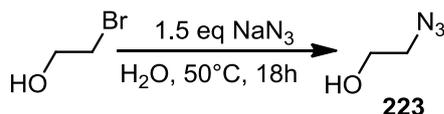
R_f-Wert: 0.47 (MeOH/DCM 1:9, KMnO₄)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) Ketoform: δ = 1.95-1.96 (m, 2H), 2.25-2.26 (dd, J= 1.7 Hz, 3H), 3.05-3.10 (m, 2H), 3.39-3.45 (m, 2H), 3.70 (s, 2H), 6.05 (bs);

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) Enolform: 1.93-1.94 (d, J= 1.4Hz, 2H), 1.95-1.96 (m, 3H), 2.34 (d, J= 1.9Hz, 2H), 2.99-3.03 (dt, J= 6.5, 1.8 Hz, 2H), 3.39-3.45 (m 2H), 5.46 (s, 1H), 6.05 (bs, 1H), 12.56 (s, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) Ketoform: δ = 199.9, 196.4, 170.6, 58.1, 39.7, 30.5, 29.3, 23.2

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) Enolform: δ = 196.4, 174.2, 170.5, 100.0, 39.3, 27.9, 23.3, 21.2

7.18 Synthese von 1-Azido-2-iodoethan (225)^[201]7.18.1 Synthese von 2-Azidoethanol (223)^[201]

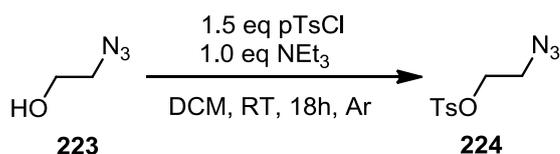
7.8 g (120 mmol) NaN_3 wurden und 12.5 g (7.10 ml, 100 mmol) 2-Bromoethanol wurden in 30 ml dest. H_2O gelöst. Die Reaktionslösung wurde für 18 h auf 50°C erwärmt. Nach abkühlen auf RT wurde die Reaktionslösung mit NaCl abgesättigt und dreimal mit DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und aufkonzentriert (Wasserbad 30°C). Es wurden 6.681 g (76%) eines klaren Öls erhalten, welches direkt weiter umgesetzt wurde.

Ausbeute: 6.681 g, 76%

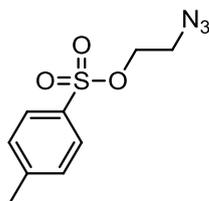
$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 2.10 (s, 1H), 3.42-3.45 (t, J = 4 Hz, 2H), 3.76-3.78 (t, J = 4 Hz, 2H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 53.3, 61.1

7.18.2 Synthese von 2-Azidoethyl-4-methylbenzensulfonate (**224**)^[201]



9.85 g (51.86 mmol) pTsCl wurden in 30 ml abs. DCM unter Argonatmosphäre gelöst. Im Anschluss wurden bei 0°C 3.0 g (34.45 mmol) 2-Azidoethanol (**223**) gelöst in 10 ml trockenem DCM über einen Zeitraum von 10 min zu der milchig trüben Lösung hinzuge tropft. Des Weiteren wurden 6.97 g (34.45 mmol, 9.6 ml) Et₃N (5 min) hinzuge tropft. Die Reaktion wurde für 18 h unter Erreichen von RT gerührt. Zu der klaren Lösung wurden 0.92 g (10.33 mmol) Alanin hinzugegeben und für weitere 4 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung dreimal mit 100 ml einer 1M NaOH gegengeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet. Es wurden 6.621 g eines braunen Öls erhalten.



Ausbeute: 6.621 g, 76%

R_f-Wert: 0.6 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)

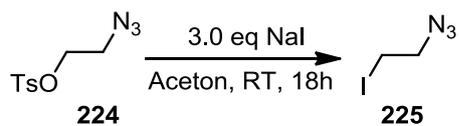
HRMS: Berechnet für: 242.05939 C₉H₁₂O₃N₃S, [M+H]⁺; gefunden: 242.05939
C₉H₁₂O₃N₃S, [M+H]⁺

ATR-IR (ν) 2108.58, 1597.65, 1359.93, 1173.64

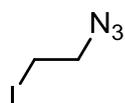
GC-MS: t_R = 4.99 min, DB_100_S, m/z: 227, 155, 91, 65

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 2.44 (s, 3H), 3.45-3.48 (m, 2H), 4.13-4.16 (m, 2H), 7.34-7.36 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.79-7.81 (dd, J = 8.0, 2.8 Hz, 2H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 21.8, 49.8, 68.4, 128.1, 130.2, 132.7, 145.5

7.18.3 Synthese von 1-Azido-2-iodoethan (**225**)^[201]

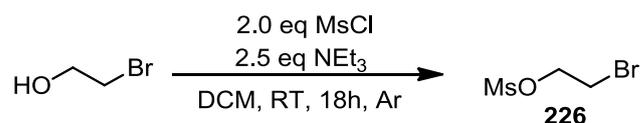
500 mg (1.716 mmol) 2-Azidoethyl 4-methylbenzenesulfonat (**224**) wurden in 5 ml Aceton gelöst. Zu dieser Lösung wurden 779 mg (5.149 mmol) NaI gegeben und für 18 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde das Lösemittel *in vacuo* bei RT vorsichtig entfernt und in 50 ml DCM aufgenommen, zweimal mit 20 ml H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Es wurden 348 mg eines braunen, instabilen Öls erhalten welches sofort weiter verwendet wurde.



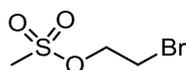
Ausbeute: 348 mg, 85%

R_f-Wert: 0.6 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)

7.19 Synthese von 2-Bromoethylmethansulfonat (226)



2.0 g (1.13 ml, 16.0 mmol) 2-Bromethanol wurden in 10 ml abs. DCM unter Argon gelöst und auf 0°C abgekühlt. Im Anschluss wurden tropfenweise 3.66 g (2.478 ml, 32.0 mmol) MsCl und 4.04 g (5.54 ml, 40.01 mmol) NEt₃ hinzugegeben. Die Lösung wurde für 18 h (DC-Kontrolle) unter langsameserreichen von RT gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktion mit 50 ml einer ges. NaHCO₃-Lsg. gequentscht, dreimal mit 100 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet eingeeengt und säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/EtOAc 1:0→1:9; Gradient in 5% Schritte). Es wurden 2.51 g eines braunen Öls erhalten.



Ausbeute: 2.51 g, 77%

R_f-Wert: 0.61 (Cyclohexan/EtOAc 1:1, KMnO₄)

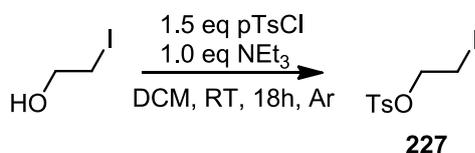
HRMS: Berechnet für: 202.93720 C₃H₈O₃BrS[M+H]⁺, 204.93516 C₃H₈O₃⁸¹BrS₁[M+H]⁺; gefunden: 202.93711 C₃H₈O₃BrS[M+H]⁺, 204.93506 C₃H₈O₃⁸¹BrS₁[M+H]⁺

GC-MS: t_R= 3.162, DB_100_S, m/z: 203, 175, 123, 118, 93, 79, 68

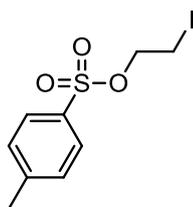
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 3.05 (s, 3H), 3.54-3.57 (t, J=6.1 Hz, 2H), 4.44-4.47 (t, J= 6.1 Hz, 2H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 28.0, 37.8, 68.5

7.20 Synthese von 2-Iodoethyl-4-methylbenzenesulfonat (227)



5.0 g (29.08 mmol) 2-Iodoethanol wurden unter Argonatmosphäre in 40 ml abs. DCM gelöst und 8.315 g (43.61 mmol) pTsCl hinzugegeben. Bei 0°C wurden tropfenweise 5.884 g (8.061 ml, 29.08 mmol) NEt₃ hinzugegeben. Die orange gelbliche Lösung wurde für 30 min bei 0°C und für 18 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurden zu dieser dunkelbraunen Reaktionslösung 100 ml ges. NaHCO₃-Lsg. hinzugegeben und dreimal mit 100 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/Cyclohexan 0:1→5:95; Gradient in 5% Schritte). Es wurden 6.178 g eines braunen, instabilen Öls erhalten.

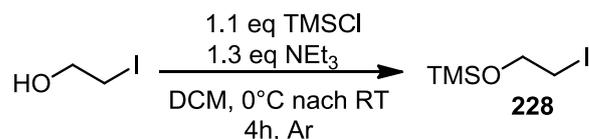


Ausbeute: 6.178 g, 65%

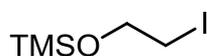
R_f-Wert: 0.6 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 2.45 (s, 3H), 3.24-3.26 (m, 2H), 4.22-4.26 (m, 2H), 7.35-7.37 (d, J= 7.9 Hz, 2H), 7.79-7.81 (d, J= 7.9 Hz, 2H)

7.21 Synthese von (3-Iodopropoxy)trimethylsilan (228)



1.0 g (5.82 mmol) 2-Iodoethanol wurden in 20 ml abs. DCM unter Argonatmosphäre gelöst und auf 0°C abgekühlt. Im Anschluss wurden tropfenweise 948 mg (1.107 ml, 8.72 mmol) TMSCl (zuvor frisch destilliert) und 1.177 g (1.612 ml, 11.63 mmol) NEt₃ hinzugegeben. Die Lösung wurde für 4 h (DC-Kontrolle) bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Reaktion mit 50 ml einer ges. NaHCO₃-Lsg. gequentscht, dreimal mit 100 ml DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Nach der Aufarbeitung wurden 1.150 g eines braunen Öls (NMR-rein) erhalten.

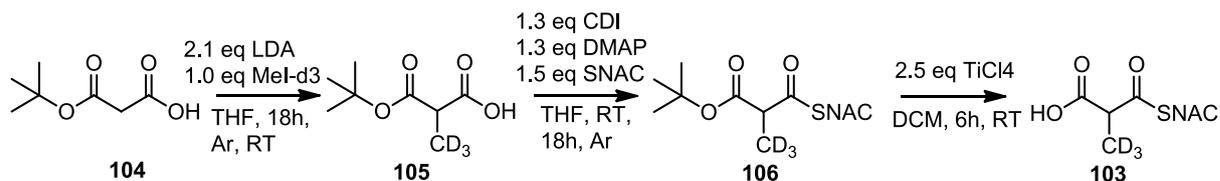
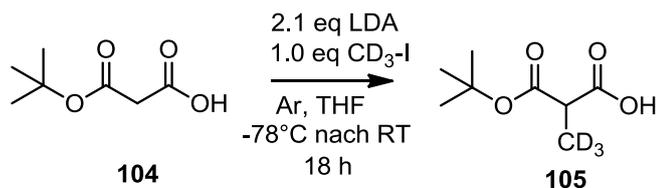


Ausbeute: 1.150 g, 81%

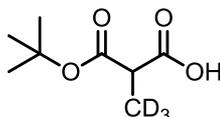
R_f-Wert: 0.90 (Cyclohexan/EtOAc 8:2, KMnO₄)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 0.14 (s, 9H), 3.18-3.21 (t, J=4 Hz, 2H), 3.79-3.82 (t, J= 4 Hz, 2H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = -0.24, 6.74, 63.96

7.22 Synthese von 3-((2-Acetamidoethyl)thio)-2-D₃-methyl-3-oxopropansäure(103)7.22.1 Synthese von 3-(tert-Butoxy)-2-D₃-methyl-3-oxopropansäure(105)

500 mg (3.12 mmol) 3-(tert.-Butoxy)-3-oxopropansäure (**104**) (vor Verwendung mittels Säulenchromatographie gereinigt) wurde in 10 ml abs. THF unter Argonatmosphäre gelöst. Die Lösung wurde auf -78°C gekühlt und 7.17 mmol frisch hergestellter LDA-Lsg. (Kap.6.2.3) wurden langsam zugetropft und für weitere 15 min gerührt. Danach wurde das Kältebad entfernt und 433 mg (190 µl, 3.12 mmol) D₃-MeI wurden hinzugegeben. Nach der Zugabe von D₃-MeI wurde die braune Reaktionslösung für 18 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die bräunliche Lösung auf 0°C gekühlt und mit 5 ml ges. NH₄Cl-Lsg. gequench und das Lösemittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mit 50 ml ges. NaHCO₃-Lsg. verdünnt und mit 50 ml EtOAc gewaschen. Die organische Phase wurde zusätzlich zweimal mit 50 ml ges. NaHCO₃-Lsg. extrahiert. Die vereinigte wässrige Phase wurde vorsichtig auf pH1 mit konz. HCl angesäuert und sofort dreimal mit 50 ml EtOAc extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/EtOAc 1:0→95:5, Gradient in 1% Schritte). Es wurden 200 mg (37%) eines leicht gelblichen Öls erhalten.



Ausbeute: 200 mg; 37%

R_f-Wert: 0.3 (MeOH/DCM 1:9)

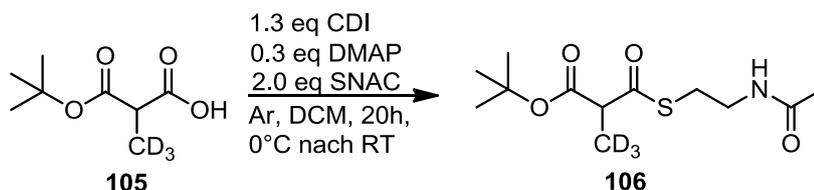
HRMS: Berechnet für: 178.11532 C₈H₁₂²H₃O₄,[M+H⁺]; gefunden: 178.11512 C₈H₁₂²H₃O₄,[M+H⁺]

GC-MS: t_R = 5.394 min; DB_50_S, m/z: 179, 121, 93, 76, 57, 41

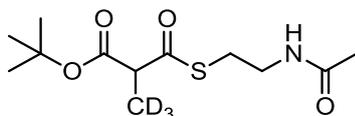
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.46 (s, 9H), 3.36 (s, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 21.1, 28.2, 47.0, 82.7, 169.6, 176.6

7.22.2 Synthese von *tert*-Butyl-3-(2-acetamidoethylthio)-2-D₃-methyl-3-oxopropanoat (106)



810.4 mg (4.65 mmol) 3-(*tert*-Butoxy)-2-D₃-methyl-3-oxopropansäure (**105**) wurden unter Argonatmosphäre in 10 ml abs. THF gelöst. Im Anschluss wurden bei 0°C 981 mg (6.05 mmol) CDI und 170.5 mg (1.40 mmol) DMAP hinzugegeben und für 45 min bei 0°C gerührt bevor tropfenweise 1.109 g (9.30 mmol) SNAC hinzugegeben wurde. Die Lösung wurde anschließend für 1 h bei 0°C gerührt und für 24 h bei RT. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in 50 ml 0.1M HCl aufgenommen. Die Suspension wurde dreimal mit 50 ml EtOAc extrahiert und die organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgearbeitet (DCM/MeOH 1:0→99.5:0.5, Gradient in 0.5% Schritte). Es wurden 1.05 g (82%) eines gelblichen Öls erhalten.



Ausbeute: 1.05 g, 82%

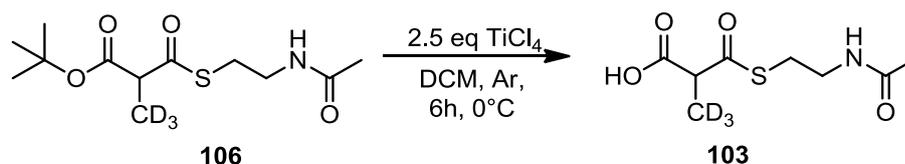
R_F-Wert : 0.5 (DCM/MeOH 9:1, KMnO₄)

HRMS: Berechnet für: 279.14524 C₁₂H₁₉²H₃O₄NS [M+H]⁺; 301.12718 C₁₂H₁₉²H₃O₄NSNa [M+Na]⁺ ; gefunden: 279.14567 C₁₂H₁₉²H₃O₄NS [M+H]⁺, 301.12749 C₁₂H₁₉²H₃O₄NSNa [M+Na]⁺

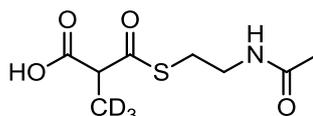
LC-ESI-MS: *t_R* = 7.40 min; pos. Mod; *m/z*: 278.89 [M+H]⁺

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.39 (s, 9H), 1.90 (s, 3H), 2.98-3.02 (m, 2H), 3.32-3.39 (m, 2H), 3.48 (s, 1H), 6.34 (bs, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 23.2, 27.8, 28.8, 39.6, 54.9, 82.4, 168.6, 170.5, 196.8

7.22.3 Synthese von 3-((2-Acetamidoethyl)thio)-2-D₃-methyl-3-oxopropansäure(103)

513 mg (1.84 mmol) *tert.*-Butyl-3-((2-Acetamidoethylthio)-2-D₃-methyl-3-oxopropanoat (**106**) wurden in 50 ml abs. DCM unter Argonatmosphäre gelöst. Im Anschluss wurden bei 0°C tropfenweise 873 mg (505 µl, 4.66 mmol) TiCl₄ hinzugefügt. Die dunkelbraune Reaktionslösung wurde für weitere 10 min bei 0°C und anschließend für weiter 6 h bei RT gerührt. Nach 6 h (DC-Kontrolle) wurde die braune Reaktionslösung mit 19 ml des Carbonatpuffers (Kap.6.3) bei 0°C versetzt um eine 0.1M Lösung des Produktes zu erhalten. Das DCM wurde bei RT *in vacuo* bei RT entfernt und die verbleibende weiße Lösung wurde in 50 ml Polypropylentubes überführt. Um das überschüssige TiO₂ zu entfernen wurde die Suspension für 4 min bei 4°C bei max. rpm-Zahl zentrifugiert. Die verbleibende klare Flüssigkeit wurde sterilfiltriert und direkt für die Fütterungsexperimente verwendet.

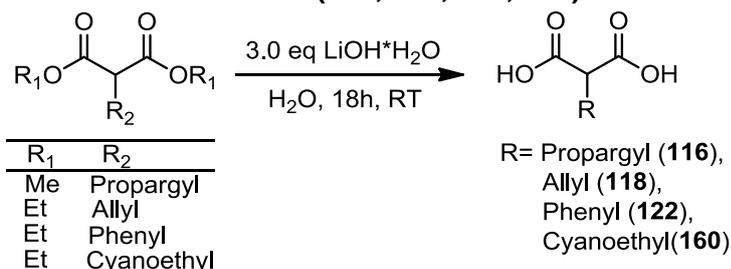


R_f-Wert: 0.16 (MeOH/DCM 1:9, KMnO₄)

HRMS: Berechnet für: 223.08264 C₈H₁₁²H₃O₄NS [M+H]⁺; gefunden: 223.08286
C₈H₁₁²H₃O₄NS [M+H]⁺

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.95 (s, 3H), 3.10-3.13 (t, J= 6.2 Hz, 2H), 3.38-3.41 (t, J= 6.2 Hz, 2H), 3.88 (s, 1H)

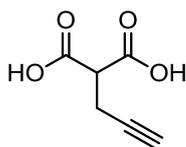
7.23 Synthese der Malonsäurederivate (116, 118, 122, 160)



Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Verseifung

Der kommerziell erhältliche Malonsäuredieester wurde zu H₂O (10 ml/g) gegeben. Zu dieser Suspension wurden 3.0 eq. LiOH·H₂O aufeinmal hinzugegeben und für 18 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Lösung mit 100 ml Et₂O gewaschen und die wässrige Phase mit konz. HCl auf pH1 angesäuert und dreimal mit 150 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* aufkonzentriert um die gewünschten Produkte in Form vom weißen amorphen Feststoff zu erhalten.

Synthese von 2-(Prop-2-yn-1-yl)malonsäure (116)



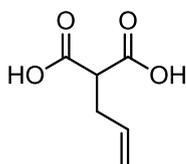
Ausbeute: 10.42 g; 98% (12.6 g Ansatz, 74.13 mmol)

Schmelzpunkt: 141°C-141.6°C

¹H-NMR: (400 MHz, MeOD-d₄) δ = 2.31-2.32 (t, J= 2.7 Hz, 1H), 2.68-2.71 (dd, J= 7.6, 2.7 Hz, 2H), 3.49-3.53 (t, J= 7.6 Hz, 1H, 2-H, CH)

¹³C-NMR: (101MHz, MeOD-d₄) δ = 19.2, 52.6, 71.2, 81.4, 171.4

Synthese von 2-Allylmalonsäure (118)

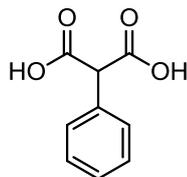


Ausbeute: 18.59 g; 95% (27.0 g Ansatz, 134.8 mmol)

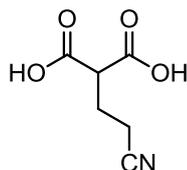
Schmelzpunkt: 103.3-103.6°C

¹H-NMR: (400 MHz, D₂O-d₂) δ = 2.49-2.51 (m, 2H), 3.17-3.21 (t, J= 7.8 Hz, 1H), 5.04-5.16 (m, 2H), 5.83-5.93 (m, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, MeOD-d₄) δ = 34.1, 52.9, 117.5, 135.8; 172.5

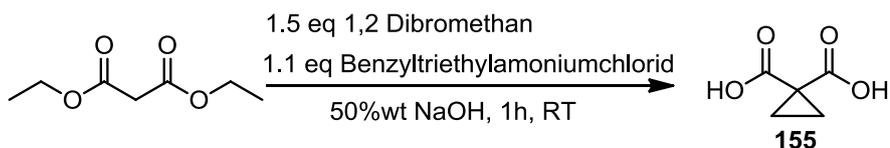
Synthese von 2-Phenylmalonsäure (**122**)

- Ausbeute:** 7.29 g; 96% (10.0 g Ansatz, 42.33 mmol)
- Schmelzpunkt:** 160.4-160.5°C
- HRMS:** Berechnet für : 179.03498 C₉H₇O₄ [M-H]; gefunden: 179.03568 C₉H₇O₄ [M-H]
- LC-ESI-MS** $t_R = 1.22$ min; neg. Mod; m/z: 178.77 [M-2H]
- ¹H-NMR:** (400 MHz, MeOD-d₄) $\delta = 4.65$ (s, 1H), 4.88 (bs, 2H), 7.30-7.37 (m, 3H), 7.39-7.42 (m, 2H)
- ¹³C-NMR:** (101MHz, MeOD-d₄) $\delta = 59.0, 128.9, 129.4, 130.3, 130.4, 135.2, 171.9$

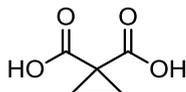
Synthese von 2-(2-Cyanoethyl)malonsäure (**160**)

- Ausbeute:** 2.86 g, 67% (5.0 g Ansatz, 27.0 mmol)
- HRMS:** Berechnet für: 158.04478 C₆H₈O₄N[M+H]⁺, 180.02673 C₆H₇O₄NNa[M+Na]⁺; gefunden: 158.04466 C₆H₈O₄N[M+H]⁺, 180.02663 C₆H₇O₄NNa[M+Na]⁺
- LC-ESI-MS** $t_R = 1.21$ min; neg. Mod; m/z: 155.94 [M-2H]
- ¹H-NMR:** (400 MHz, CDCl₃-d₁) $\delta = 2.14$ -2.22 (dt, J=7.23, 7.43 Hz, 2H), 2.50-2.54 (t, J=7.43, 2H), 3.41-3.44 (t, J=7.23 Hz, 1H,)
- ¹³C-NMR:** (101MHz, CDCl₃-d₁) $\delta = 15.5, 25.8, 51.5, 120.2, 171.7$

7.24 Synthese von Cyclopropan-1,1-dicarbonsäure (155)^[189]



Cyclopropane-1,1-dicarbonsäure wurde nach der Arbeitsvorschrift von Singh und Danishefski synthetisiert.^[189] 6.8 g (36.6 mmol) Triethylbenzylamoniumchlorid wurden zu 30 ml 50 % w/t NaOH gegeben. Zu dieser Suspension wurden nacheinander 4.8 g (36.6 mol) Diethylmalonat und 8.46 g (3.88 ml, 54.5 mmol) 1,2-Dibromoethan (exotherme Reaktion) gegeben und für 1h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die klare Lösung mit 100 ml Et₂O gewaschen und mit konz. HCl auf pH 1 angesäuert, dreimal mit 100 ml EtOAc extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet. Es wurden 1.77 g (37 %) eines weißen Feststoffes erhalten.



Ausbeute: 1.77 g (37%)

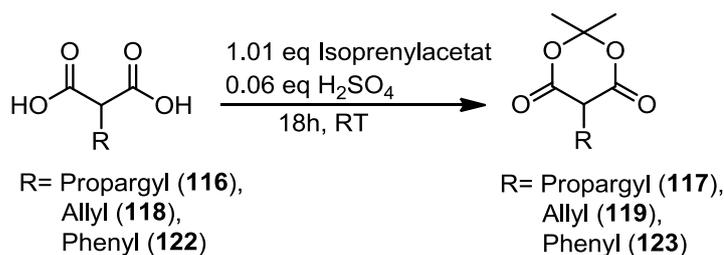
Schmelzpunkt: 102.3°C

HRMS: Berechnet für: 131.03389 C₅H₇O₄ [M+H]⁺; gefunden: 131.03358 C₅H₇O₄ [M+H]⁺

GC-MS: *t_R* = 3.105 min; DB_50_MST ; m/z: 86, 56

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.66 (s, 4H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 20.9, 26.4, 175.9

7.25 Synthese der Meldrums Säurederivate (117, 119, 123)^[189]

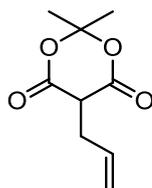
Die Synthese der Meldrums Säurederivate erfolgte nach der Durchführung von Singh und Danishefsky.^[189] 1.01 eq. Isoprenylacetat wurde unter Argonatmosphäre zum Malonsäurederivat gegeben. Zu der resultieren weißen Suspension werden unter Eiskühlung 0.06 eq. H₂SO₄ langsam hinzugetropft. Die gelbliche bis bräunliche Suspension wurde für weitere 18 h unter erreichen von RT gerührt. Anschließend wurden 100 cm³ Eis und 10 ml 1M HCl zu der bräunlichen Suspension gegeben (für einen 10 g Ansatz). Das dadurch resultierende Präzipitat wurde gefiltert und zweimal mit 20 ml H₂O gewaschen.

In Fällen, in denen die Reaktionsmischung nach 18 h fest wurde, wurde eine Minimalmenge an H₂O hinzugefügt um eine Suspension zu erzeugen. Zu dieser Suspension wurden 100 cm³ Eis und 10 ml 1M HCl hinzugegeben (für einen 10 g Ansatz). Das dadurch resultierende Präzipitat wurde gefiltert und zweimal mit 20 ml H₂O gewaschen. Nach trocknen am HV wurden die weißen bis weißbräunlichen Feststoffe direkt weiter verwendet.

Für den Fall, das analysereines Material benötigt wird, werden die weiß bis bräunlichen Feststoffe aus der ersten Präzipitation in eine Minimalmenge an MeOH bei RT gelöst. Nachdem erneut Eis und ein paar Tropfen 1M HCl hinzugefügt wurden, wurde das weiße Präzipitat abfiltriert, zweimal mit H₂O gewaschen und am HV getrocknet.

Synthese der Verbindungen

Synthese von 5-Allyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dion (**119**)



Ausbeute: 23.05 g; 65% (27.95 g Ansatz, 193.96 mmol)

R_f -Wert: 0.56 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO_4)

Schmelzpunkt: 71°C

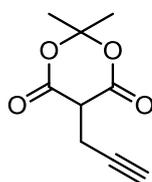
HRMS: Berechnet für: 185.08084 $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 185.08071 $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

LC-ESI-MS: t_R = 1.70-2.21 min, m/z: 182.96 M-H

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 1.76 (s, 3H), 1.79 (s, 3H), 2.86-2.90 (m, 2H), 3.57-3.60 (t, J= 5.3 Hz, 1H), 5.14-5.26 (m, 2H), 5.81-5.92 (m, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 27.2, 28.6, 30.5, 46.4, 105.1, 132.8, 165.1

Synthese von 2,2-Dimethyl-5-(prop-2-yn-1-yl)-1,3-dioxan-4,6-dion (**117**)



Ausbeute: 29.67 g; 73% (31.9 g Ansatz, 224.47 mmol)

R_f -Wert: 0.66 (EtOAc/MeOH 9:1, KMnO_4)

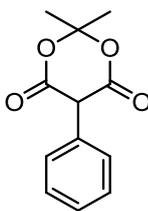
Schmelzpunkt: 140.0°C-140.4°C

HRMS: Berechnet für: 183.06519 $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 183.06512 $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$

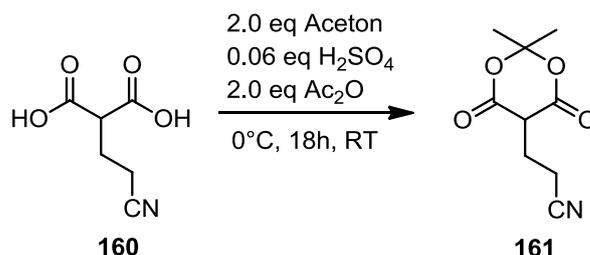
LC-ESI-MS: t_R = 6.27 min; pos. Mod., 182.82 M-H

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 1.80 (s, 3H), 1.81 (s, 3H), 2.05-2.06 (t, J= 2.6 Hz, 1H), 3.02-3.04 (dd, J= 4.9, 2.6 Hz, 2H), 3.67-3.96 (t, J= 4.9 Hz, 1H)

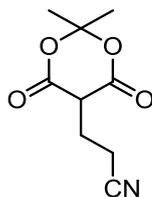
$^{13}\text{C-NMR}$: (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 16.7, 27.2, 28.7, 46.1, 70.9, 79.4, 105.5, 164.1

Synthese von 2,2-Dimethyl-5-phenyl-1,3-dioxane-4,6-dion (**123**)

- Ausbeute:** 5.96 g; 81% (6.0 g Ansatz, 33.30 mmol)
- R_f -Wert:** 0.18 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO_4)
- Schmelzpunkt:** 140.1-142.3°C Zersetzung
- HRMS:** Berechnet für: 221.08084 $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 221.08113
 $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$
- LC-ESI-MS:** t_R = 7.90 min; pos. Mod ; 220.92 M+H
- $^1\text{H-NMR}$:** (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 1.75 (s, 3H), 1.87 (s, 3H), 4.77 (s, 1H), 7.28-7.31 (m, 2H), 7.37-7.45 (m, 3H)
- $^{13}\text{C-NMR}$:** (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 27.7, 28.7, 52.9, 105.8, 128.9, 129.2, 129.3, 130.7, 164.8

7.26 Synthese von 3-(2,2-Dimethyl-4,6-dioxo-1,3-dioxan-5-yl)propanenitril (**161**)

Zu 4.00 g (25.46 mmol) Cyanoethylmalonsäure (**160**) wurden unter Argonatmosphäre 2.96 g (3.77 ml, 50.92 mmol) Aceton (zuvor über 4Å-Molekularsieb getrocknet) gegeben. Bei 0°C wurden zu dieser weißen Suspension tropfenweise 149 mg (80 µl, 1.53 mmol) konz. H₂SO₄ hinzugegeben. Im Anschluss wurde langsam bei 0°C 5.20 g (4.814 ml, 50.92 mmol) Ac₂O in einen Zeitraum von 1.5 h hinzugegeben. Die gelbliche Lösung wurde anschließend unter langsames Erreichen von RT für 12 h gerührt. Zu dieser dunkelbraunen Lösung wurden 100 cm³ Eiswasser hinzugegeben. Um die Präzipitation zu vervollständigen wurde die Lösung mit 1N HCl auf pH 1 angesäuert, abfiltriert und das Filtrat zweimal mit 40 ml eiskaltem H₂O gewaschen. Es wurden 2.44 g eines leicht braunen Feststoffes erhalten.



Ausbeute: 2.44g; 49%

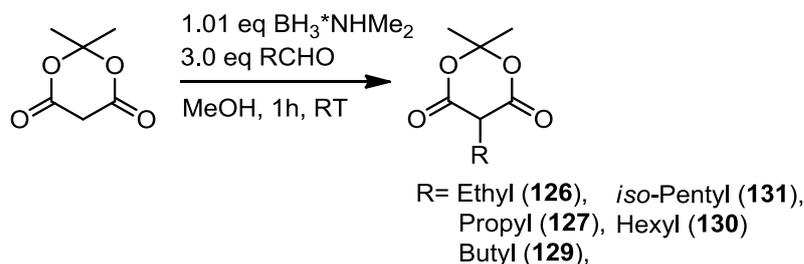
Schmelzpunkt: 124.6-126.1°C

HRMS: Berechnet für: 198.07608 C₉H₁₂O₄N[M+H]⁺, 220.05803 C₉H₁₁O₄NNa [M+Na]⁺; gefunden: 198.07609 C₉H₁₂O₄N[M+H]⁺, 220.05814 C₉H₁₁O₄NNa [M+Na]⁺

LC-ESI-MS: *t_R* = 1.30-1.64 min; neg. Mod.; m/z: 195.93 M-H⁻

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 3.68 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 2.78 (t, *J* = 7.4, 7.2 Hz, 2H), 2.45 (dt, *J* = 7.4, 7.2, 5.9 Hz, 2H), 1.87 (s, 3H), 1.81 (s, 3H)

7.27 Synthese der Meldrums Säurederivate (126, 127, 129-131) durch reduktive Alkylierung^[190]



Die Synthese der Meldrums Säurederivate erfolgte nach der Durchführung von Hrubowchak und Smith.^[190] Bei der Durchführung sind folgende Punkte unbedingt zu beachten, da ansonsten die Reaktion unkontrollierbar ist und hohe Ausbeuteverluste die Folge sind. Die Reaktion verläuft stark exotherm (starke Gasentwicklung), sobald der Aldehyd hinzugegeben wird.

Aus diesem Grund ist es ratsam für Reaktionen in der Größenordnung von 500 mg-4 g mindestens einen 1l Rundhalskolben zu verwenden. Für Reaktionen in der Größenordnung von bis zu max. 20 g wird ein 2l Rundhalskolben benötigt.

Des Weiteren sollte im N₂-Gegenstrom bei der Zugabe des Aldehydes gearbeitet werden, um eine Konzentrierung von H₂ im Kolben zu unterbinden und die Gefahr einer Selbstentzündung zu minimieren. Bei der Zugabe des Aldehydes ist unbedingt zu beachten, dass erst 1/3 des Gesamtvolumen des Aldehydes hinzugegeben wird. Nach Anspringen der Reaktion (starke Gasentwicklung) wird der Rest des Aldehydes schnell und kontrolliert hinzugegeben. Um während der Aufarbeitung eine optimale Präzipitation des Produktes zu gewährleisten, sollte die Reaktionslösung mindestens mit dem dreifachen Lösemittelvolumen an Eis versetzt werden und mit 1 ml bis 10 ml 1N HCl versetzt werden.

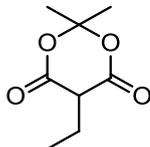
Meldrums Säure wurde in einer Minimalmenge abs. MeOH bei RT gelöst und 1.01 eq. BH₃*HNMe₂ wurde hinzugegeben. Nach dem sich das Boran vollständig gelöst hatte wurde unter N₂-Gegenstrom 3.0 eq. Aldehyd (Acetaldehyd, Propanal, Butanal, 3-Methylbutanal, Hexanal) innerhalb von drei Minuten bei RT (im Falle von Acetaldehyd bei 0°C) unter starkem Rühren hinzugegeben und die gelbliche Reaktionslösung wurde für 1 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das dreifache Lösemittelvolumen an Eis hinzugegeben und 1N HCl. Das weiße Präzipitat wurde abfiltriert (Nutsche) und zweimal mit dem Lösemittelvolumen an H₂O gewaschen. Durch trocknen am HV wurde das gewünschte Produkt in Form eines weißen amorphen Feststoffes erhalten.

Für den Fall, das analysereines Material benötigt wird, werden die weißen Feststoffe aus der ersten Präzipitation in eine Minimalmenge an MeOH bei RT gelöst. Nachdem erneut Eis und

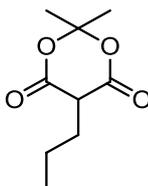
Synthese der Verbindungen

ein paar Tropfen 1M HCl hinzugefügt wurden, wurde das weiße Präzipitat abfiltriert, zweimal mit H₂O gewaschen und am HV getrocknet.

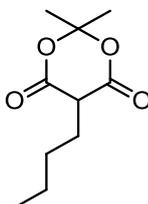
Synthese von 5-Ethyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**126**)



- Ausbeute:** 3.502 g; 84% (4.0 g Ansatz, 27.75 mmol)
- R_F-Wert:** 0.66 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)
- Schmelzpunkt:** 110°C-110.2°C
- HRMS:** Berechnet für: 173.08084 C₈H₁₃O₄ [M+H]⁺; gefunden: 173.08065 C₈H₁₃O₄ [M+H]⁺
- LC-ESI-MS:** t_R =5.91-6.69 min; neg. Mod.; m/z: 170.92 M-H
- ¹H-NMR:** (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.03-1.07 (t, J= 7.3 Hz, 3H), 1.75 (s, 3H), 1.78 (s, 3H), 2.14-2.20 (qd, J= 7.3, 4.9 Hz, 2H), 3.48-3.50 (t, J= 4.9 Hz, 1H)
- ¹³C-NMR:** (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 10.9, 20.3, 27.1, 28.6, 47.3, 104.9, 165.57

Synthese von 2,2-Dimethyl-5-propyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**127**)

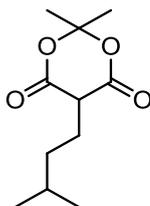
- Ausbeute:** 7.52 g; 72% (8.0 g Ansatz, 55.5 mmol).
- R_f -Wert:** 0.71 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO_4)
- Schmelzpunkt:** 74°C-74.5°C
- HRMS:** Berechnet für: 187.09649 $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 187.09637 $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$
- LC-ESI-MS:** t_R = 2.53-3.26 min; neg. Mod.; m/z: 184.94 M-H
- $^1\text{H-NMR}$:** (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 0.93-0.98 (t, J= 7.3 Hz, 3H), 1.44-1.54 (m, 2H), 1.75 (s, 3H), 1.78 (s, 3H), 2.05-2.11 (m, 2H), 3.47-3.50 (t, J= 5.1 Hz, 1H)
- $^{13}\text{C-NMR}$:** (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 14.1, 20.1, 27.13, 28.6, 28.9, 46.1, 104.9, 165.8

Synthese von 5-Butyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**129**)

- Ausbeute:** 19.31 g; 86% (18.0 g Ansatz, 123.17 mmol)
- R_f -Wert:** 0.73 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO_4)
- Schmelzpunkt:** 55.6-56.1°C
- HRMS:** Berechnet für: 201.11214 $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 201.11206 $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$
- LC-ESI-MS:** t_R = 6.10-6.77 min; neg. Mod.; m/z: 198.94 M-H
- $^1\text{H-NMR}$:** (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 0.90-0.93 (t, J= 7.1 Hz), 1.32-1.47 (m, 4H), 1.73 (s, 3H), 1.78 (s, 3H), 2.07-2.13 (m, 2H), 3.47-3.50 (t, J= 5.1 Hz, 1H)
- $^{13}\text{C-NMR}$:** (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 13.9, 22.8, 26.6, 27.1, 28.6, 28.8, 46.3, 104.9, 165.80

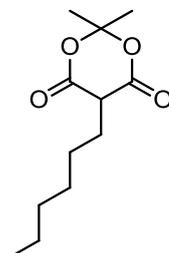
Synthese der Verbindungen

Synthese von 5-Isopentyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**131**)



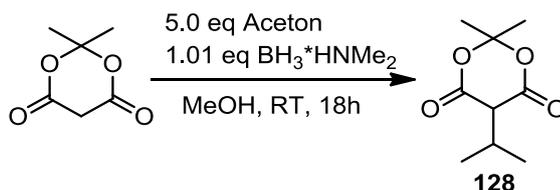
- Ausbeute:** 5.2631 g; 89% (4.0 g Ansatz, 27.75 mmol)
R_f-Wert: 0.76 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)
Schmelzpunkt: 81.0- 82.4°C
HRMS: Berechnet für: 215.12779 C₁₁H₁₉O₄ [M+H]⁺; gefunden: 215.12777 C₁₁H₁₉O₄ [M+H]⁺
LC-ESI-MS: t_R =5.12-5.97 min; neg. Mod.; m/z: 212.97 M-H
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 0.91 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 1.29-1.35 (m, 2H), 1.57-1.57 (m, 1H), 1.75 (s, 3H) 1.78 (s, 3H), 2.08-2.14 (m, 2H), 3.47-3.50 (t, J=5.0 Hz, 1H)
¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 22.4, 24.9, 27.1, 28.3, 28.6, 35.5, 46.5, 104.9, 165.7

Synthese von 5-Hexyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**130**)

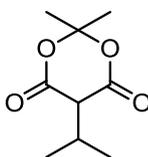


- Ausbeute:** 13.12 g; 83% (10.0 g Ansatz; 69.38 mmol)
R_f-Wert: 0.78 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)
Schmelzpunkt: 59.4-59.6°C
HRMS: Berechnet für: 229.14344 C₁₂H₂₁O₄ [M+H]⁺; gefunden: 229.14332 C₁₂H₂₁O₄ [M+H]⁺
LC-ESI-MS: t_R =6.87-7.53 min; neg. Mod.; m/z: 226.96 M-H
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 0.85-0.89 (t, J= 6.5 Hz), 1.28-1.35 (6H), 1.40-1.47 (2H), 1.75 (3H), 1.77 (3H), 2.06-2.12 (2H), 3.47-3.50 (t, J= 5.0 Hz, 1H)
¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 14.1, 22.6, 26.6, 26.9, 27.1, 28.6, 29.3, 31.56, 46.3, 104.9, 165.8

7.28 Synthese 5-Isopropyl-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (128) durch reduktive Alkylierung^[190]

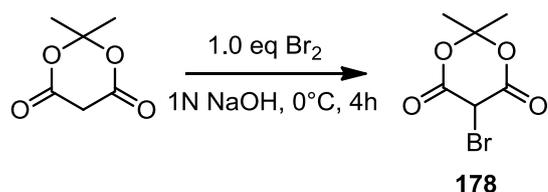


4.0 g (27.75 mmol) Meldrums Säure wurden in 8 ml Aceton (zuvor über 4A-Molsieb getrocknet) gelöst und unter Eiskühlung 1.68 g (28.03 mmol) $\text{BH}_3 \cdot \text{HNMe}_2$ hinzugegeben. Nach 15 min bei 0°C wurde die Reaktionslösung für 18 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die gelbliche Lösung auf 80 cm^3 Eis gegeben und mit 1N HCl angesäuert. Das Präzipitat wurde filtriert und mit 20 ml eiskaltem H_2O gewaschen. Es wurden 3.803 g eines weißen Feststoffes erhalten.

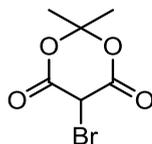


- Ausbeute:** 3.803 g, 74%
- R_f -Wert:** 0.71 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO_4)
- Schmelzpunkt:** 104°C
- HRMS:** Berechnet für: 187.09649 $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 187.09638 $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$
- LC-ESI-MS:** $t_R = 4.45\text{-}5.94$ min; neg. Mod.; m/z: 184.93 $\text{M}-\text{H}^+$
- $^1\text{H-NMR}$:** (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) $\delta = 1.16$ (s, 3H) 1.18 (s, 3H), 1.73-1.74 (d, J= 6.0 Hz, 6H), 2.73-2.78 (m, 1H), 3.37 (d, J= 3.1 Hz, 1H)
- $^{13}\text{C-NMR}$:** (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) $\delta = 19.3, 27.6, 28.4, 29.2, 51.8, 104.8, 165.1$

7.29 Synthese von 5-Bromo-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (178)^[210]



4.0 g (27.75 mmol) Meldrums Säure wurden in 27 ml 1N NaOH gelöst (1 ml 1N NaOH/ 1 mmol Substanz) und bei 0°C tropfenweise 4.435 g (1.422 ml, 27.75 mmol) Br₂ (4 h) hinzugegeben. Dabei ist zu beachten, dass erst wieder der nächste Tropfen Br₂ hinzugefügt wird, wenn die bräunliche Lösung klar wird. Nachdem $\frac{3}{4}$ des Br₂ hinzugegeben wurden bildet sich aus der gelblichen Lösung eine weiße Suspension. Nach Zugabe von Br₂ wurde die weiße Suspension für 10 min mittels Eis/NaCl-Bad runter gekühlt, abfiltriert und mit 20 ml eiskalten H₂O gewaschen und am HV getrocknet. Es wurden 2.720 g eines bräunlich weißen Feststoffes erhalten.



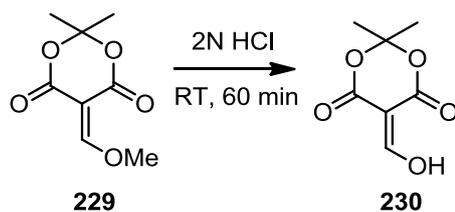
Ausbeute: 2.720 g, 44%

Schmelzpunkt: 72.8°C-74.0°C; lit.: 53-54°C^[210]

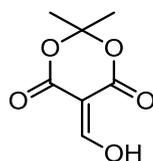
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.83 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 5.15 (s, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 27.7, 27.9, 34.8, 107.4, 161.1

7.30.2 Synthese von 5-(Hydroxymethylen)-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dion (**230**)^[328]



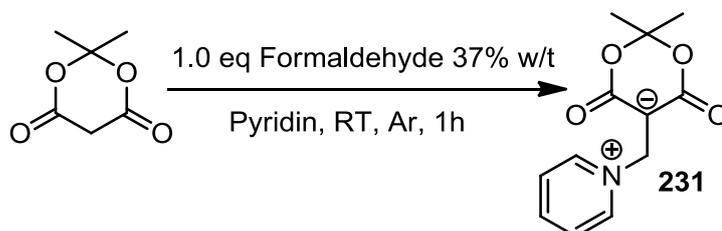
1.0 g (5.37 mmol) 5-(Methoxymethylen)-2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (**229**) wurden in 10 ml 2N HCl gerührt. Nach 30 min wurde die Lösung dreimal mit 50 ml EtOAc extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet. Es wurden 726 mg eines Temperatur sensitiven braunen Feststoffes erhalten.



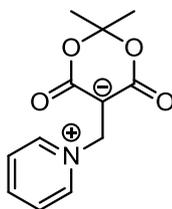
Ausbeute: 726 mg; 79%

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.75 (s, 6H), 8.15 (s, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 27.4, 95.6, 107.3, 177.2, 178.2

7.31 Synthese von 2,2-Dimethyl-4,6-dioxo-5-(pyridin-1-ium-1-ylmethyl)-1,3-dioxan-5-id (231)^[329]


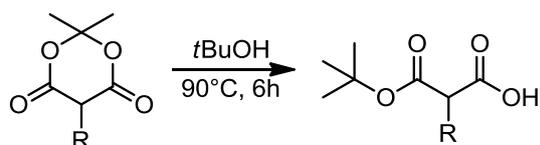
20.0 g (138.77 mmol) Meldrums Säure wurden unter Argonatmosphäre in 150 ml abs. Pyridin gelöst und 11.26 g (10.33 ml, 138.77 mmol) 37 gew% wässrige Formaldehydlösung bei RT hinzugegeben. Nach 1h rühren bei RT wurde das Pyridin *in vacuo* entfernt und der gelbliche Feststoff in 150 ml *iso*-Hexan aufgenommen und für 1h gerührt. Im Anschluss wurde der graue Feststoff abfiltriert und am HV getrocknet. Es wurden 31.485 g des Temperatur sensitiven Produktes erhalten.



Ausbeute: 31.485 g, 96%

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.66 (s, 6H), 5.68 (m, 2H), 7.69-7.73 (m, 2H), 8.11-8.15 (m, 1H), 8.97-8.98 (m, 2H)

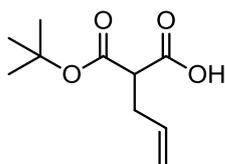
7.32 Synthese der *tert.*-Butylmalonsäuren (107, 120, 125, 138-143)



| | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| R= Allyl (119), Propargyl (117), Ethyl (126), Propyl (127), <i>iso</i> -Propyl (128), | Butyl (129), <i>iso</i> -Pentyl (131), Hexyl (130), Phenyl (123), | R= Allyl (120), Propargyl (107), Ethyl (138), Propyl (139), <i>iso</i> -Propyl (140), | Butyl (141), <i>iso</i> -Pentyl (143), Hexyl (142), Phenyl (125) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|

*t*BuOH (125 ml/10 g) wurden zu dem Meldrums Säurederivat gegeben und für 6h auf 90°C erhitzt. Nach dem die Reaktion vollständig war (DC-Kontrolle), wurde das *t*BuOH *in vacuo* entfernt und das resultierende Öl am HV getrocknet. Falls nötig wurde das Öl mittels Säulenchromatographie aufgereinigt (PE/EtOAc 1:0→85:15, Gradient in 5%-Schritten) um die gewünschten Produkte als farbloses Öl zu erhalten.

Synthese von 2-(*tert.*-Butoxycarbonyl)pent-4-encarbonsäure (120)



Ausbeute: 3.01 g; 91% (3.0 g Ansatz, 35.34 mmol)

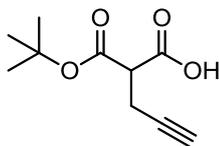
***R_F*-Wert:** 0.55 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)

HRMS: Berechnet für: 201.11214 C₁₀H₁₇O₄ [M+H]⁺, 223.09408 C₁₀H₁₆O₄Na [M+Na]⁺, 218.13868 C₁₀H₂₀O₄N [M+NH₄]⁺; gefunden: 201.11217 C₁₀H₁₇O₄ [M+H]⁺, 223.09421 C₁₀H₁₆O₄Na [M+Na]⁺, 218.13878 C₁₀H₂₀O₄N [M+NH₄]⁺

GC-MS: *t_R* = 4.891 min; DB_50_S, m/z: 200, 185, 165, 144, 127, 117, 109, 100, 82, 57

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.47 (s, 9H), 2.58-2.68 (m, 2H), 3.36-3.40 (t, J= 7.3 Hz, 1H), 5.07-5.16 (m, 2H), 5.73-5.83 (m, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 28.0, 33.2, 52.1, 82.8, 117.9, 133.8, 168.5, 174.4

Synthese von 2-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-pent-4-ylcarbonsäure (**107**)

Ausbeute: 30.35 g ; 94% (29.67 g Ansatz, 162.8 mmol)

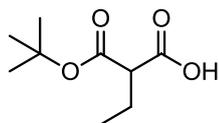
R_f -Wert: 0.54 (MeOH/CHCl₃ 1:9)

Schmelzpunkt: 95.6-96.7°C

HRMS: Berechnet für: 199.09649 C₁₀H₁₅O₄, [M+H]⁺, 221.07843
C₁₀H₁₅O₄Na, [M+Na]⁺; gefunden: 221.07845 C₁₀H₁₅O₄, [M+Na]⁺

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.46 (s, 9H), 2.04 (t, J= 2.6 Hz, 1H), 2.17-2.18 (s, 1H), 2.94-2.95 (d, J= 2.6 Hz, 2H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 23.1, 28.1, 57.2, 72.2, 78.8, 83.8, 167.7, 174.4

Synthese von 2-(*tert.*-Butoxycarbonyl)butansäure (**132**)

Ausbeute: 7.38 g; 94% (7.17g Ansatz, 41.64 mmol)

R_f -Wert: 0.0-0.65 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)

Schmelzpunkt: 53.8-54.1°C

HRMS: Berechnet für: 187.09758 C₉H₁₅O₄ [M-H]; gefunden: 187.09826
C₉H₁₅O₄ [M-H]

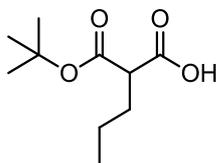
GC-MS: t_R = 2.945 min; DB_50_S, m/z: 129, 89, 71, 57

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 0.97-1.01 (t, J= 7.4 Hz, 3H), 1.48 (s, 9H), 1.89-1.96 (m, 2H), 3.20-3.24 (t, J= 7.2 Hz, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 11.8, 22.8, 28.0, 53.9, 82.7, 169.4, 174.7

Synthese der Verbindungen

Synthese von 2-(*tert*-Butoxycarbonyl)pentansäure (**133**)



Ausbeute: 4.77 g; 62% (7.02 g Ansatz; 37.7 mmol)

***R_f*-Wert:** 0-0.61 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)

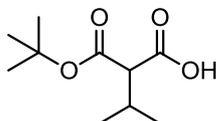
HRMS: Berechnet für: 201.11323 C₁₀H₁₇O₄ [M-H]; gefunden: 201.11383
C₁₀H₁₇O₄ [M-H]

GC-MS: *t_R* = 3.380 min; DB_50_S, m/z: 143, 103, 85, 57

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 0.92-0.96 (t, J= 7.3 Hz, 3H), 1.36-1.41 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.83-1.90 (m, 2H), 3.27-3.31 (t, J= 7.4 Hz, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 13.8, 20.6, 28.0, 31.3, 52.4, 82.6, 169.2, 175.4

Synthese von 2-(*tert*-Butoxycarbonyl)-3-methylbutansäure (**134**)



Ausbeute: 5.07 g; 91% (5.1 g Ansatz, 27.3 mmol)

***R_f*-Wert:** 0.08-0.55 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)

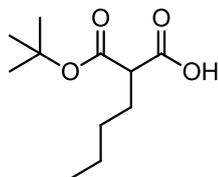
Schmelzpunkt: 64.3-65.2°C

HRMS: Berechnet für: 201.11323 C₁₀H₁₇O₄ [M-H]; gefunden: 201.11372
C₁₀H₁₇O₄ [M-H]

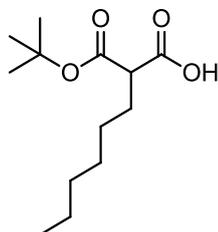
GC-MS: *t_R* = 3.186 min; DB_50_S; m/z: 143, 103, 85, 57

¹H-NMR: (400MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.03-1.04 (d, J= 2.2 Hz), 1.05 (d, J= 2.2 Hz), 1.48 (s, 9H), 2.29-2.40 (m, 1H), 3.08-3.10 (d, J=7.7 Hz, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 20.3, 20.5, 28.1, 29.8, 59.2, 82.9, 169.4, 173.5

Synthese von 2-(*tert.*-Butoxycarbonyl)hexansäure (**135**)

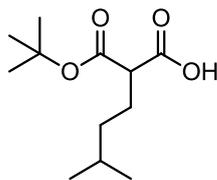
- Ausbeute:** 2.73 g; 80% (2.8 g Ansatz, 14.0 mmol)
- R_f -Wert:** 0-0.51 (EtOAc/Cyclohexan 1:1; KMnO_4)
- HRMS:** Berechnet für: 215.12888 $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{O}_4$ [M-H]; gefunden: 215.12939
 $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{O}_4$ [M-H]
- GC- MS:** t_R = 3.798 min; DB_50_S, m/z: 215 M-H, 157, 117, 99, 71, 57
- $^1\text{H-NMR}$:** (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 0.88-0.92 (t, $J=7.0$ Hz, 3H), 1.32-1.35 (m, 4H), 1.47 (s, 9H), 1.85-1.91 (m, 2H), 3.25-3.29 (t, $J=7.4$ Hz, 1H)
- $^{13}\text{C-NMR}$:** (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 13.9, 22.5, 28.0, 28.9, 29.5, 52.5, 82.6, 164.3, 174.9

Synthese von 2-(*tert.*-Butoxycarbonyl)octansäure (**136**)

- Ausbeute:** 8.02 g; 56% (13.2 g Ansatz, 57.8 mmol)
- R_f -Wert:** 0-0.47 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO_4)
- HRMS:** Berechnet für: 243.16018 $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{O}_4$ [M-H]; gefunden: 243.16086
 $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{O}_4$ [M-H]
- GC-MS:** t_R = 4.542 min; DB_50_S, m/z: 185, 145, 127, 101, 84, 57
- $^1\text{H-NMR}$:** (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 0.86-0.89 (t, $J=6.9$ Hz, 3H), 1.28-1.32 (m, 8H), 1.47 (s, 9H), 1.84-1.91 (m, 2H), 3.26-3.29 (t, $J=7.3$ Hz, 3H)
- $^{13}\text{C-NMR}$:** (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 14.2, 22.6, 27.3, 28.0, 28.9, 29.4, 31.6, 52.5, 82.7, 169.4, 175.1

Synthese der Verbindungen

Synthese von 2-(*tert.*-Butoxycarbonyl)-5-methylhexansäure (**137**)



Ausbeute: 1.15 g, 86% (1.26 g Ansatz, 5.8 mmol)

R_f -Wert: 0-0.60 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO_4)

HRMS: Berechnet für: 229.14453 $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_4$ [M-H]; gefunden: 229.14526 $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_4$ [M-H]

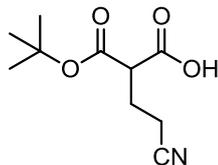
GC-MS: t_R = 4.032 min; DB_50_S, m/z: 131, 113, 95, 83, 69, 57

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 0.88-0.90 (d, J = 6.6 Hz, 6H), 1.20-1.26 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.52-1.60 (td, J = 13.2, 6.6 Hz, 1H), 1.86-1.92 (m, 2H), 3.23-3.27 (t, J = 7.2 Hz, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 22.4, 22.5, 27.2, 27.9, 28.4, 36.3, 52.6, 82.6, 169.3, 174.9

7.33 Synthese von 2-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-cyanobutansäure (**162**)^[197]

1.179 g (1.9 ml, 15.91 mmol) *t*BuOH und 1.606 g (1.993 ml, 12.73 mmol) DIC wurden zusammen mit 38 mg (0.38 mmol) CuCl unter Argonatmosphäre und lichtgeschützt für 72h bei RT gerührt. Zu dieser dunkelgrün/braunen Lösung wurden 2.0 g (12.66 mmol) 2-(2-cyanoethyl)malonsäure (**160**), gelöst in 20 ml *t*BuOH/THF 2:8, bei RT hinzuge tropft. Die grüne Lösung wurde für weitere 18h bei RT gerührt. Nach dem das Lösemittel *in vacuo* entfernt wurde, wurde der Rückstand in 100 ml 1N NaOH aufgenommen. Die bläuliche wässrige Phase wurde zweimal mit 50 ml EtOAc gewaschen, anschließend auf pH1 mit konz. HCl angesäuert, dreimal mit 50 ml EtOAc extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch gereinigt (Cyclohexan/EtOAc 1:0→1:1, Gradient in 10% Schritte). Es wurden 640 mg eines klaren Öls erhalten.



Ausbeute: 640 mg, 24%

***R_f*-Wert:** 0.46 (DCM/MeOH 9:1, KMnO₄)

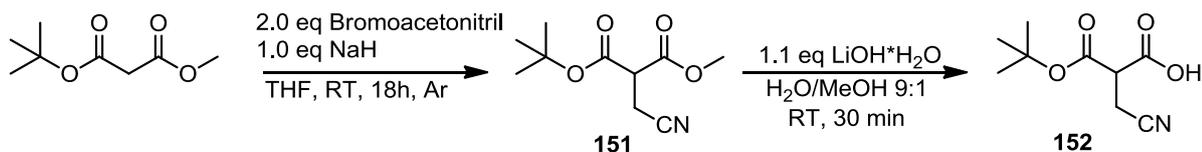
HRMS: Berechnet für: 214.10738 C₁₀H₁₆O₄N[M+H]⁺; gefunden: 214.10745 C₁₀H₁₆O₄N[M+H]⁺

LC-ESI-MS: *t_R* = 5.640 min; DB_50_S; m/z: 214, 196, 169, 158, 140, 123, 113, 96, 85, 68, 57

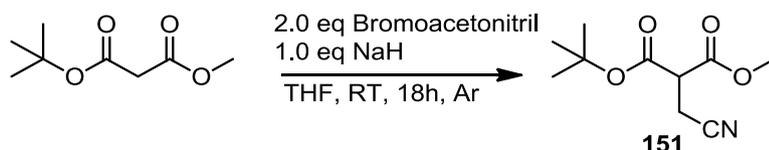
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.49 (s, 9H) 2.20-2.25 (q, J= 7.3 Hz, 2H), 2.51-2.53 (t, J= 7.2 Hz, 2H), 3.45-3.48 (t, J= 7.2 Hz, 1H), 10.56 (bs, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 15.2, 24.5, 27.9, 51.0, 83.6, 118.5, 167.1, 173.8

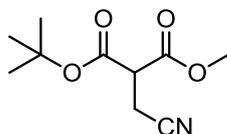
7.34 Synthese von 3-(*tert*-Butoxy)-2-(cyanomethyl)-3-oxopropansäure (152)



7.34.1 Synthese von 1-*tert*-Butyl 3-methyl 2-(cyanomethyl)malonat (151)



4.05 g (23.2 mmol) 1-*tert*-Butyl-3-methyl malonat wurden zu 1.01 g (23.5 mmol) NaH in 90 ml abs. THF bei RT unter Argonatmosphäre tropfenweise hinzugegeben. Nach 1h wurden 5.51 g (3.2 ml, 25.5 mmol) Bromoacetonitril hinzugegeben und die braune Reaktionslösung wurde 18 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Lösung mit 2 ml ges. NH₄Cl-Lsg. gequentscht und das THF *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in 150 ml EtOAc aufgenommen und mit 50 ml H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch (PE/EtOAc 1 :0→98 :2, Gradient in 2% Schritte) aufgereinigt. Es wurden 1.68 g eines klaren Öls erhalten.



Ausbeute: 1.68 g, 34%

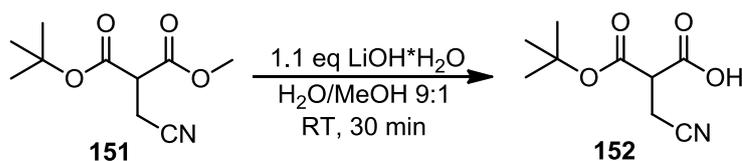
R_f-Wert: 0.43 (Cyclohexan/EtOAc 9:1, KMnO₄)

HRMS: Berechnet für: 214.10748 C₁₀H₁₆O₄N[M+H]⁺, 236.08933 C₁₀H₁₅O₄NNa [M+Na]⁺, 231.13393 C₁₀H₁₉O₄N₂[M+NH₄]⁺; gefunden: 214.10751 C₁₀H₁₆O₄N[M+H]⁺, 236.08947 C₁₀H₁₅O₄NNa [M+Na]⁺, 231.13401 C₁₀H₁₉O₄N₂[M+NH₄]⁺

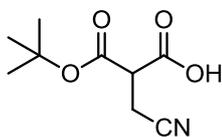
GC-MS: *t_R* = 4.959 min; m/z: 214 [M+H]⁺, m/z: 198, 158, 140, 126, 113, 96, 81, 57

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.48 (s, 9H), 2.86-2.88 (d, J= 7.4 Hz, 2H,), 3.60-3.64 (t, J= 7.4 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 17.1, 27.9, 48.9, 53.3, 84.1, 116.9, 165.5, 167.5

7.34.2 Synthese von 3-(*tert.*-Butoxy)-2-(cyanomethyl)-3-oxopropansäure (**152**)

1.69 g (7.92 mmol) 1-*tert.*-Butyl-3-methyl-2-(cyanomethyl)malonat (**151**) wurden in 20 ml H₂O/MeOH 9:1 gelöst und 360 mg (8.71 mmol) LiOH·H₂O hinzugegeben. Nach 3 h rühren bei RT (DC-Kontrolle) wurde das MeOH *in vacuo* entfernt und die verbleibende gelbliche Lösung wurde einmal mit 50 ml Et₂O gewaschen, auf pH1 mit conc. HCl angesäuert und dreimal mit 50 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und aufkonzentriert. Es wurden 1.10 g eines klaren Öls erhalten.



Ausbeute: 1.10 g, 70%

R_f-Wert: 0.04 (EtOAc/Cyclohexan 1:1, KMnO₄)

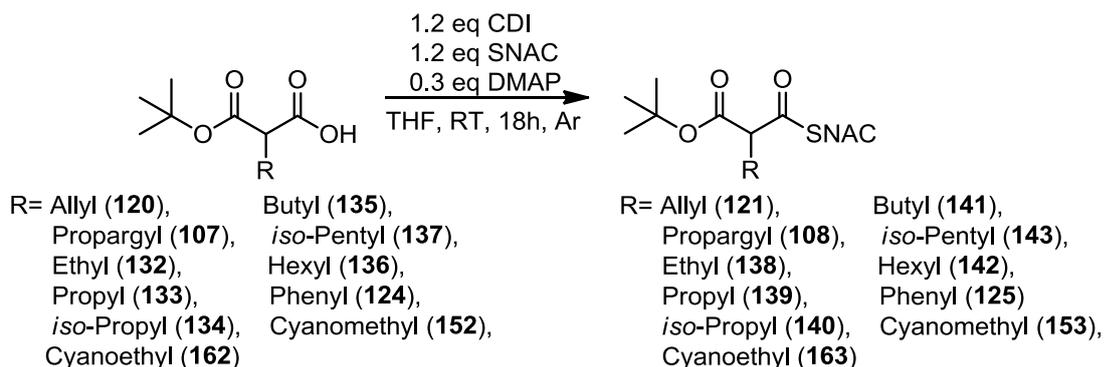
HRMS: Berechnet für: 198.07718 C₉H₁₂O₄N[M-H]; gefunden: 198.07781
C₉H₁₂O₄N[M-H]

GC-MS: *t_R* = 4.055 min; DB_50_S; *m/z* : 140, 100, 82 57

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.52 (s, 9H), 2.89-2.91 (dd, J= 7.2 Hz, 2H), 3.66-3.70 (t, J= 7.2 Hz, 1H)

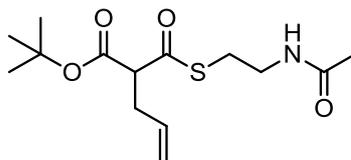
¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 16.9, 27.8, 48.6, 84.9, 116.6, 165.3, 170.8

7.35 Synthese von tert.-ButylmalonsäureSNAC-Ester (108, 121, 125, 138-143, 153, 163)

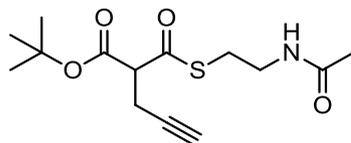


Tert.-Butylmalonsäure wurde unter Argonatmosphäre in abs. THF (10 ml/g) gelöst. Im Anschluss wurden bei 0°C 1.2 eq. CDI hinzugegeben, für 30 min bei 0°C und 3 h bei RT gerührt, bevor 0.3 eq. DMAP und tropfenweise 1.3 eq. SNAC hinzugegeben wurden. Die Lösung wurde 18 h bei RT gerührt. Das Lösemittel wurde *in vacuo* entfernt und der Rückstand in 250 ml DCM gelöst, dreimal mit 100 ml 1M K₂CO₃ und einmal mit 50 ml 1N HCl gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgearbeitet (DCM/MeOH 1:0→99: 1, Gradient in 0.5% Schritte). Die Produkte wurden in Form eines gelblichen Öls erhalten.

Nicht reagiertes Startmaterial kann zurückgewonnen werden, in dem man die K₂CO₃-Lsg. mit konz. HCl-Lsg. auf pH1 ansäuert und dreimal mit EtOAc extrahiert, über Na₂SO₄ trocknet und aufkonzentriert.

Synthese von *tert.*-Butyl 2-(((2-acetamidoethyl)thio)carbonyl)pent-4-enoat (**121**)

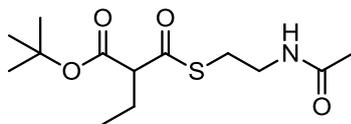
- Ausbeute:** 3.73 g; 82% (3.02 g Ansatz, 15.06 mmol)
- R_f -Wert:** 0.68(DCM/MeOH 9:1)
- HRMS:** Berechnet für: 302.14206 $C_{14}H_{24}O_4NS[M+H]^+$, 324.12400 $C_{14}H_{23}O_4NNaS [M+Na]^+$, 319.16860 $C_{14}H_{27}O_4N_2S [M+NH_4]^+$; gefunden: 302.14231 $C_{14}H_{24}O_4NS[M+H]^+$, 324.12418 $C_{14}H_{23}O_4NNaS [M+Na]^+$, 319.16919 $C_{14}H_{27}O_4N_2S [M+NH_4]^+$
- LC-ESI-MS:** t_R = 9.55-10.21 min; pos. Mod., 301.75 $[M]^+$
- 1H -NMR:** (400 MHz, $CDCl_3-d_1$) δ = 1.43 (s, 9H), 1.94 (s, 3H), 2.58-2.62 (m, 2H), 2.99-3.11 (m, 2H), 3.34-3.48 (m, 2H), 3.55-3.59 (t, J = 7.5Hz, 1H), 5.03-5.12 (m, 2H), 5.66-5.77 (m, 1H), 6.00 (bs, 1H)
- ^{13}C -NMR:** (101MHz, $CDCl_3-d_1$) δ = 23.3, 28.1, 28.9, 33.5, 39.6, 60.6, 82.7, 117.9, 133.9, 167.4, 170.6, 195.5

Synthese von *tert.*-Butyl-2-(((2-acetamidoethyl)thio)-carbonyl)pent-4-ynoat (**108**)

- Ausbeute:** 83% (10.8 g Ansatz, 54.49 mmol)
- R_f -Wert :** 0.69 (DCM/MeOH 9:1, $KMnO_4$)
- HRMS:** Berechnet für: 300.12641 $C_{14}H_{22}O_4NS,[M+H]^+$, 322.10835 $C_{14}H_{22}O_4NSNa,[M+Na]^+$, 317.15295 $C_{14}H_{25}O_4N_2S,[M+NH_4]^+$; gefunden: 300.12664 $C_{14}H_{22}O_4NS,[M+H]^+$, 322.10861 $C_{14}H_{22}O_4NSNa,[M+Na]^+$, 317.15325 $C_{14}H_{25}O_4N_2S,[M+NH_4]^+$
- LC-ESI-MS:** t_R = 7.38 min; pos. Mod; m/z: 299.95 $[M]^+$
- 1H -NMR:** (400 MHz, $CDCl_3-d_1$) δ = .47 (s, 9H), 1.96 (s, 3H), 2.01-3.03 (t, J = 2.7 Hz, 1H), 2.74-2.76 (dd, J = 7.6, 2.7, 0.6 Hz, 2H), 3.09-3.12 (m, 2H), 3.43-3.47 (m, 2H), 3.69-3.73 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 5.87 (bs, 1H)
- ^{13}C -NMR:** (101MHz, $CDCl_3-d_1$) δ = 18.8, 23.3, 27.9, 29.1, 39.5, 59.6, 70.7, 79.9, 83.3, 166.3, 170.5, 194.4

Synthese der Verbindungen

Synthese von *tert*-Butyl-2-(((2-acetamidoethyl)thio)carbonyl)butanoat (**138**)



Ausbeute: 786 mg ; 27% (1.91 g Ansatz, 10.13 mmol)

R_f -Wert: 0.67 (DCM/MeOH 9:1, KMnO₄)

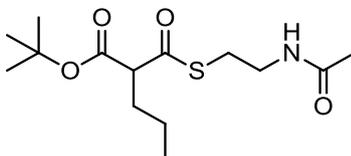
HRMS: Berechnet für: 290.14206 C₁₃H₂₄O₄NS[M⁺]⁺, 312.12400 C₁₃H₂₃O₄NNaS [M+Na]⁺, 307.16860 C₁₃H₂₇O₄N₂S [M+NH₄]⁺; gefunden: 290.14246 C₁₃H₂₄O₄NS[M+H]⁺, 312.12437 C₁₃H₂₃O₄NNaS [M+Na]⁺, 307.16939 C₁₃H₂₇O₄N₂S [M+NH₄]⁺

LC-ESI-MS: t_R = 9.29-9.59 min; pos.Mod. 289.75 [M]⁺

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 0.90-0.94 (t, J= 7.4 Hz, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.84-1.91 (m, 2H), 1.93 (s, 3H), 2.98-3.10 (m, 2H), 3.34-3.46 (m, 3H), 6.09 (bs, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 11.8, 22.9, 23.2, 27.9, 28.7, 39.6, 62.7, 82.3, 167.8, 170.5, 196.0

Synthese von *tert*-Butyl-2-(((2-acetamidoethyl)thio)carbonyl)pentanoat (**139**)



Ausbeute: 1.34 g; 74% (1.211 g Ansatz, 5.99 mmol)

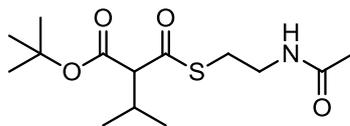
R_f -Wert: 0.67 (DCM/MeOH 9:1, KMnO₄)

HRMS: 304.15771 C₁₄H₂₆O₄NS[M+H]⁺, 326.13965 C₁₄H₂₅O₄NNaS [M+Na]⁺, 321.18425 C₁₄H₂₉O₄N₂S [M+NH₄]⁺; gefunden: 304.15800 C₁₄H₂₆O₄NS[M+H]⁺, 326.13987 C₁₄H₂₅O₄NNaS [M+Na]⁺, 321.18487 C₁₄H₂₉O₄N₂S [M+NH₄]⁺

GC-MS: t_R = 9.81-10.20 min; pos. Mod.; 303.75 [M]⁺

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 0.89-0.92 (t, J= 7.3 Hz, 3H), 1.23-1.38 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.77-1.88 (m, 2H), 1.94 (s, 3H), 2.98-3.11 (m, 2H), 3.34-3.47 (m, 3H), 6.02 (bs, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 13.8, 20.6, 23.2, 27.9, 28.8, 31.5, 39.6, 60.9, 82.3, 167.9, 170.5, 196.2

Synthese von *tert.*-Butyl-2-(((2-acetamidoethyl)thio)carbonyl)-3-methylbutanoat (**140**)

Ausbeute: 598 mg; 25% (1.58 g Ansatz, 7.81 mmol)

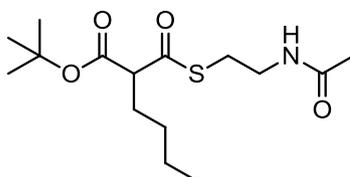
R_f -Wert: 0.64 (DCM/MeOH 9:1, KMnO_4)

HRMS: Berechnet für: 304.15771 $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{NS}[\text{M}+\text{H}]^+$, 326.13965 $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{NNaS}[\text{M}+\text{Na}]^+$, 321.18425 $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}[\text{M}+\text{NH}_4]^+$; gefunden: 304.15825 $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{NS}[\text{M}+\text{H}]^+$, 326.14008 $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{NNaS}[\text{M}+\text{Na}]^+$, 321.18516 $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}[\text{M}+\text{NH}_4]^+$

GC-MS: t_R = 9.58-9.88 min; pos. Mod.; 303.74 $[\text{M}]^+$

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 0.94-0.96 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.98-0.99 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.95 (s, 3H), 2.45-2.39 (m, 1H), 2.99-3.13 (m, 2H), 3.23-3.25 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 3.36-3.50 (m, 2H), 5.87 (bs, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (101 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 20.5, 20.6, 23.5, 28.2, 28.9, 30.0, 39.9, 68.9, 82.5, 167.4, 170.6, 195.6

Synthese von *tert.*-Butyl-2-(((2-acetamidoethyl)thio)carbonyl)hexanoat (**141**)

Ausbeute: 23.00g; 78% (20.0 g Ansatz, 92.48 mmol)

R_f -Wert: 0.69 (DCM/MeOH 9:1, KMnO_4)

HRMS: Berechnet für: 318.17336 $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{NS}[\text{M}+\text{H}]^+$, 340.15530 $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{O}_4\text{NNaS}[\text{M}+\text{Na}]^+$, 335.19990 $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}[\text{M}+\text{NH}_4]^+$; gefunden: 318.17390 $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{NS}[\text{M}+\text{H}]^+$, 340.15569 $\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{O}_4\text{NNaS}[\text{M}+\text{Na}]^+$, 335.20083 $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}[\text{M}+\text{NH}_4]^+$

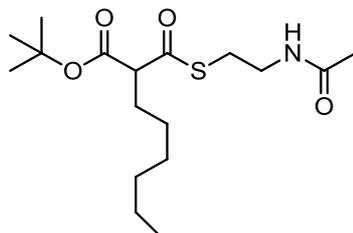
GC-MS: t_R = 10.26-10.67 min; pos. Mod. ; 317.76 $[\text{M}]^+$

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 0.84-0.88 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 1.26-1.28 (m, 4H), 1.42 (s, 9H), 1.80-1.87 (m, 2H), 1.96 (s, 3H), 2.99-3.08 (m, 2H), 3.33-3.47 (m, 3H), 6.09 (bs, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (101 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 13.8, 22.4, 23.2, 27.9, 28.7, 29.2, 29.4, 39.6, 61.2, 82.3, 167.9, 170.5, 196.1

Synthese der Verbindungen

Synthese von *tert.*-Butyl-2-(((2-acetamidoethyl)thio)carbonyl)octanoat (**142**)



Ausbeute: 9.61 g; 53% (12.77 g Ansatz; 52.27 mmol)

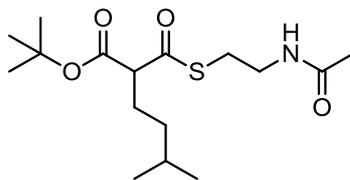
R_f -Wert: 0.79 (DCM/MeOH 9:1, KMnO_4)

HRMS: Berechnet für: 346.20466 $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{NS}[\text{M}+\text{H}]^+$, 368.18660 $\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{O}_4\text{NNaS}[\text{M}+\text{Na}]^+$, 363.23120 $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}[\text{M}+\text{NH}_4]^+$; gefunden: 346.20494 $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{NS}[\text{M}+\text{H}]^+$, 368.18686 $\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{O}_4\text{NNaS}[\text{M}+\text{Na}]^+$, 363.23182 $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{O}_4\text{N}_2\text{S}[\text{M}+\text{NH}_4]^+$

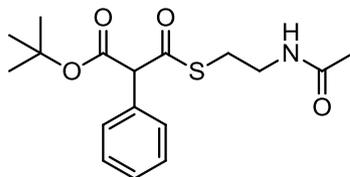
GC-MS: $t_R = 9.62\text{-}10.01$ min; pos. Mod., 345.76 $[\text{M}]^+$

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) $\delta = 0.86\text{-}0.89$ (t, $J = 6.9\text{ Hz}$, 3H), 1.27-1.29 (m, 8H), 1.46 (s, 9H), 1.85-1.88 (m, 2H), 1.96 (s, 3H), 3.00-3.13 (m, 2H), 3.37-3.51 (m, 3H), 5.85 (bs, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (101 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) $\delta = 14.2, 22.7, 23.3, 27.3, 28.03, 28.06, 28.8, 29.03, 29.6, 31.6, 39.7, 61.3, 82.4, 168.0, 170.6, 196.3$

Synthese von *tert.*-Butyl-2-(((2-acetamidoethyl)thio)carbonyl)-5-methylhexanoat (**143**)

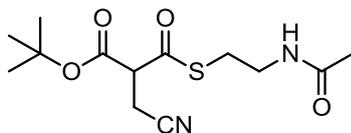
- Ausbeute:** 360 mg, 22% (1.55 g Ansatz, 5.0 mmol)
- R_f -Wert:** 0.51 (DCM/MeOH 9:1, KMnO_4)
- HRMS:** Berechnet für: 332.18901 $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_4\text{NS}[\text{M}+\text{H}]^+$, 354.17095 $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{O}_4\text{NNaS} [\text{M}+\text{Na}]^+$, 349.21555 $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}_4\text{N}_2\text{S} [\text{M}+\text{NH}_4]^+$;
gefunden: 332.18960 $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{O}_4\text{NS}[\text{M}+\text{H}]^+$, 354.17134 $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{O}_4\text{NNaS} [\text{M}+\text{Na}]^+$, 349.21655 $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}_4\text{N}_2\text{S} [\text{M}+\text{NH}_4]^+$
- LC-ESI-MS:** $t_R = 10.45\text{-}10.96$ min; pos. Mod., 331.75 $[\text{M}]^+$
- $^1\text{H-NMR}$:** (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) $\delta = 0.88\text{-}0.89$ (d, $J = 6.6$ Hz, 6H), 1.15-1.21 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.52-1.59 (m, 1H), 1.82-1.91 (m, 2H), 1.96 (s, 3H), 3.00-3.14 (m, 2H), 3.38-3.50 (m, 3H), 5.86 (bs, 1H)
- $^{13}\text{C-NMR}$:** (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) $\delta = 22.4, 22.5, 23.3, 27.5, 28.0, 28.1, 28.8, 36.4, 39.7, 61.5, 82.4, 168.0, 170.5, 196.3$

Synthese von *tert.*-Butyl-3-((2-acetamidoethyl)thio)-3-oxo-2-phenylpropanoat (**125**)

- Ausbeute:** 1.60 g; 38% (2.9 g Ansatz, 12.3 mmol)
- R_f -Wert:** 0.56 (MeOH/DCM 9:1, KMnO_4)
- HRMS:** Berechnet für: 338.14206 $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{NS}[\text{M}+\text{H}]^+$, 360.12400 $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{O}_4\text{NNaS} [\text{M}+\text{Na}]^+$, 355.16860 $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{O}_4\text{N}_2\text{S} [\text{M}+\text{NH}_4]^+$;
gefunden: 338.14223 $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{NS}[\text{M}+\text{H}]^+$, 360.12417 $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{O}_4\text{NNaS} [\text{M}+\text{Na}]^+$, 355.16909 $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{O}_4\text{N}_2\text{S} [\text{M}+\text{NH}_4]^+$
- LC-ESI-MS:** $t_R = 7.86\text{-}8.34$ min; pos. Mod., 337.73 $[\text{M}]^+$
- $^1\text{H-NMR}$:** (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) $\delta = 1.45$ (s, 9H), 1.90 (s, 3H), 3.00-3.06 (m, 2H), 3.39-3.44 (m, 2H), 4.72 (s, 1H), 5.83 (bs, 1H), 7.35-7.41 (m, 5H)
- $^{13}\text{C-NMR}$:** (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) $\delta = 23.1, 27.9, 29.3, 39.5, 66.4, 83.0, 128.6, 128.8, 128.9, 129.5, 132.6, 166.8, 170.6, 195.0$

Synthese der Verbindungen

Synthese von *tert.*-Butyl-3-((2-acetamidoethyl)thio)-2-(cyanomethyl)-3-oxopropanoat (**153**)



Ausbeute: 120 mg, 24% (270 mg Ansatz, 1.4 mmol)

***R_f*-Wert:** 0.81 (DCM/MeOH 9:1, KMnO₄)

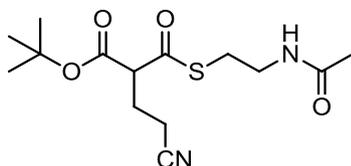
HRMS: Berechnet für: 301.12165 C₁₃H₂₁O₄N₂S[M+H]⁺, 323.10360 C₁₃H₂₀O₄N₂NaS [M+Na]⁺, 318.14820 C₁₃H₂₄O₄N₃S [M+NH₄]⁺; gefunden: 301.12247 C₁₃H₂₁O₄N₂S[M+H]⁺, 323.10404 C₁₃H₂₀O₄N₂NaS [M+Na]⁺, 318.14936 C₁₃H₂₄O₄N₃S [M+NH₄]⁺

LC-ESI-MS: *t_R* = 7.95 min; pos. Mod, 300.74 [M]⁺

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.48 (s, 9H), 1.96 (s, 3H), 2.85-2.89 (m, 2H), 3.11-3.16 (m, 2H), 3.43-3.45 (m, 2H), 3.81-3.85 (t, J=7.4 Hz, 1H), 5.97 (bs, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 17.2, 23.3, 27.9, 28.0, 29.6, 39.1, 56.2, 84.7, 117.0, 164.9, 170.8, 192.9

Synthese von *tert.*-Butyl-2-(((2-acetamidoethyl)thio)carbonyl)-4-cyanobutanoat (**163**)



Ausbeute: 489 mg, 52% (640 mg Ansatz, 3.01 mmol)

***R_f*-Wert:** 0.63 (DCM/MeOH 9:1, KMnO₄, Vanilin Rotfärbung)

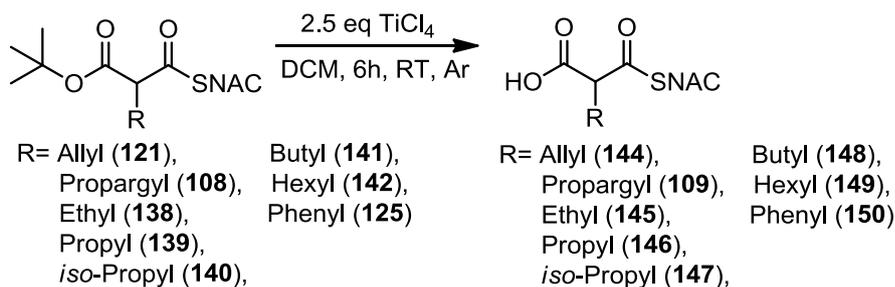
HRMS: Berechnet für: 315.13730 C₁₄H₂₃O₄N₂S[M+H]⁺, 337.11925 C₁₄H₂₂O₄N₂NaS [M+Na]⁺, 332.16385 C₁₄H₂₆O₄N₃S [M+NH₄]⁺; gefunden: 315.13727 C₁₄H₂₃O₄N₂S[M+H]⁺, 337.11924 C₁₄H₂₂O₄N₂NaS [M+Na]⁺, 332.16417 C₁₄H₂₆O₄N₃S [M+NH₄]⁺

LC-ESI-MS: *t_R* = 6.70-7.15 min; pos. Mod., 314.75 [M]⁺

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.47 (s, 9H), 1.96 (s, 3H), 2.19-2.25 (m, 2H), 2.45-2.49 (m, 2H), 3.08-3.12 (m, 2H), 3.41-3.50 (m, 2H), 3.64-3.68 (t, J=7.1 Hz, 1H), 5.94 (bs, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 15.1, 23.3, 24.8, 27.9, 29.4, 39.2, 59.0, 83.6, 118.6, 166.5, 170.6, 194.6

7.36 Synthese von Malonsäure-SNAC-Ester (109, 144-150)



Der Thioester wurde unter Argon in abs. DCM (10 ml/100 mg) gelöst. Bei 0°C wurden 2.5 eq. TiCl₄ tropfenweise hinzugegeben. Die dunkelbraune Reaktionslösung wurde für 5 min bei 0°C und anschließend für weitere 6h bei RT gerührt. Nach 6h (DC-Kontrolle) wurde die Reaktionslösung mit wässriger Na₂CO₃-Lsg. (10.0 eq. Na₂CO₃) unter Eiskühlung gequentscht um am Ende eine wässrige 0.1M Produktlösung zu erhalten. Die weiße Suspension wurde abfiltriert (Nutsche) und der Filterkuchen zweimal mit 10 ml MeOH gewaschen. Die wässrig/organische-Phase wurde *in vacuo* aufkonzentriert (Wasserbad 30°C), sodass nur noch die wässrige Phase übrig blieb. Die resultierende bräunliche Lösung wurde in Polypropylentubes überführt und für mindestens 2h bei -20°C gelagert. Nach langsamen auftauen auf 4°C beginnt das überschüssige Na₂CO₃ zu präzipitieren. Das Präzipitat wurde mittels Zentrifugation bei 4°C/4000 rpm für 10 min entfernt. Der Überstand wurde lyophilisiert. Der dadurch resultierende gelb bis weißliche Feststoff wurde in Polypropylentubes überführt und in SM6 oder SM3 Medium gelöst (je nach Mikrobenstamm), um eine 100 mM Lösung herzustellen. Die resultierende leicht bräunliche Lösung wurde, fallsnötig, nochmals bei 4°C/4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde sterilfiltriert und direkt für Fütterungsexperimente verwendet.

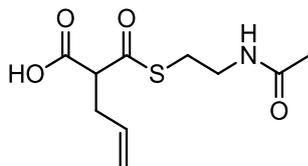
Für NMR-Analysen wurde das Produkt in D₂O anstatt des Fütterungsmediums gelöst.

Alternative Aufarbeitung für kleinere Ansätze:

Die 10.0 eq. Na₂CO₃ werden direkt in den Fütterungspuffer gelöst und zu der Reaktionslösung gegeben. Nach dem diese gelblich klar wurde, wurde die Mischung gleichmäßig auf zwei 50 ml Fulcontubes verteilt und der Reaktionskolben nochmals mit einer Minimalmenge an Methanol gewaschen. Die Methanolfraktion wurde ebenfalls gleichmäßig auf die Fulcontubes verteilt. Nach der Zentrifugation bei 4°C für 5 min bei 4000 rpm, wurde die wässrige Phase abdekantiert und am Rotationsverdampfer bei 60 mbar (30°C Wasserbadtemperatur) für 10 min behandelt. Die so erhaltene gelblich braune Lösung kann anschließend direkt verwendet werden.

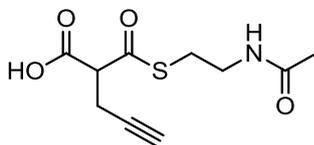
Synthese der Verbindungen

Synthese von 2-(((2-Acetamidoethyl)thio)carbonyl)pent-4-encarbonsäure (**144**)

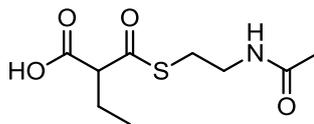


- Ausbeute:** quant. Umsatz, mittels NMR-Analyse bestimmt
- R_f -Wert:** 0.12 (DCM/MeOH 9:1, KMnO_4)
- HRMS:** Berechnet für: 246.07946 $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{NS}[\text{M}+\text{H}]^+$, 268.06140 $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{NNaS}[\text{M}+\text{Na}]^+$; gefunden: 246.07949 $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{NS}[\text{M}+\text{H}]^+$, 268.06048 $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{NNaS}[\text{M}+\text{Na}]^+$
- LC-ESI-MS (EI):** $t_R = 1.84$ min; m/z: 286 $[\text{M}+\text{Na}]^+$
- $^1\text{H-NMR}$:** (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) $\delta = 2.26$ (s, 3H), 2.83-2.87 (m, 2H), 3.30-3.43 (m, 2H), 3.59-3.69 (m, 2H), 3.96-3.99 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 5.35-5.39 (m, 2H), 6.05-6.13 (m, 1H,)
- $^{13}\text{C-NMR}$:** (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) $\delta = 22.8, 28.7, 34.2, 39.1, 117.6, 135.6, 174.8, 175.7, 201.2$

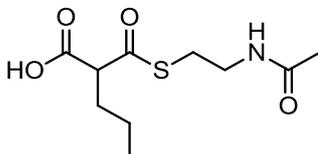
Synthese von 2-(((2-Acetamidoethyl)thio)carbonyl)pent-4-yncarbonsäure (**109**)



- Ausbeute:** quant. Umsatz, mittels NMR-Analyse bestimmt
- R_f -Wert:** 0.18 (DCM/MeOH 1:9)
- HRMS:** Berechnet für: 244.06381 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{NS},[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 244.06402 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{NS},[\text{M}+\text{H}]^+$
- LC-MS-ESI (EI):** $t_R = 4.26$ min; m/z: 244.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$
- $^1\text{H-NMR}$:** (400 MHz, $\text{D}_2\text{O-d}_2$) $\delta = 1.88$ (s, 3H); 2.30-2.32 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 2.61-2.63 (m, 2H); 2.99-3.04 (m, 2H); 3.26-3.32 (m, 2H), 3.68-3.72 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H)
- $^{13}\text{C-NMR}$:** (101MHz, $\text{D}_2\text{O-d}_2$) $\delta = 19.1, 22.5, 28.6, 38.9, 174.2, 174.7, 199.6$

Synthese von 2-(((2-Acetamidoethyl)thio)carbonyl)butansäure (**145**)

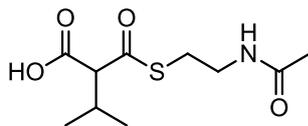
| | |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ausbeute: | quant. Umsatz, mittels NMR-Analyse bestimmt |
| R_f-Wert: | 0.23 (DCM/MeOH 9:1, KMnO ₄) |
| HRMS: | Berechnet für: 234.07946 C ₉ H ₁₆ O ₄ NS[M+H] ⁺ , 256.06140 C ₉ H ₁₅ O ₄ NNaS [M+Na] ⁺ ; gefunden: 234.07957 C ₉ H ₁₆ O ₄ NS[M+H] ⁺ , 256.06095 C ₉ H ₁₅ O ₄ NNaS [M+Na] ⁺ |
| LC-ESI-MS (EI): | t _R = 2.73 min; m/z: 256.00 [M+Na] ⁺ |
| ¹H-NMR: | (400 MHz, D ₂ O-d ₂) δ = 1.13-1.17 (t, J= 7.4Hz, 3H), 2.04-2.11 (q, J= 7.4 Hz, 2), 2.23 (s, 3H), 3.27-3.40 (m, 2H), 3.59-3.69 (m, 2H), 3.74-3.77 (t, J= 7.6 Hz, 1H) |
| ¹³C-NMR: | (101MHz, D ₂ O-d ₂) δ = 12.0, 22.7, 23.9, 28.7, 39.1, 66.2, 174.7, 176.5, 201.92 |

Synthese von 2-(((2-Acetamidoethyl)thio)carbonyl)pentansäure (**146**)

| | |
|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ausbeute: | quant. Umsatz, mittels NMR-Analyse bestimmt |
| R_f-Wert: | 0.24 (DCM/MeOH 9:1, KMnO ₄) |
| HRMS: | Berechnet für: 248.09511 C ₁₀ H ₁₈ O ₄ NS[M+H] ⁺ , 270.07705 C ₁₀ H ₁₇ O ₄ NSNa [M+Na] ⁺ ; gefunden: 248.09514 C ₁₀ H ₁₈ O ₄ NS[M+H] ⁺ , 270.07632 C ₁₀ H ₁₇ O ₄ NSNa [M+Na] ⁺ |
| LC-ESI-MS (EI): | t _R = 1.00 min, m/z: 270.3 [M+Na] ⁺ |
| ¹H-NMR: | (400 MHz, D ₂ O-d ₂) δ = 1.08-1.12 (t, J= 7.4 Hz, 3H), 1.44-1.53 (m, 2H), 1.96-2.09 (ddd, J= 15.1, 7.6, 1.5, 2H), 2.17 (s, 3H), 3.21-3.35 (m, 2H), 3.56-3.59 (m, 2H), 3.77-3.81 (t, J= 7.6Hz, 1H) |
| ¹³C-NMR: | (101MHz, D ₂ O-d ₂) δ = 13.7, 20.7, 22.6, 28.6, 32.4, 39.0, 64.2, 174.7, 176.6, 201.8 |

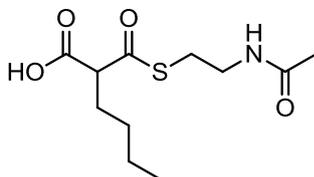
Synthese der Verbindungen

Synthese von 2-(((2-Acetamidoethyl)thio)carbonyl)-3-methylbutansäure (**147**)

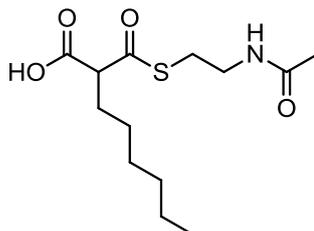


- Ausbeute:** quant. Umsatz, mittels NMR-Analyse bestimmt
- R_f -Wert:** 0.18 (DCM/MeOH 9:1, KMnO_4)
- HRMS:** 248.09511 $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{NS}[\text{M}+\text{H}]^+$, 270.07705 $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{NNaS} [\text{M}+\text{Na}]^+$;
gefunden: 248.09535 $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{NS}[\text{M}+\text{H}]^+$, 270.07709 $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_4\text{NNaS} [\text{M}+\text{Na}]^+$
- LC-ESI-MS (EI):** $t_R = 2.02$ min; EI: m/z: 270.07 $[\text{M}+\text{Na}]^+$
- $^1\text{H-NMR}$:** (400 MHz, $\text{MeOD-d}_4/\text{D}_2\text{O-d}_2$) $\delta = 0.86\text{-}0.87$ (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), $0.92\text{-}0.94$ (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 1.95 (s, 3H), $2.25\text{-}2.34$ (m, 1H), $3.00\text{-}3.04$ (m, 2H), $3.18\text{-}3.21$ (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), $3.18\text{-}3.32$ (m, 2H)
- $^{13}\text{C-NMR}$:** (101MHz, MeOD-d_4) $\delta = 20.8, 21.3, 22.6, 29.2, 31.2, 39.9, 74.5, 173.7, 174.7, 199.7$

Synthese von 2-(((2-Acetamidoethyl)thio)carbonyl)hexansäure (**148**)



- Ausbeute:** quant. Umsatz, mittels NMR-Analyse bestimmt
- R_f -Wert:** 0.13 (DCM/MeOH 9:1, KMnO_4)
- HRMS:** Berechnet für: 262.11076 $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{NS}[\text{M}+\text{H}]^+$, 284.09270 $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{NNaS} [\text{M}+\text{Na}]^+$;
gefunden: 262.11083 $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{NS}[\text{M}+\text{H}]^+$, 284.09226 $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{NNaS} [\text{M}+\text{Na}]^+$
- LC-ESI-MS:** $t_R = 1.08, 283.93$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$
- $^1\text{H-NMR}$:** (400 MHz, $\text{D}_2\text{O-d}_2$) $\delta = 1.12\text{-}1.16$ (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), $1.53\text{-}1.57$ (m, 4H), $2.05\text{-}2.11$ (m, 2H), 2.25 (s, 3H), $3.28\text{-}3.43$ (m, 2H), $3.63\text{-}3.67$ (m, 2H), $3.82\text{-}3.85$ (t, $J = 7.6$ Hz, 1H)
- $^{13}\text{C-NMR}$:** (101MHz, $\text{D}_2\text{O-d}_2$) $\delta = 16.5, 24.9, 25.4, 31.3, 32.1, 32.7, 41.7, 67.1, 177.2, 179.1, 204.6$

Synthese von 2-(((2-Acetamidoethyl)thio)carbonyl)octansäure (**149**)

Ausbeute: quant. Umsatz, mittels NMR-Analyse bestimmt

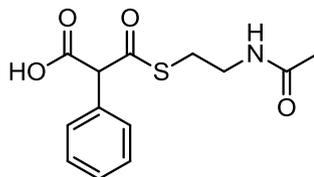
R_f -Wert: 0.23 (DCM/MeOH 9:1)

HRMS: Berechnet für: 290.14206 $C_{13}H_{24}O_4NS[M+H]^+$, 312.12400 $C_{13}H_{23}O_4NaS[M+Na]^+$; gefunden: 290.14226 $C_{13}H_{24}O_4NS[M+H]^+$, 312.12417 $C_{13}H_{23}O_4NaS[M+Na]^+$

LC-EI-MS: t_R = 0-7.02 min; EI, 312.07 $[M+Na]^+$

1H -NMR: (400 MHz, D_2O - d_2 /MeOD- d_4) δ = 0.83-0.86 (m, 3H), 1.25-1.27 (m, 8H), 1.78-1.84 (m, 2H), 1.88 (s, 3H), 2.94-2.98 (m, 2H), 3.26-3.27 (m, 2H), 3.41-3.44 (t, J =7.4 Hz, 1H)

^{13}C -NMR: (101MHz, MeOD- d_4) δ = 14.4, 22.6, 23.6, 28.8, 29.2, 30.2, 31.7, 32.8, 40.1, 65.9, 173.4, 175.6, 199.8

Synthese von 3-(((2-Acetamidoethyl)thio)-3-oxo-2-phenylpropansäure (**150**)

Ausbeute: 50% Umsatz, mittels NMR-Analyse bestimmt; 50% decarboxylierter Thioester

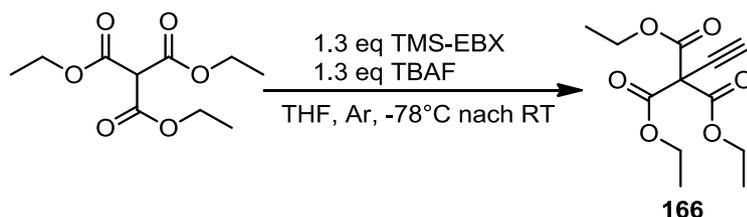
R_f -Wert: 0.2 (MeOH/DCM 9:1, $KMnO_4$)

HRMS: Berechnet für: 282.07946 $C_{13}H_{16}O_4NS[M+H]^+$; gefunden: 282.07936 $C_{13}H_{16}O_4NS[M+H]^+$

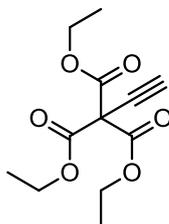
LC-EI-MS: t_R = 0.10-6.98 min; EI,

1H -NMR: (400 MHz, MeOD- d_4) δ = 1.88 (s, 3H), 2.58-2.61 (m, 2H), 2.98-3.01 (m, 2H), 3.35 (s, 1H), 7.24-7.33 (m, 5H)

7.37 Synthese von Triethyl-prop-2-yn-1,1,1-tricarboxylat (166)



3.5 g (15.07 mmol) Triethylmethanetricarboxylat wurden in 15 ml abs. THF gelöst und bei -78°C unter Argonatmosphäre wurden 6.74 g (19.59 mmol) TMS-EBX (Kapitel 7.16) zugegeben und tropfenweise über einen Zeitraum von mindestens 1 h langsam 17.692 g (19.593 ml, 19.59 mmol) einer 1 M TBAF-Lsg. in THF hinzugegeben. Die leicht gelbliche Lösung wurde für 18h gerührt unter langsames Erreichen von RT. Im Anschluss wurde die bräunliche Lösung auf Silica aufgezogen und säulenchromatographisch (EtOAc/PE 0:1→EtOAc/PE 2:8; Gradient in 5% Schritten) aufgereinigt. Die vereinigten produkthaltigen Fraktionen wurden *in vacuo* aufkonzentriert, in 250 ml EtOAc gelöst und zweimal mit 100 ml H_2O gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Es wurden 2.170 g (56 %) eines gelblichen Öls erhalten.



Ausbeute: 2.170 g (56%)

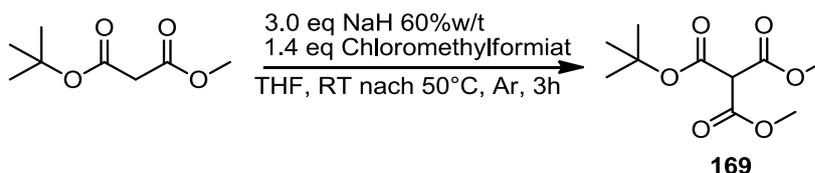
R_f -Wert: 0.28 (Cyclohexan/EtOAc 9:1, KMnO_4)

HRMS: Berechnet für: 257.10196 $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 279.08391 $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 274.12851 $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$; 257.10201 $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 279.08367 $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 274.12878 $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{N}$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$

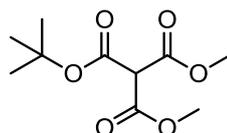
GC-MS: t_R = 5.352 min; DB_50_MST; m/z: 257, 211, 184, 156, 138, 110, 93, 79, 66, 53

$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 1.30-1.33 (t, J = 7.1 Hz, 9H), 2.61 (s, 1H), 4.30-4.35 (q, J = 7.1 Hz, 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 13.9, 62.5, 63.6, 74.6, 75.6, 163.5

7.38 Synthese von 1-*tert.*-Butyl-1,1-dimethylmethantricarboxylat (169)

660 mg (17.2 mmol) NaH 60 % w/t wurden in 50 ml abs. THF vorgelegt und 1.0 g (5.7 mmol) *tert.*-Butylmalonsäuremethylester tropfenweise unter Argonatmosphäre hinzugegeben. Nach 30 min rühren bei RT wurden tropfenweise 2.17 g (1.76 ml, 23.0 mmol) Chloroethylformiat hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 3 h auf 50°C erhitzt. Nach abkühlen auf RT wurde die Reaktion mit 5 ml ges. NH₄Cl-Lsg. gequenchet und das THF *in vacuo* entfernt. Der verbliebene Rückstand wurde in 50 ml H₂O aufgenommen und dreimal mit EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch aufgereinigt (Cyclohexan/EtOAc 1:0→97:3, Gradient in 0.5% Schritte). Es wurden 680 mg eines klaren Öls erhalten.



Ausbeute: 680 mg, 51%

R_f-Wert: 0.39 (EtOAc/Cyclohexan 2:8, KMnO₄)

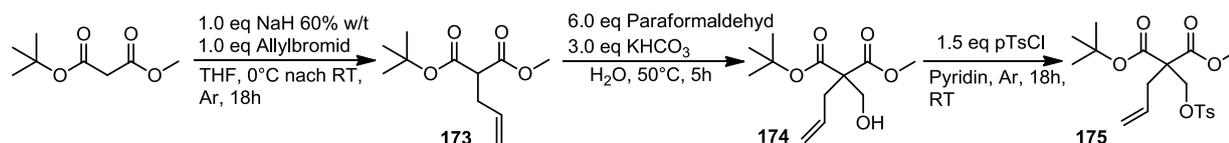
HRMS: Berechnet für: 233.10196 C₁₀H₁₇O₆ [M+H]⁺, 255.08391 C₁₀H₁₇O₆Na [M+Na]⁺, 250.12851 C₁₀H₂₀O₆N [M+NH₄]⁺; gefunden: 233.10219 C₁₀H₁₇O₆ [M+H]⁺, 255.08382 C₁₀H₁₇O₆Na [M+Na]⁺, 250.12895 C₁₀H₂₀O₆N [M+NH₄]⁺

GC-MS: DB_100_S, m/z: 229, 200, 155, 126

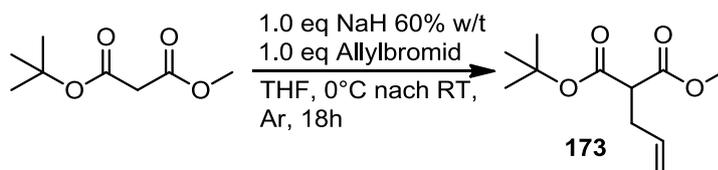
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.48 (s, 9H), 3.80 (s, 6H), 4.35 (s, 1H, 2-H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 27.6, 52.9, 59.5, 83.5, 162.6, 164.5

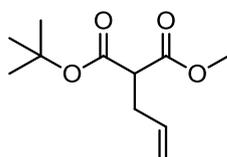
7.39 Synthese von 1-*tert*-Butyl-3-methyl-2-allyl-2-((tosyloxy)methyl)malonat (175)



7.39.1 Synthese von 1-*tert*-Butyl-3-methyl-2-allylmalonat (173)



1.269 g (30.14 mmol) NaH 60% w/t wurden unter Argonatmosphäre zu 175 ml abs. THF gegeben und auf 0°C gekühlt. Im Anschluss wurden 5.0 g (28.70 mmol) 1-*tert*-Butyl-3-methylmalonat tropfenweise hinzugegeben. Nach Zugabe wurde die weiße Suspension für 15 min bei RT gerührt bevor bei RT 3.646 g (2.64 ml, 30.14 mmol) Allylbromid auf einmal hinzugegeben wurden. Nach 18 h bei RT wurde die weiße Suspension mit 5 ml ges. NH₄Cl gequentscht und das THF *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in 150 ml H₂O aufgenommen und dreimal mit 100 ml EtOAc extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch (EtOAc:Cyclohexan 0:1→5:95; Gradient in 2.5% Schritte) aufgereinigt. Es wurden 4.651 g eines klaren Öls erhalten.



Ausbeute: 4.6512 g, 76%

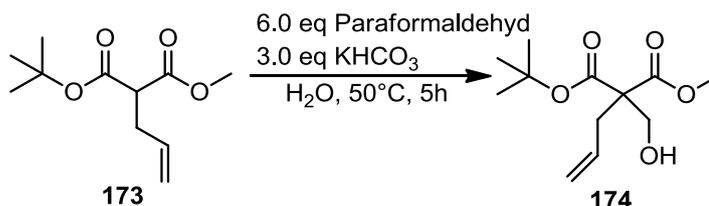
R_f-Wert: 0.62 (EtOAc/Cyclohexan 2:8, KMnO₄)

HRMS: Berechnet für: 215.12779 C₁₁H₁₉O₄ [M+H]⁺, 237.10973 C₁₁H₁₈O₄Na [M+Na]⁺; gefunden: 215.12709 C₁₁H₁₉O₄ [M+H]⁺, 237.10923 C₁₁H₁₈O₄Na [M+Na]⁺

GC-MS: t_R=4.427 min; DB_50_S, m/z: 158, 141, 127, 109, 98, 81, 71, 57

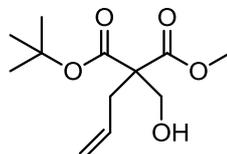
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.45 (s, 9H), 2.58-2.62 (m, 2H), 3.32-3.36 (t, J= 7.6 Hz, 1H), 3.73 (s, 3H) 5.03-5.14 (m, 2H), 5.72-5.83 (m, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 28.0, 33.0, 36.8, 52.4, 82.1, 117.4, 134.4, 168.1, 169.9

7.39.2 Synthese von 1-*tert.*-Butyl-3-methyl-2-allyl-2-(hydroxymethyl)malonat (**174**)

Die Synthese von 1-*tert.*-Butyl-3-methyl-2-allyl-2-(hydroxymethyl)malonat (**174**) erfolgte nach ein abgewandeltes Protokoll von Sun *et al.*^[330]

5.062 g (23.6 mmol) 1-*tert.*-Butyl-3-methyl-2-allylmalonat (**173**), sowie 2.365 g (23.6 mmol) Paraformaldehyd und 5.06 g (50.5 mmol) KHCO₃ wurden in 100 ml bidest. H₂O gegeben und auf 50°C erwärmt. Nach dem sich die weiße Suspension vollständig gelöst hatte (~1 h) wurden einweiteresmal 2.365 g (23.6 mmol) Paraformaldehyd und 5.06 g (50.5 mmol) KHCO₃ hinzugegeben. Nach dem sich die Lösung einweiteresmal aufgeklärt hatte (~1 h) wurde einletzttesmal 2.365 g (23.6 mmol) Paraformaldehyd hinzugegeben und für eine weitere Stunde gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde die klare Lösung auf 0°C abgekühlt und solange (NH₄)₂SO₄ hinzugegeben, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Die wässrige Phase wurde dreimal mit 100 ml EtOAc extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch (EtOAc/PE 0:1→2:8; Gradient in 5% Schritte) aufgereinigt. Es wurden 3.348 g eines klaren Öls erhalten.



Ausbeute: 3.348 g, 58%

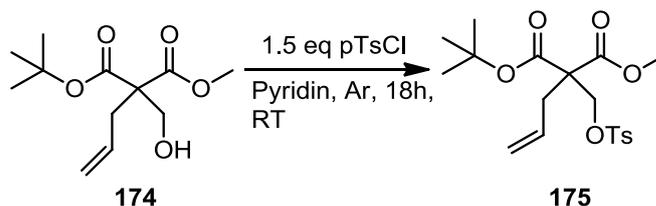
R_f-Wert: 0.29 (Cyclohexan/EtOAc 2:8, KMnO₄)

HRMS: Berechnet für: 245.13835 C₁₂H₂₁O₅ [M+H]⁺, 267.12029 C₁₂H₂₀O₅Na [M+Na]⁺;
gefunden: 245.13819 C₁₂H₂₁O₅ [M+H]⁺, 267.12021 C₁₂H₂₀O₅Na [M+Na]⁺

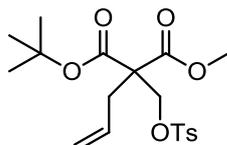
GC-MS: *t_R* = 4.41 min; DB_50_S, m/z: 158, 141, 127, 109, 98, 81, 71, 57

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.46 (s, 9H), 2.63-2.65 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.88-3.90 (d, J = 5.0 Hz, 2H), 5.08-5.17 (m, 2H), 5.68-5.79 (ddt, J = 17.4, 10.1, 7.4 Hz, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 28.1, 36.3, 52.5, 60.0, 64.9, 82.7, 119.4, 132.6, 169.8, 171.6

7.39.3 Synthese von 1-*tert*-Butyl-3-methyl-2-allyl-2-((tosyloxy)methyl)malonate (**175**)

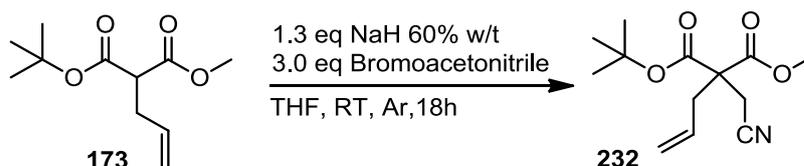
1.465 g (6.00 mmol) 1-*tert*-Butyl-3-methyl-2-allyl-2-(hydroxymethyl)malonate (**174**) wurden in 10 ml abs. Pyridin gelöst. Bei RT wurden anschließend 2.287 g (11.99 mmol) pTsCl hinzugegeben und für weiter 2 h bei RT gerührt. Die leicht gelbliche Lösung wurde dann für 16 h bei 50°C gerührt. Nach abkühlen auf RT wurde das Pyridin *in vacuo* entfernt und der Feststoff in EtOAc 200 ml aufgenommen und 10 min mit 50 ml 2N NaOH gerührt. Die rötliche wässrige Phase wurde abgetrennt und die verbleibende organische Phase zweimal mit 50 ml 2N NaOH gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das erhaltene Öl wurde auf Silica aufgezogen und säulenchromatographisch gereinigt (PE/EtOAc 1:0→2:8, Gradient in 2.5% Schritte). Es wurden 1.843 g eines klaren Öls erhalten, welches auch bei -20°C nur bedingt lagerbar ist.



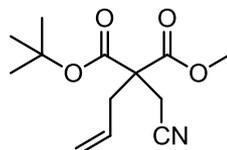
Ausbeute: 1.843 g, 77%

R_f-Wert: 0.42 (EtOAc/Cyclohexan 2:8, KMnO₄)

¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ=1.39 (s, 9H), 2.45 (s, 3H), 2.67-2.69 (d, J=7.5 Hz, 2H), 3.66 (s, 3H), 4.32 (s, 2H), 5.01-5.06 (m, 2H), 5.44-5.55 (m, 1H), 7.33-7.35 (d, J= 7.9 Hz), 7.76-7.78 (d, J= 7.9 Hz)

7.39.4 Synthese von 1-*tert.*-Butyl-3-methyl-2-allyl-2-cyano-malonat (**232**)

1.252 g (5.84 mmol) 1-*tert.*-Butyl-3-methyl-2-allylmalonat (**173**) wurden unter Argonatmosphäre zu 369 mg (8.77 mmol) NaH (60 % w/t in Mineralöl) in 20 ml abs. THF bei RT tropfenweise hinzugegeben. Nach 1 h wurden 2.103 g (1.222 ml, 17.53 mmol) Bromoacetonitril hinzugegeben und die braune Reaktionslösung wurde 18 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Lösung mit 2 ml ges. NH₄Cl-Lsg. gequentscht und das THF *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in 150 ml EtOAc aufgenommen und mit 50 ml H₂O gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und säulenchromatographisch (PE/EtOAc 1:0→98:2, Gradient in 2% Schritte) aufgereinigt. Es wurden 1.193 g eines klaren Öls erhalten.



Ausbeute: 1.193, 81%

R_f-Wert: 0.38 (EtOAc/Cyclohexan 2:8, KMnO₄)

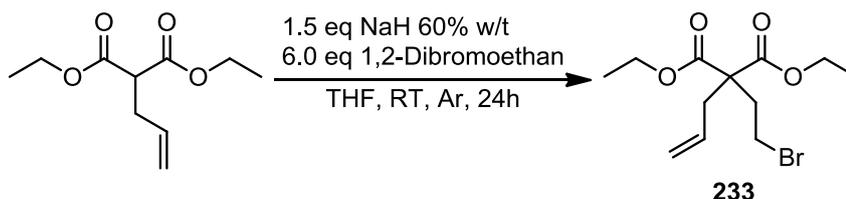
HRMS: Berechnet für: 254.13868 C₁₃H₂₀O₄N[M+H]⁺, 276.12063 C₁₃H₁₉O₄NNa [M+Na]⁺; gefunden: 254.13874 C₁₃H₂₀O₄N[M+H]⁺, 276.12066 C₁₃H₁₉O₄NNa [M+Na]⁺

GC-MS: *t_R* = 5.354 min; DB_50_S, m/z: 254, 238.2, 222.1, 197.1, 180.1, 157.1, 139.1, 120, 94.1, 57.2

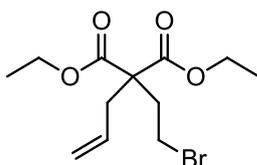
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃-d₁) δ = 1.46 (s, 9H), 2.77-2.80 (dd, J = 7.4, 0.8 Hz, 2H), 2.85-2.86 (d, J = 1.2 Hz, 2H), 3.70 (s, 3H), 5.19-5.29 (m, 2H), 5.55-5.66 (ddt, J = 17.4, 10.4, 7.4 Hz, 1H)

¹³C-NMR: (101MHz, CDCl₃-d₁) δ = 21.8, 27.9, 37.4, 53.3, 55.7, 83.8, 116.5, 121.3, 130.8, 167.2, 169.4

7.40 Synthese von Diethyl-2-allyl-2-(2-bromoethyl)malonat (233)



3.0 g (14.98 mmol) Diethyl-2-allylmalonat wurden unter Argonatmosphäre zu 946 mg (22.47 mmol) NaH (60% w/t in Mineralöl) in 20 ml abs. THF bei RT tropfenweise hinzugegeben. Nach 1 h wurden 16.888 g (7.747 ml, 89.90 mmol) 1,2-Dibromoethan hinzugegeben und die braune Reaktionslösung wurde 24 h bei RT gerührt. Im Anschluss wurde die Lösung mit 2 ml ges. NH_4Cl -Lsg. gequentscht und das THF *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in 150 ml EtOAc aufgenommen und mit 50 ml H_2O gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und säulenchromatographisch (PE/EtOAc 1:0→99:1, Gradient in 0.25% Schritte) aufgereinigt. Es wurden 1.573 g eines klaren Öls erhalten.



Ausbeute: 1.573 g, 34%

R_f -Wert: 0.82 (Cyclohexan/EtOAc 2:8, KMnO_4)

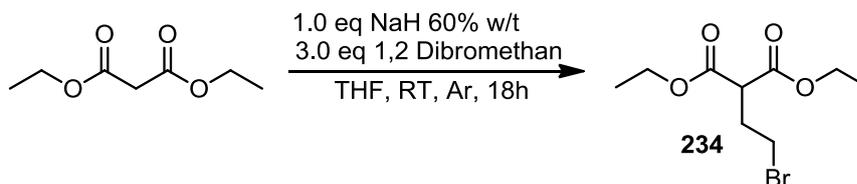
HRMS: Berechnet für: 307.05395 $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Br}[\text{M}+\text{H}]^+$, 309.05190 $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_4^{81}\text{Br}[\text{M}+\text{H}]^+$; gefunden: 307.05412 $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_4\text{Br}[\text{M}+\text{H}]^+$, 309.05203 $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_4^{81}\text{Br}[\text{M}+\text{H}]^+$

GC-MS: t_R = 5.726 min; DB_50_S; m/z: 261, 234, 215, 199, 187, 173, 153, 139, 125, 111, 95, 79, 67, 53

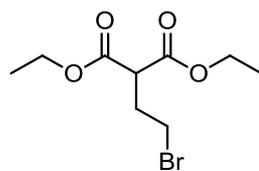
$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 1.24-1.28 (t, J = 7.1 Hz, 6H), 2.42-2.46 (m, 2H), 2.64-2.66 (dd, J = 7.3 Hz, 2H), 3.33-3.38 (m, 2H), 4.17-4.23 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 5.12-5.16 (m, 2H), 5.59-6.70 (m, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ = 14.2, 27.2, 36.4, 37.9, 57.6, 61.7, 119.8, 131.95, 170.4

7.41 Synthese von 2-(2-Bromoethyl)malonsäurediethylester (234)



5.00 g (31.22 mmol) Diethylmalonat wurden über 30 min tropfenweise unter Argonatmosphäre zu einer Suspension aus 1.33 g (31.53 mmol) NaH (60% w/t in Mineralöl) in 200 ml abs. THF bei RT gegeben. Nach 1 h wurden 17.59 g (93.65 mmol) 1,2-Dibromethan hinzugegeben und die entstandene braune Reaktionslösung wurde 18 h bei RT gerührt. Danach wurde die Lösung mit 5 ml ges. NH_4Cl -Lsg. gequenscht und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde in 300 ml EtOAc aufgenommen und einmal mit 150 ml H_2O gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und säulenchromatographisch (PE/EtOAc 1:0 \rightarrow 98:2, Gradient in 2% Schritte) aufgereinigt. Es wurden 6.17 g eines klaren Öls erhalten.



Ausbeute: 6.17 g, 74%

R_f -Wert: 0.64 (EtOAc/Cyclohexan 1:9, KMnO_4)

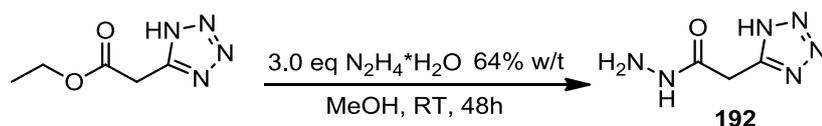
HRMS: Berechnet für: 267.02265 $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4\text{Br}[\text{M}+\text{H}]^+$, 269.02060 $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4^{81}\text{Br}[\text{M}+\text{H}]^+$;
gefunden: 267.02202 $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4\text{Br}[\text{M}+\text{H}]^+$, 269.01999 $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4^{81}\text{Br}[\text{M}+\text{H}]^+$

GC-MS: $t_R = 4.204$ min; DB_50_S; m/z: 173, 160, 143, 133, 115, 101, 87, 73, 55

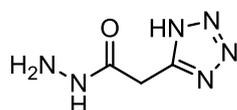
$^1\text{H-NMR}$: (400 MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) $\delta = 0.94\text{-}0.97$ (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.24-1.27 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H), 1.88-1.95 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H), 3.21-3.25 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.16- 4.21 (q, $J = 7.1$ Hz, 4H)

$^{13}\text{C-NMR}$: (101MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) $\delta = 11.9, 14.2, 22.3, 53.7, 61.3, 169.6$

7.42 Synthese von 2-(1H-tetrazol-5-yl)acetohydrazid (192)



2.0 g (12.8 mmol) Ethyl 2-(1H-Tetrazol-5-yl)acetat wurden in einer Minimalmenge an MeOH (PA-grade oder technisch) gelöst und bei RT wurden 3.205 g (3.12 ml, 64.0 mmol) $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 64% w/t hinzugegeben. Die anfänglich klare Lösung wurde 48 h bei RT gerührt. Die resultierende weiße Suspension wurde abfiltriert und der Filtrückstand mit MeOH gewaschen. Im Anschluss wurde der Rückstand in 100 ml MeOH gegeben und für 40 min unterrühren refluxiert. Im Anschluss wurde die nicht vollständig gelöste Suspension langsam auf RT abgekühlt. Der Rückstand wurde abfiltriert und mit MeOH gewaschen. Es wurden 1.402 g eines weißen NMR-reinem Feststoffes erhalten.

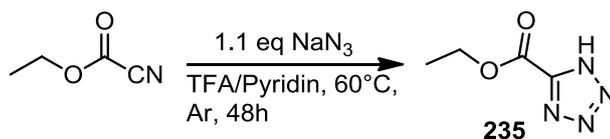


Ausbeute: 1.402 g, 77%

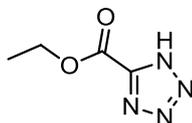
ATR-IR: 3275.36, 2832.48, 2360.84, 1672.49, 1622.69, 1567.34, 1525.39, 1466.46, 1437.53, 1409.96, 1347.49, 1266.96, 1197.28, 1183.49, 1155.11, 1121.73, 1088.67, 1059.18, 1029.75, 956.31, 818.39, 730.78, 702.86, 592.76

¹H-NMR: (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 3.52 (s, 2H)

¹³C-NMR: (101MHz, DMSO- d_6) δ = 31.7, 155.8, 168.8

7.43 Synthese von Ethyl-1H-tetrazol-5-carboxylat (235)^[331]

Zu 15 ml abs. Pyridin wurden bei RT tropfenweise 4.4 ml TFA hinzugegeben und für 10 min bei RT unter Argonatmosphäre gerührt. Im Anschluss wurden zusätzlich 10 ml abs. Pyridin zugegeben und 2.5 g (25.0 mmol) Cyanoethylformate, sowie 1.8 g (27.0 mmol) NaN₃. Nach 48 h bei 60°C wurde die klare Lösung abgekühlt, und in eine Mischung aus 50 ccm³ Eis und 20 ml konz. HCl. Die Mischung wurde dreimal mit 100 ml Et₂O extrahiert und über Na₂SO₄ getrocknet. Zu diesem klaren Öl wurden 15 ml *iso*-Hexan gegeben und für 3 min kräftig gerührt. Es bildete sich eine weiße Suspension. Nach entfernen des *iso*-Hexans und trocknen am HV wurden 2.319 g eines weißen Feststoffes erhalten.



Ausbeute: 2.319 g, 65%

Schmelzpunkt: 81.8°C-89.7°C (lit. 88-93°C^[331])

HRMS: Berechnet für: 143.05635 C₄H₇O₂N₄ [M+H]⁺; gefunden: 143.05612 C₄H₇O₂N₄ [M+H]⁺

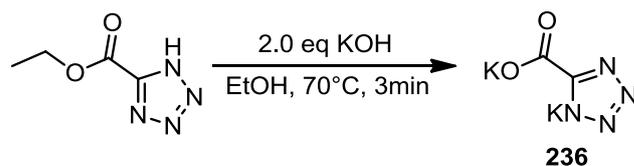
GC-MS: *t_R* = 4.931 min; DB_100_S, m/z: 142, 125, 115, 97, 83, 70, 55

ATR-IR: 3091.52-2445.10 b, 1839.27, 1744.75, 1219.23

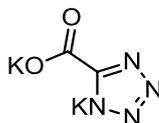
¹H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ = 1.23-1.27 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 4.29-4.34 (q, J = 7.1 Hz, 2H)

¹³C-NMR: (101 MHz, CDCl₃) δ = 13.78, 62.5, 140.5, 156.8

7.44 Synthese von Di-Kalium-5-carboxyltetrazolat (**236**)^[331]



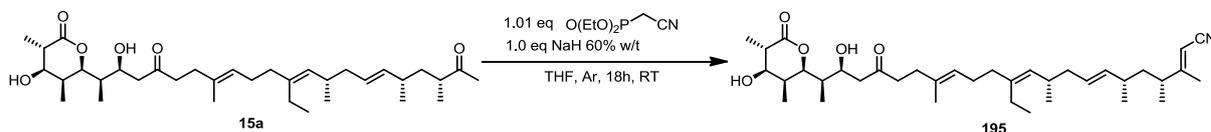
5.387 g (92.73 mmol) KOH gelöst in 8.5 ml H₂O wurden zu 5.990 g (42.15 mmol) 1H-Tetrazol-5-carbonsäureethylester (**235**) gelöst in 124 ml heißem EtOH gegeben. Der weiße Niederschlag wurde sofort abfiltriert und zweimal mit 20 ml MeOH gewaschen und an der Luft getrocknet. Es wurden 5.951 g, eines weißen Feststoffes erhalten.



Ausbeute: 5.951 g, 74%

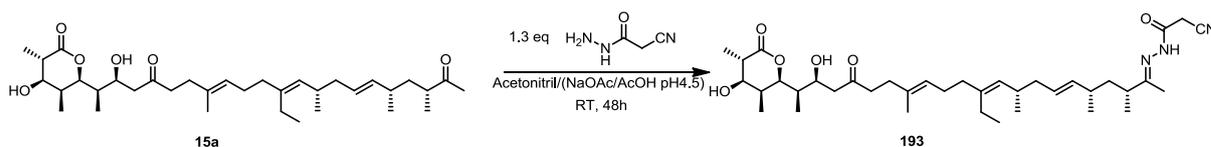
7.45 Premonensinderivatisierung

7.45.1 Synthese von Cyanopremonensin A (195)



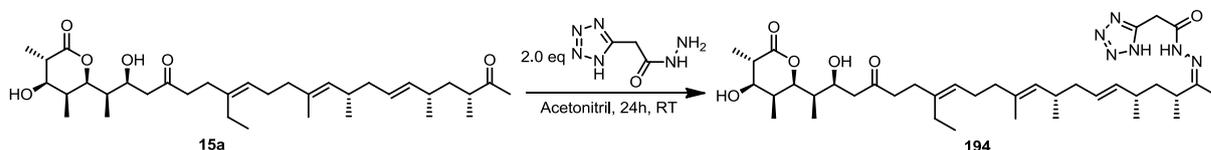
Zu einer Suspension von 15mg (6.18 mmol) NaH 60% w/t in 10 ml abs. THF wurden unter Argonatmosphäre bei 0°C tropfenweise 100 mg (100 µl, 6.18 mmol) Diethyl(cyanomethyl)phosphonat hinzugegeben. Nach 30 min wurden aus dieser Stammlösung 56 µl entnommen und zu 1 mg (1.78 µmol) Premonensin A gelöst in 200 µl abs. THF unter Argonatmosphäre bei RT gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 18 h bei RT gerührt, bevor sie mit 400 µl MeOH verdünnt wurde für LC-ESI-MS Analysen.

7.45.2 Synthese von Cyanosemicarbazolpremonensin A (193)



Zu 1 mg (1.78 µmol) Premonensin A gelöst in 200 µl Acetonitril wurden 2.29 mg (2.31 µmol) 2-Cyanoacetohydrazid gegeben und 100 µl NaOAc/AcOH-Puffer pH4.5. Das Zweiphasengemisch wurde für 48 h bei RT gerührt. Für die LC-ESI-MS Analytik wurde das Gemisch zusätzlich mit 300 µl MeOH versetzt.

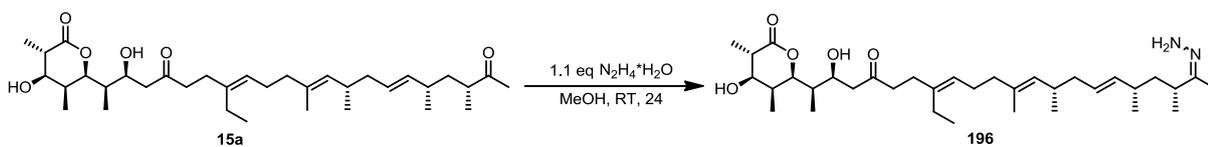
7.45.3 Synthese von Tetrazolpremonensin A (194)



Zu 1 mg (1.78 µmol) Premonensin A gelöst in 400 µl Acetonitril wurden 0.5 mg (3.56 µmol) 2-(1H-tetrazol-5-yl)acetohydrazid gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 48 h bei RT gerührt. Für die LC-ESI-MS Analyse wurde die Suspension mit 600 µl MeOH versetzt und über ein HPLC-Filter gereinigt.

Synthese der Verbindungen

7.45.4 Synthese vonHydrazonpremonensin A (196)



Zu 1 mg (1.78 μ mol) Premonensin A gelöst in 400 μ l MeOH wurden 20 μ l einer 0.1M Hydrazinmono hydrat-Lsg. (gelöst in MeOH) gegeben. Die Reaktionslösung wurde für 18 h bei RT gerührt. Für die LC-ESI-MS Analyse wurde die Lösung direkt verwendet.

8 Abkürzungen und Akronyme

| | |
|----------------------------------------|----------------------------------------|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| μ | Mikro |
| μg | Mikrogramm (10^{-6} g) |
| μl | Mikroliter (10^{-6} L) |
| 6-dEB | 6-Desoxyerythronolid |
| α | Alpha |
| β | Beta |
| Δ | Delta |
| A | |
| abs. | absolutes |
| AcOH | Essigsäure |
| ACP | Acyl Carrier Protein |
| AIBN | Azo-bis-(isobutyronitril) |
| AlCl ₃ | Aluminium(III)chlorid |
| AlMe ₃ | Trimethylaluminium |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| Ar | Argon |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AT | Acyltransferase |
| B | |
| Br ₂ | Brom |
| Bu ₃ SnH | Tributylzinnhydrid |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | |
| CaCl ₂ | Calciumchlorid |
| CDI | <i>N,N'</i> -Carbodiimidazol |
| CHCl ₃ | Chloroform |
| CL | Carbonsäureligase |
| CoA | Coenzym A |
| Cu(OAc) ₂ ·H ₂ O | Kupferacetat |
| CuCl | Kupfer(I)chlorid |
| CuSO ₄ | Kupfersulfat |
| D | |
| D | Dalton |
| DBU | 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en |
| DC | Dünnschicht Chromatographie |
| DCC | Dicyclohexylcarbodiimid |
| DCM | Dichlormethan |
| ddH ₂ O | Doppelt destilliertes Wasser |
| d.h. | das heißt |
| DEBS | 6-Desoxyerythronolid B Synthase |
| DH | Dehydratase |
| DHCHC | 4,5-Dihydroxycyclohex-1-en carbonsäure |
| DIC | Diisopropylcarbodiimid |
| DMAPP | Dimethylallylpyrophosphat |

Abkürzungen und Akronyme

| | |
|------------------|--------------------------------------------------------|
| DMF | N,N-Dimethylformamid |
| DMP | Dess-Martin Periodinan |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| D ₂ O | Deuteriumoxid |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |

E

| | |
|--------------------|----------------------------------|
| EBX | Ethynyl-1,2-benziodoxol-3(1H)-on |
| ESI | Elektronenspray-Ionisation |
| Et ₂ NH | Diethylamin |
| Et ₂ O | Diethylether |
| EtOH | Ethanol |
| EPP | Ethylenpolyphosphat |
| ER | Enosylreduktase |
| Ery | Erythromycin |
| Eq. | Äquivalent |

F

| | |
|--------|-------------------------------------------|
| FACS | <i>Fluorescenc activated cell sorting</i> |
| FAS | Fettsäurebiosynthese |
| FCdien | Fusicoccadien |
| FS | Fusicoccadiensynthese |

G

| | |
|-------|-------------------------------------------------------|
| g | Gramm |
| gCOSY | <i>Gradient Corellations Spectroscopie</i> |
| gHSQC | <i>Gradient Hetronuclear Single Quantum Coherence</i> |
| GPP | Geranylpyrophosphat |

H

| | |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| h | Stunden |
| HATU | [O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N, N',N'-tetramethyluronium-hexafluorphosphat] |
| HBTU | <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate |
| Hg(OAc) ₂ | Quecksilberacetat |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HOBt | 1-Hydroxybenzotriazol |
| H ₂ SO ₄ | Schwefelsäure |
| HWE-Olifinierung | Horner-Wadsworth-Emmons-Olifinierung |
| HV | Hochvacuum |

I

| | |
|----------------|-------------------------|
| I ₂ | Iod |
| IPP | Isopentenylpyrophosphat |

K

| | |
|-------------------|-------------------|
| KH | Kaliumhydrid |
| KI | Kaliumiodid |
| KMnO ₄ | Kaliumpermanganat |
| KOH | Kaliumhydroxid |
| KR | Ketoreduktase |

| | |
|---------------------------------|-----------------------------------------------|
| KS | Ketosynthase |
| KSAc | Kaliumacetat |
| L | |
| L | Liter |
| Li | Lithium |
| LiAlH ₄ | Lithiumaluminiumhydrid |
| LDA | Lithiumdiisopropylamin |
| LiOH·H ₂ O | Lithiumhydroxid Monohydrat |
| M | |
| M | Molar |
| m | Milli |
| mM | Millimolar |
| m/z | Massen zu Ladungsverhältniss |
| MAT | Malonyl-CoA:Acyl Carrier Protein Transacylase |
| MCoA | Malonyl-CoA |
| mCPBA | <i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure |
| MD | <i>Molecular Dynamics</i> |
| MDa | Mega Dalton |
| MeCN | Acetonitril |
| MeI | Methyliodid |
| mg | Milligramm (10 ⁻³ g) |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter (10 ⁻³ L) |
| MM | <i>Molecular Mechanics</i> |
| MMCoA | Methylmalonyl-CoA |
| MS | Massenspektrometrie |
| MsCl | Methansulfonylchlorid |
| N | |
| n | nano |
| <i>n</i> -BuLi | <i>n</i> -Buthyllithium |
| NaBH ₄ | Natriumborhydrid |
| Na ₂ CO ₃ | Natriumcarbonat |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NaH | Natriumhydrid |
| NaHCO ₃ | Natriumhydrogencarbonat |
| NaI | Natriumiodid |
| NaIO ₄ | Natriumperiodat |
| NaN ₃ | Natriumazid |
| NaNO ₂ | Natriumnitrit |
| NaOAc | Natriumacetat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NaOMe | Natriummethoxid |
| NBS | <i>N</i> -Bromsuccinimid |
| NCS | <i>N</i> -Chlorosuccinimid |
| NEt ₃ | Triethylamin |
| NHS | <i>N</i> -Hydroxysuccinimid |
| N ₂ H ₄ | Hydrazin |
| NH ₂ OH | Hydroxylamin |
| NMM | <i>N</i> -Methylmorpholin |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NRRL | ARS Culture Collection |

Abkürzungen und Akronyme

O

P

| | |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------|
| PCC | Pyridiniumchlorochromat |
| PDB | Precursor Directed Biosynthesis |
| PhSH | Thiophenol |
| PfpTFA | Pentafluorophenoltrifluoressigsäure |
| PK | Polyketid |
| PKS | Polyketid Synthase |
| pNP-Chloroformiat | Para-Nitrophenol-Chloroformiat |
| PPI | Pyrophosphat |
| PPh ₃ | Triphenylphosphin |
| PPTase | Phosphopantetheinyltransferase |
| PDB | Precursor Direkted Biosynthesis |
| pTsCl | Para-Toluolsulfonsäurechlorid |
| PyBOP | Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat |
| PyBrOP | Bromotripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat |

Q

| | |
|----|-----------------|
| QM | Quantenmechanik |
|----|-----------------|

R

| | |
|-----|---------------------------|
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| Rt | Retentionszeit |
| RT | Raumtemperatur (ca. 20°C) |

S

| | |
|-------------------------|------------------------------------|
| s | Sekunde |
| s. | siehe |
| <i>S. cinnamomensis</i> | <i>Streptomyces cinnamomensis</i> |
| <i>S. coelicolor</i> | <i>Streptomyces coelicolor</i> |
| <i>S. erythraea</i> | <i>Saccharopolyspora erythraea</i> |
| <i>S. hygrosopicus</i> | <i>Streptomyces hygrosopicus</i> |
| SeO ₂ | Selendioxid |
| SNAC | N-Acetylcysteamine |
| SOCl ₂ | Thionylchlorid |

T

| | |
|--------------------------------|-------------------------------------------------|
| TBACl | Tetrabutylamoniumchlorid |
| TBAF | Tetrabutylamoniumfluorid |
| <i>t</i> BuOH | <i>tert.</i> -Butanol |
| <i>t</i> BuOOH | <i>tert.</i> -Butylhydroperoxid |
| TE | Terminale Thioesterase |
| TEMPO | 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| Tf ₂ O | Trifluormethansulfonsäureanhydrid |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TiCl ₄ | Titantetrachlorid |
| Ti(<i>i</i> PrO) ₄ | Titan(IV)isopropoxid |
| TiO ₂ | Titandioxid |
| TMS-Cl | Trimethylsilylchlorid |
| TMS-EBX | Trimethylsilyl-ethynyl-1,2-benziodoxol-3(1H)-on |

TMSOTf Trimetylsilyltrifluormethansulfonsäure
TfN₃ Trifluormethansulfonsäureazid

U
UV Ultra-Violettstrahlung

V
v/v Volumen / Volumen
vgl. Vergleiche

W
w/v Gewicht / Volumen
wt Wildtyp

Z
ZnBr₂ Zinkbromid

Darüber hinaus verwendete Abkürzungen sind IUPAC- bzw. SI-konform. Die Aminosäuren wurden nach dem international üblichen Ein- bzw. Dreibuchstaben-Code abgekürzt.

9 Literaturverzeichnis

- [1] WHO, *Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014*. WHO, **2014**, ISBN: 978 92 4 156474 8,S. 257.
- [2] WHO, *WHO EUROPE REGION GLOBOCAN 2012 (IARC) Section of Cancer Surveillance (22/9/2014)*, WHO2012.
http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.
- [3] J. Berdy, *J. Antibiot.***2005**, 58(1), 1-26.
- [4] A. L. Demain und S. Sanchez, *J. Antibiot.***2009**, 62, (1), 5-16.
- [5] F. von Nussbaum *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.***2006**, 45, (31), 5072-5129.
- [6] D. J. Newman und G.M. Cragg, *J. Nat. Prod.***2012**, 75, (3), 311-335.
- [7] J. Clardy und C. Walsh, *Nature*,**2004**, 432, (7019), 829-837.
- [8] C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.***2009**, 48, (26), 4688-4716.
- [9] C. R. Hutchinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, (7), 3336-3338.
- [10] C. Khosla, *Chem.Rev.***1997**, 97, (7), 2577-2590.
- [11] K. J. Weissman und P.F. Leadlay, *Nat.Rev.Micro.***2005**, 3, (12), 925-936.
- [12] G. V. L. Steven und S. Ben, *Curr.Opin.Drug.Discov.Devel.***2008**, 11, (2), 186-195.
- [13] B. Shen, *Curr. Opin. Microbiol.***2003**, 7, (2), 285-295.
- [14] J. Staunton und K.J. Weissman, *Nat.Prod.Rep.***2001**, 18, (4), 380-416.
- [15] U. Sundermann, S. Kushnir und F. Schulz, *Nachr. Chem.***2011**, 59(1), 29-35.
- [16] R. Bentley und J.W. Bennett, *Annu.Rev. of Microbiol.***1999**, 53, (1), 411-446.
- [17] D. A. Hopwood und D.H. Sherman, *Annu.Rev.Gen.***1990**, 24, (1), 37-62.
- [18] H. G. Menzella *et al.*, *Nat.Biotech.***2005**, 23(9), 1171-1176.
- [19] M. A. Fischbach und C.T. Walsh, *Chem.Rev.***2006**, 106, (8), 3468-3496.
- [20] K. S. J. Magnuson, C. O. Rock und J. E.Jr. Cronan, *Microbiolo. Rev.*, **1993**, 57, (3), 522-542.
- [21] D. A. Hopwood, *Chem. Rev.***1997**, 97, (7), 2465-2498.
- [22] J. Piel, *Nat. Prod. Rep.***2010**, 27, (7), 996-1047.
- [23] R. Müller, *Chem.Biol.***2004**, 11, (1), 4-6.
- [24] J. R. Lai, A. Koglin und C.T. Walsh, *Biochemistry*,**2006**, 45, (50), 14869-14879.
- [25]. E. S. Sattely, M.A. Fischbach und C.T. Walsh, *Nat.Prod.Rep.***2008**, 25, (4), 757-793.
- [26] K. J. Weissman, und R. Müller, *ChemBioChem.***2008**, 9, (6), 826-848.
- [27] A. T. Keatinge-Clay und R.M. Stroud, *Structure*, **2006**, 14, (4), 737-748.
- [28] M. McPherson, C. Khosla und D.E. Cane, *J. Am.Chem. Soc.*, **1998**, 120, (13), 3267-3268.
- [29] K. Nakajima *et al.*, *J.Biol.Chem.***1999**, 274, (23), 16563-16568.
- [30] R. Reidet *et al.*, *Biochemistry*, **2002**, 42, (1), 72-79.

- [31] A. C. Price, *et al.*, *Structure*, **2004**, 12, (3), 417-428.
- [32] P. Caffrey, *Chem.Biol.***2005**, 12, (10), 1060-1062.
- [33] A. P. Siskos *et al.*, *Chem.Biol.***2005**, 12, (10), 1145-1153.
- [34] D. L Akey *et al.*, *Structure*, **2010**, 18, (1), 94-105.
- [35] S. T. Raound M.G. Rossmann, *J.Mol.Bio.*, **1973**, 76, (2), 241-256.
- [36] M. G. Rossmann, D. Moras und K.W. Olsen, *Nature*, **1974**, 250, (5463), 194-199.
- [37] S. Donadio, und L. Katz, *Gene*, **1992**, 111, (1), 51-60.
- [38] L. Du, und L. Lou, *Nat.Prod. Rep.*, **2010**, 27, (2) 255-278.
- [39] C. Khosla, *J.Org.Chem.***2009**, 74,(17), 6416-6420.
- [40] U. Rix, *et al.*,*Nat.Prod.Rep.***2002**, 19,(5), 542-580.
- [41] C. Khosla, und P.B. Harbury, *Nature*, **2001**, 409, (6817), 247-252.
- [42] S. Mutak, *J. Antibiot.***2007**, 60, (2), 85-122.
- [43] W. Chewund C.C. Shaw, 2005, Google Patents, WO 2005016935 A2.
- [44] F. Taftet *al.*, *ChemBioChem.*, **2008**, 9, (7), 1057-1060.
- [45] R. Thiericke und J. Rohr, *Nat.Prod.Rep.***1993**, 10,(3), 265-289.
- [46] N. Stebbing, *Bacteriol.Rev.*, **1974**, 38, (1), 1-28.
- [47] A. Demain und R. Elander, *Antonie van Leeuwenhoek*,**1999**, 75,(1-2), 5-19.
- [48] E. I. Grazianiet *al.*, *Org.Lett.***2003**, 5, (14), 2385-2388.
- [49] F. V. Ritaccoet *al.*,*Appl. Environ. Microbiol.***2005**, 71, (4), 1971-1976.
- [50] H. R Arnsteinund W.J. Halliday, *J. Biochem.***1956**, 64, (2), 380-390.
- [51] L. Kenneth und J. Rinehart, *Pure Appl.Chem.***1977**, 49, (9), 1361-1384.
- [52] J. Christopher *et al.*, *J.Antibiot.***1991**, 44,(3), 357-365.
- [53] A. Kirschning und F. Hahn, *Angew.Chem.Int.Ed.***2012**, 51, (17), 4012-4022.
- [54] K. J. Weissman, *Trends Biotechnol.***2007**, 25, (4), 139-142.
- [55] S. N. Sehgal, *J. Antibiot.*, **1975**, 28, 721–726.
- [56] D. C. N. Swindells, *Can.J.Chem.***1978**, 56, 2491–2492.
- [57] J. A. Findlay, *Can.J.Chem.*, **1980**, 58, 579–590.
- [58] M.-Q. Zhang, und B. Wilkinson, *Curr.Opin.Biotechnol.***2007**, 18, (6), 478-488.
- [59] T. Schweckeet *al.*,*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.***1995**, 92, (17), 7839-7843.
- [60] S. R. Park *et al.*, *J.Antibiot.***2010**, 63, (8), 434-441.
- [61] R.E. Morris, *Transplant. Proc.*, **1991**, 23, 2722-2724.
- [62] J.J. Sanglier, M. Dreyfuss, T. Fehr, R. Traber, M.H. Schreier, *Immunosuppressants of microbial origin 1*, **1993**, 1-27.
- [63] R. P.Carlson, *et.al.*,*J.Pharmacol.Exp.Ther.***1993**, 266, 1125–1138.
- [64] S. Huang, *Cancer Biol. Ther.***2003**, 2, 222–232.
- [65] C. M Hartfordund M.J. Ratain, *Clin.Pharmacol.Ther.***2007**, 82, (4), 381-388.
- [66] R. T. Abraham, *Expert.Opin.Ther.Targets***2008**, 12, (2), 209-224.

- [67] M. M Mita, A. Mita und E.K. Rowinsky, *Cancer Biology & Therapy*, **2003**, 2, (0), 168-176.
- [68] R.T Abraham und C.H. Eng, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, **2008**, 12, (2), 209-222.
- [69] B. Rubio-Viqueira, M.H., *Curr.Opin.Investig.Drugs*, **2006**, 7, 501-512.
- [70] M. A. Gregory et al., *Angew.Chem.Int.Ed.***2005**, 44, (30), 4757-4760.
- [71] M. A Gregory et al., *Org.Biomol.Chem.***2006**, 4, (19), 3565-3568.
- [72] P. A. S. Lowden et al., *Angew.Chem.Int.Ed.***1996**, 35, (19), 2249-2251.
- [73] J. Kennedy, *Nat.Prod.Rep.***2008**, 25, (1), 25-34.
- [74] C. D. Reeves, *Critical Reviews in Biotechnology*, **2003**, 23, (2), 95-147.
- [75] R. J. M. Goss et al., *ChemBioChem.***2010**, 11, (5), 698-702.
- [76] U. Sundermann, Dissertation, *Reduzierte Polyketide; Beiträge zur Erforschung und Manipulation der Substratspezifität von Polyketidsynthasen*, **2012**, TU Dortmund. S.301.
- [77] R. J.M Goss et al., *Org. Biomol. Chem.***2006**, 4, (22), 4071-4073.
- [78] J. N. Andexer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***2011**, 108, (12), 4776-4781.
- [79] S. Klopries, Masterarbeit, *Die Synthese von Bausteinen für die Mutasythese neuer Rapamycin-Analoga*, **2010**, TU Dortmund.
- [80] G. Stork und H.K. Landesman, *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, (19), 5129-5130.
- [81] D. J. Marquardt, und M. Newcomb, *Synth. Commun.***1988**, 18, (11), 1193-1199.
- [82] P. A. S Lowden et al., *ChemBioChem.***2004**, 5, (4), 535-538.
- [83] U. Christians, *Metabolite structure elucidation from Q-TOF MS and MS/MS data with the Metabolite Identification software*, bioNovo, 12635 East Montview Blvd., Aurora, Colorado, CO, USA.
- [84] K. O. Boernsen et al., *J. Mass Spectrom.***2007**, 42, (6), 793-802.
- [85] L. Mancuso et al., *Org. Lett.***2013**, 15, (17), 4442-4445.
- [86] J. M Rivera-Ortiz und R.H. Burris, *J. Bacteriol.***1975**, 123, (2), 537-545.
- [87] K. Fisher, M.J. Dilworth und W.E. Newton, *Biochemistry*, **2006**, 45, (13), 4190-4198.
- [88] J. R. Griffin, *Prog. Med. Chem.***1994**, 31, 121-232.
- [89] R. P Smith und D.E. Wilcox, *Critical Reviews in Toxicology*, **1994**, 24, (4), 355-377.
- [90] B. E VanUffelen, et al., *Life Sciences*, **1998**, 63, (8), 645-657.
- [91] Y. Minamiyama et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1997**, 283, (3), 1479-1485.
- [92] R. Cassoly und Q.H. Gibson, *J. Mol. Biol.***1975**, 91, (3), 301-313.
- [93] D. P. Doyle et al., *J. Am.Chem. Soc.***1988**, 110, (2), 593-599.
- [94] M. Hoshino et al., *J. Am.Chem. Soc.***1996**, 118, (24), 5702-5707.
- [95] K. Yoshida et al., *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **1980**, 46, (1), 71-77.

- [96] S. Goldstein und G. Czapski, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, (14), 3419-3425.
- [97] D. R. Arnelle und J.S. Stamler, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, 318, (2), 279-285.
- [98] D. Romo, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, (17), 7906-7907.
- [99] S. Pal, *Tetrahedron*, **2006**, 62, (14), 3171-3200.
- [100] F. Fraschini, F. Scaglione und G. Demartini, *Clinical Pharmacokinetics*, **1993**, 25, (3), 189-204.
- [101] K. Rodvold, *Clinical Pharmacokinetics*, **1999**, 37, (5), 385-398.
- [102] T. Tanikawa *et al.*, *J. Med. Chem.* **2001**, 44, (24), 4027-4030.
- [103] G. W. Ashley *et al.*, *J. Antibiot.* **2006**, 59, (7), 392-401.
- [104] S. Frykman *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 76, (4), 303-310.
- [105] R. J. M. Gossund H. Hong, *Chem. Comm.* **2005**, (31), 3983-3985.
- [106] J. R. Jacobsen *et al.*, *Science*, **1997**, 277, (5324), 367-369.
- [107] R. McDaniel, M. Welch und C.R. Hutchinson, *Chem. Rev.* **2005**, 105, (2), 543-558.
- [108] N. Pryk, Masterarbeit, *Die Synthese neuer Erythromycin-Derivate durch die Verknüpfung von Fermentation und organischer Synthese*, **2012**, TU Dortmund, S. 139.
- [109] D. H. Kwan *et al.*, *Chem. Biol.* **2008**, 15, (11), 1231-1240.
- [110] C. Khosla *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, (1), 219-253.
- [111] M. C. Wilson und B.S. Moore, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, (1), 72-86.
- [112] S. Moet *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 133, (4), 976-985.
- [113] N. Quade *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, (1), 117-124.
- [114] I. Koryakina und G.J. Williams, *ChemBioChem.* **2011**, 12, (15), 2289-2293.
- [115] J. A. Hughes und A. Keatinge-Clay, *Chem. Biol.*, **2011**, 18, (2), 165-176.
- [116] D. L. Stassi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, 95, (13), 7305-7309.
- [117] J. Lau *et al.*, *Biochemistry*, **1999**, 38, (5), 1643-1651.
- [118] M. Oliynyk *et al.*, *Chem. Biol.* **1996**, 3, (10), 833-839.
- [119] L. B. Pickens, Y. Tang und Y.-H. Chooi, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2011**, 2, (1), 211-236.
- [120] C. P. Ridley, H.Y. Lee und C. Khosla, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, (12), 4595-4600.
- [121] M. Hanset *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, (18), 5366-5374.
- [122] C. D. Reeves *et al.*, *Biochemistry*, **2001**, 40, (51), 15464-15470.
- [123] H. L. Conurso und S.D. Bruner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, 16, (1-2), 162-169.
- [124] B. Wilkinson *et al.*, *Chem. Biol.* **2000**, 7, (2), 111-117.
- [125] J. He, und C. Hertweck, *Chem. Biol.* **2003**, 10, (12), 1225-1232.
- [126] Y. Xue und D.H. Sherman, *Nature*, **2000**, 403, (6769), 571-575.
- [127] B. J. Becket *et al.*, *Chem. Biol.* **2002**, 9, (5), 575-583.

- [128] S. J. Moss, C.J. Martin und B. Wilkinson, *Nat. Prod. Rep.***2004**, 21, (5), 575-593.
- [129] Y.-Q. Cheng, G.-L. Tang und B. Shen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***2003**, 100, (6), 3149-3154.
- [130] J. Moldenhauer *et al.*, *Angew.Chem. Int. Ed.***2007**, 46, (43), 8195-8197.
- [131] T. Nguyen *et al.*, *Nat.Biotech.***2008**, 26, (2), 225-233.
- [132] M. T. Reetz, und K. E. Jaeger, *Chem. Eur. J.***2000**, 6,(3), 407-412.
- [133] C. Jäckel, P. Kast und D. Hilvert, *Annu.Rev. Biophys.***2008**, 37, (1), 153-173.
- [134] M. T. Reetz, *Angew. Chem.***2011**, 123, (1), 144-182.
- [135] J. C. Jewett und C.R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.***2010**, 39, (4), 1272-1279.
- [136] J. C. Jewett, E.M. Sletten und C.R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.***2010**, 132, (11), 3688-3690.
- [137] N. J. Agard, *et al.*, *ACS Chemical Biology*, **2006**, 1, (10), 644-648.
- [138] J. M. Baskin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***2007**, 104, (43), 16793-16797.
- [139] F. Wolbers *et al.*, *Electrophoresis*, **2006**, 27, (24), 5073-5080.
- [140] V. V. Rostovtsev *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.***2002**, 41, (14), 2596-2599.
- [141] C. W. Tornøe, C. Christensen und M. Meldal, *J. Org. Chem.***2002**, 67, (9), 3057-3064.
- [142] C. Uttamapinant *et al.*, *Angew.Chem. Int. Ed.***2012**, 51, (24), 5852-5856.
- [143] G. Yang *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.***2010**, 132, (30), 10570-10577.
- [144] A. T. Wright, J. D. Song und B.F. Cravatt, *J. Am.Chem. Soc.*, **2009**, 131, (30), 10692-10700.
- [145] H. J. Yoon, *et al.*, *Org. Biomol.Chem.***2011**, 9, (9), 3530-3540.
- [146] A. B. Neef und C. Schultz, *Angew.Chem. Int. Ed.***2009**, 48, (8), 1498-1500.
- [147] T. Plass *et al.*, *Angew.Chem. Int. Ed.***2011**, 50, (17), 3878-3881.
- [148] E. Koller und O. Wolfbeis, *Monatshette für Chemie*, **1985**, 116, (1), 65-75.
- [149] C. B. Reese und A. Shaw, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92, (8), 2566-2568.
- [150] C.B Reese und A. Shaw, *J. Chem. Soc. D: Chemical Communications*, **1970**, (20), 1365-1366.
- [151] C. B. Reese und A. Shaw, *J. Chem. Soc. Perkin Transactions 1*, **1975**, (23), 2422-2435.
- [152] C. B. Reese und A. Shaw, *J. Chem. Soc. Perkin Transactions 1*, **1976**, (8), 890-898.
- [153] H. J. J. Loozen, J.W. De Haan und H.M. Buck, *J. Org. Chem.***1977**, 42, (3), 418-422.
- [154] S. Mizukami, S. *et al.*, *J. Am.Chem. Soc.***2009**, 131, (14), 5016-5017.
- [155] R. Weinstain *et al.*, *Chem.Comm.*, **2010**, 46, (4), 553-555.
- [156] C. Nöcker, Masterarbeit, *Synthetische Hilfsmittel für biosynthetische Untersuchungen*, **2012**, TU Dortmund.
- [157] P. Portonovoet *et al.*, *Tetrahedron*, **2000**, 56, (23), 3687-3690.
- [158] S. Klopries, U. Sundermann und F. Schulz, *Beilstein J. Org. Chem.***2013**, 9, 664-674.

- [159] K. I. Arnstadt, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **1976**, (5), 843-847.
- [160] K. I. Arnstadt, G. Schindlbeck und F. Lynen, *Eur. J. Biochem.***1975**, 55, 561-571.
- [161] Y. K. Kang, und S.J. Han, *J. Phys. Chem. B.*, **1997**, 101, 7001-7006.
- [162] W. W. Miller, und J.H. Richards, *Biochem. Biophys. Res. Commun.***1968**, 33, 569-73.
- [163] J. Stubbe, S. Fishund R.H. Abeles, *J. Biol.Chem.***1980**, 255, (1), 236-242.
- [164] B. J. Carroll *et al.*, *J. Am.Chem. Soc.***2002**, 124, (16), 4176-4177.
- [165] C. Khosla, J. Lauund N.L. Pohl, *Methods for making polyketides by replacement of ketosynthase and aminotransferase domains in polyketide synthases*, **2000**, Leland Stanford University, USA . S. 32 ff.
- [166] S. Murli, *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.***2005**, 71, 4503-4509.
- [167] N. L. Pohlet *et al.*, *J. Am.Chem. Soc.***1998**, 120, (43), 11206-11207.
- [168] M. T. Richardson *et al.*, *Metab. Eng.***1999**, 1, 180-187.
- [169] U. Sundermann *et al.*, *ACS Chem.Biol.***2012**, 8, (2), 443-450.
- [170] I. Koryakina *et al.*, *Org. Biomol. Chem.***2013**, 11, (27), 4449-4458.
- [171] J. Cortes *et al.*, *Nature*, **1990**, 348, (6297), 176-178.
- [172] A. Marsden *et al.*, *Science*, **1994**, 263, (5145), 378-380.
- [173] S. Donadio *et al.*, *Science*, **1991**, 252, (5006), 675-679.
- [174] L. Podiwin, Bachelorarbeit, *Synthese von Malonsäurederivaten für die Anwendung als nicht-kanonische Bausteine für die Mutasyntese von Polyketiden*, **2009**, TU Dortmund.
- [175] B, J. Carroll *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.***2002**, 124, (16), 4176-4177.
- [176] S. J. Mo *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.***2011**, 133, 976-985.
- [177]. M. Schmidt *et al.*, *J. Org.Chem.***2005**, 70, (9), 3737-3740.
- [178] R. Kaul *et al.*, *J. Org.Chem.***2004**, 69, (18), 6131-6133.
- [179] S. K. Singh *et al.*, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2008**, 4, 42.
- [180] W. A. Duetz *et al.*, *App.Environ. Microbiol.***2000**, 66, (6), 2641-2646.
- [181] S. Mo *et al.*, *J. Ind. Microbiol.Biotechnol.***2009**, 36, (12), 1473-1482.
- [182] A. C. Murphy, *Nat. Prod. Rep.*, **2011**, 28, (8), 1406-1425.
- [183] N. L. Pohl, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.***1998**, 120, 11206-11207.
- [184] B. Rigoet *et al.*, *Tetrahedron Lett.***1989**, 30, (23), 3073-3076.
- [185] M. B. Sassman, G. K. Surya Prakashund G.A. Olah, *Synthesis*, **1990**, (02), 104-106.
- [186] D. Magdziak *et al.*, *J. Am.Chem. Soc.***2005**, 127, (20), 7284-7285.
- [187] Piasecki, K.Shawn *et al.*, *Chem. Biol.*, **2011**, 18, (10), 1331-1340.
- [188] B. Hin, P. Majerund T. Tsukamoto, *J. Org.Chem.***2002**, 67, (21), 7365-7368.
- [189] R. K. Singh und S. Danishefsky, *J. Org.Chem.***1975**, 40, (20), 2969-2970.
- [190] D. M. Hrubowchak und F.X. Smith, *Tetrahedron Lett.***1983**, 24, (45), 4951-4954.

- [191] H. Petkovic *et al.*, *Fermentative preparation of tacrolimus using genetically modified Streptomyces*, *Lek Pharmaceuticals*, **2011**, S. 58ff.
- [192] F. P. Schmookund O.E. Polansky, *Monatshefte für Chemie*, **1969**, 100, (5), 1631-1639.
- [193] S. Danishefsky und R.K. Singh, *J. Am.Chem. Soc.***1975**, 97, (11), 3239-3241.
- [194] S. Danishefsky und R.K. Singh, *J. Org.Chem.***1975**, 40, (25), 3807-3808.
- [195] R. K. Singh, und S. Danishefsky, *J. Org.Chem.***1976**, 41, (9), 1668-1669.
- [196] H. McNab, *Chem. Soc. Rev.***1978**, 7, (3), 345-358.
- [197] L. J. Mathias, *Synthesis*, **1979**,(08), 561-576.
- [198] S. Fujs, *et al.*, *Novel polyketide compounds and methods of making same*, **2012**, Google Patents, WO 2012089349 A2
- [199] M. Ochiai *et al.*, *J. Chem. Soc.Chem. Comm.***1990**, 0, (2), 118-119.
- [200] D. FernándezGonzález, J.P. Brand und J. Waser, *Chem. Eur. J.***2010**, 16, (31), 9457-9461.
- [201] M. Khoukhi, M. Vaultier und R. Carrié, *Tetrahedron Lett.***1986**, 27, (9), 1031-1034.
- [202] J. Marquet *et al.*, *Tetrahedron Lett.***1988**, 29, (12), 1465-1468.
- [203] A. Vallribera *et al.*, *Tetrahedron*, **1993**, 49, (29), 6437-6450.
- [204] H. Morita, Y. Nakamura und S. Kawaguchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.***1972**, 45,(8), 2468-2472.
- [205] G. Stöckelmann, A. Kettrup und H. Specker, *Angew.Chem. Int. Ed.***1967**, 6, (6), 569-569.
- [206] G. R. Clemo und W.H. Perkin, *J. Chem. Soc. Transactions*, **1922**, 121, (0), 642-649.
- [207] R. Wiley und J. Moffat, *J. Org.Chem.***1957**, 22, (8), 995-996.
- [208] K. M Bonger *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.***2007**, 15, (14), 4841-4856.
- [209] P. Allevi, A. Longound M. Anastasia, *J. Labelled Compd. Radiopharm.***1999**, 42, (11), 1085-1091.
- [210] S. Perreault und C. Spino, *Org. Lett.***2006**, 8, (20), 4385-4388.
- [211] B. Sreedhar, P. Surendra Reddy und M. Madhavi, *Synth.Comm.***2007**, 37, (23), 4149-4156.
- [212] A. Deubel *et al.*, *Journal of Chromatography A*, **2006**, 1136, (1), 39-47.
- [213] S. Kille *et al.*, *Nat.Chem.***2011**, 3, (9), 738-743.
- [214] R. Blomberg *et al.*, *Nature*, **2013**, 503, (7476), 418-421.
- [215] P. A. Silver *et al.*, *Nature*, **2014**, 509, (7499), 166-167.
- [216] S. Dutta, *et al.*, *Nature*, **2014**, 510, (7506), 512-517.
- [217] A. L. Edwards *et al.*, *J. Mol. Biol.***2014**, 426, (11), 2229-2245.
- [218] J. R. Whicher *et al.*, *Nature*, **2014**, 510, (7506), 560-564.
- [219] K. Bravo-Rodriguez *et al.*, *ChemBioChem***2014**, 15, (13), 1991-1997.

- [220] A. Bhatt, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, (43), 7075-7078.
- [221] M. Pinkerton und L.K. Steinrauf, *J. Mol. Biol.* **1970**, 49, (3), 533-546.
- [222] A. Huczyński *et al.*, *Journal of Molecular Structure*, **2007**, 871, (1–3), 92-97.
- [223] A. Huczyński *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, **2012**, 1818, (9), 2108-2119.
- [224] H. H. Mollenhauer, D. James Morrèund L.D. Rowe, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, **1990**, 1031, (2), 225-246.
- [225] A. Huczyński *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18,(8), 2585-2589.
- [226] T. Matsuoka *et al.*, *Journal of Equine Veterinary Science*, **1996**, 16, (1), 8-15.
- [227] K. Tohda *et al.*, *Anal. Sci.*, **1990**, 6, (2), 227-232.
- [228] K. Toko, *Sens. Actuators, B*, **2000**, 64, (1–3), 205-215.
- [229] N. Kim *et al.*, *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, 20, (11), 2283-2291.
- [230] M. Oliynyk *et al.*, *Mol. Microbiol.* **2003**, 49, (5), 1179-1190.
- [231] W. Hüttel, J. B. Spencer und P.F. Leadlay, *BJOC*, **2014**, 10, 361-368.
- [232] N. P. Lopes *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2002**, 16, (5), 414-420.
- [233] S. Kushnir *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, (42), 10664-10669.
- [234] Y. Tang *et al.*, *Chem. Biol.*, **2007**, 14, (8), 931-943.
- [235] Y. Tang, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2006**, 103, (30), 11124-11129.
- [236] R. Breinbauer, R., I. R. Vetter und H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, 114, (16), 3002-3015.
- [237] H. Zhang *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, (1), 407-413.
- [238] S. A. Ismailet *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, (12), 942-949.
- [239] A. Chandra *et al.*, *Nat. Cell. Biol.* **2012**, 14, (3), 329-329.
- [240] J. Downward, *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, 3, (1), 11-22.
- [241] M. Malumbres und M. Barbacid, *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, 3, (6), 459-465.
- [242] M. H. Gelb *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, (10), 518-528.
- [243] P. J. Roberts und C.J. Der, *Oncogene*, **2007**, 26, (22) 3291-3310.
- [244] N. Berndt, A.D. Hamilton und S.M. Sebti, *Nat. Rev. Cancer*, **2011**, 11, (11), 775-791.
- [245] A. Patgiri *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, (9), 585-587.
- [246] T. Maurer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, 109, (14), 5299-5304.
- [247] Q. Sun *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, (25), 6140-6143.
- [248] G. Zimmermann *et al.*, *Nature*, **2013**, 497, 638-642.
- [249] C. Chidley *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, (6), 375-383.
- [250] A. Reza Hajipour, I. Mohammadpoor-Baltork und M. Bigdeli, *J. Chem. Res. Synop.*, **1999**, (9), 570-571.
- [251] G. Wittig, und U. Schöllkopf, *Chem. Ber.*, **1954**, 87,(9), 1318-1330.
- [252] G. Wittig und W. Haag, *Chem. Ber.* **1955**, 88, (11), 1654-1666.

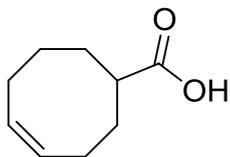
- [253] B. E. Maryanoff und A.B. Reitz, *Chem. Rev.***1989**, 89, (4), 863-927.
- [254] R. W. Hoffmann, *Angew.Chem. Int. Ed.***2001**, 40, (8), 1411-1416.
- [255] A., Maercker, A., *The Wittig Reaction in Organic Reactions*, **2004**, John Wiley & Sons, Inc., DOI: 10.1002/0471264180.or014.03.
- [256] W. S. Wadsworth, *Synthetic Applications of Phosphoryl-Stabilized Anions in Organic Reactions*, **2004**, John Wiley & Sons, Inc., DOI: 10.1002/0471264180.or025.02.
- [257] L. Horner, H. Hoffmann und H.G. Wippel, *Chem. Ber.***1958**, 91, (1), 61-63.
- [258] L. Horner *et al.*, *Chem. Ber.*, **1959**, 92, (10), 2499-2505.
- [259] W. S. Wadsworth und W.D. Emmons, *J. Am.Chem. Soc.*, **1961**, 83, (7), 1733-1738.
- [260] J. Boutagy und R. Thomas, *Chem. Rev.*, **1974**, 74, (1), 87-99.
- [261] M. A. Blanchette *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, (21), 2183-2186.
- [262] M. W. Rathke und M. Nowak, *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, (15), 2624-2626.
- [263] I. Paterson, K.-S. Yeung und J.B. Smaill, *Synlett*, **1993**, (10), 774-776.
- [264] D. Simoni *et al.*, *Org.Lett.*, **2000**, 2, (24), 3765-3768.
- [265] L. K. Blasdel und A.G. Myers, *Org. Lett.*, **2005**, 7, (19), 4281-4283.
- [266] J. Arens, Masterarbeit, *Heterologe Fermentation eines 5-8-5 Diterpens*, **2011**, TU Dortmund.
- [267] J. Arens *et al.*, *Chem. Comm.*, **2013**, 49, (39), 4337-4339.
- [268] G. S. Muromtsev *et al.*, *J. Plant Growth Regul.***1994**, 13, (1), 39-49.
- [269] A. Ballio *et al.*, *Nature*, **1964**, 203, (4942), 297-297.
- [270] T. Sassa, T. Tojyo, und K. Munakata, *Nature*, **1970**, 227, (5256), 379-379.
- [271] S. L. MacKinnon, P. Keifer und W.A. Ayer, *Phytochemistry*, **1999**, 51, (2), 215-221.
- [272] T. Toyomasu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.***2007**, 104, (9), 3084-3088.
- [273] A. Minami *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, (3), 870-874.
- [274] K. D. Barrow *et al.*, *J. Chem. Soc. C: Organic*, **1971**, (0), 1265-1274.
- [275] K. D Barrow *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1973**, (0), 1590-1599.
- [276] E. B. Chain, P.G. Mantle und B.V. Milborrow, *Physiol. Plant Pathol.***1971**, 1, (4), 495-514.
- [277] I. J. de Vries-van Leeuwen *et al.*, *Cancer Lett.*, **2010**, 293, (2), 198-206.
- [278] Y. Honma *et al.*, *Gynecologic Oncology*, **2005**, 99, (3), 680-688.
- [279] Y. Honma *et al.*, *Cancer Research*, **2003**, 63, (13), 3659-3666.
- [280] T. Kasukabe *et al.*, *Breast Cancer Research*, **2005**, 7, (6), R1097-R1110.
- [281] Y. Honma *et al.*, *Leukemia Research*, **2003**, 27, (11), 1019-1025.
- [282] Y. Ono *et al.*, *J. Am.Chem. Soc.***2011**, 133, (8), 2548-2555.
- [283] N. Kato, H. Okamoto und H. Takeshita, *Tetrahedron*, **1996**, 52, (11), 3921-3932.
- [284] A. Mendoza, Y. Ishihara und P.S. Baran, *Nat.Chem.*, **2012**, 4, (1), 21-25.
- [285] N. Kato *et al.*, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1998**, (16), 2473-2474.

- [286] D. K. Ro *et al.*, *Nature*, **2006**, 440, (7086), 940-943.
- [287] P. J. Westfall *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, 109, (3), E111-E118.
- [288] J. R. Anthony *et al.*, *Metab. Eng.* **2009**, 11, (1), 13-19.
- [289] J. Y. Wach und K. Gademann, *Synlett*, **2012**, (02), 163-170.
- [290] M. Würtele *et al.*, *EMBO*, **2003**, 22, 987-994.
- [291] A. Evidente *et al.*, *Phytochemistry*, **2006**, 67, (1), 19-26.
- [292] C. Piniet *et al.*, *Plant Sci. Lett.* **1979**, 16, (2-3), 343-353.
- [293] A. Ballio *et al.*, *Physiol. Plant.* **1981**, 52, (4), 471-475.
- [294] A. Ballio, R. Federico und D. Scalorbi, *Physiol. Plant.* **1981**, 52, (4), 476-481.
- [295] A. Ballio *et al.*, *Phytochemistry*, **1991**, 30, (1), 137-146.
- [296] T. Dairi *et al.*, **2013**, Google Patents, WO2013031975.
- [297] E. N. Trachtenberg und J.R. Carver, *J. Org. Chem.* **1970**, 35, (5), 1646-1653.
- [298] K. B. Sharpless und R.F. Lauer, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, (20), 7154-7155.
- [299] H. P Jensen und K.B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1975**, 40, (2), 264-265.
- [300] M. A. Warpehoski, B. Chabaud und K.B. Sharpless, *J. Org. Chem.* **1982**, 47, (15), 2897-2900.
- [301] M. A Umbreit und K.B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, (16), 5526-5528.
- [302] K. Shibuya, *Synth. Commun.*, **1994**, 24, (20), 2923-2941.
- [303] L. Jørgensen *et al.*, *Science*, **2013**, 341, (6148), 878-882.
- [304] H. C. Brown und P. Geoghegan, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, (6), 1522-1524.
- [305] H. C. Brown, J.H. Kawakami und S. Ikegami, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, (6), 1525-1526.
- [306] K. B. Wiberg und S.D. Nielsen, *J. Org. Chem.*, **1964**, 29, (11), 3353-3361.
- [307] Z. Rappoport *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **1965**, 6, (42), 3719-3728.
- [308] Z. Rappoport, S. Winstein und W.G. Young, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, (7), 2320-2329.
- [309] Z. G. Isaeva *et al.*, *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of chemical science*, **1986**, 35, (9), 1947-1949.
- [310] J. A. R. Salvador und J.H. Clark, *Chem. Comm.*, **2001**, (1), 33-34.
- [311] T. K. M. Shing, Yeung und P.L. Su, *Org. Lett.*, **2006**, 8, (14), 3149-3151.
- [312] W. G Dauben, M. E. Lorber und D.S. Fullerton, *J. Org. Chem.* **1969**, 34, (11), 3587-3592.
- [313] E. J. Corey und J.W. Suggs, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 16, (31), 2647-2650.
- [314] C. Kao, L. Katz, und C. Khosla, *Science*, **1994**, 265, (5171), 509-512.
- [315] B. A. Pfeifer und C. Khosla, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2001**, 65, (1) 106-118.
- [316] R. J. Kazlauskas, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, (2), 195-201.
- [317] K. L. Morley und R.J. Kazlauskas, *Trends Biotechnol.* **2005**, 23, (5), 231-237.

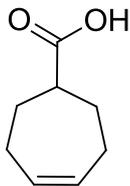
- [318] M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed.***2013**, 52, (10), 2658-2666.
- [319] Expansion infattynitrogenchemistry. *Chemical & Engineering News Archive*, **1964**, 42, (52), 6.
- [320] R. Haiges, und K.O. Christe, *Inorg. Chem.***2013**, 52, (12), 7249-7260.
- [321] L. Kisset *et al.*, *Tetrahedron*, **2008**, 64, (22), 5036-5043.
- [322] T. Nagata *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.***2009**, 17, (3), 1193-1206.
- [323] S. Fuchs, V. Berl und J.P. Lepoittevin, *Eur. J. Org. Chem.***2007**,(7) 1145-1152.
- [324] S. F. Martin, *et al.*, *J. Org. Chem.***1989**, 54, (9), 2209-2216.
- [325] O. Seitz und H. Kunz, *J. Org.Chem.***1997**, 62, (4), 813-826.
- [326] L. M. Hall, *Anal. Biochem.***1962**, 3, (1), 75-80.
- [327] Y. Liu, Z. Liund J.C. Vederas, *Tetrahedron*, **1998**, 54, (52), 15937-15958.
- [328] G. A Bihlmayeret *al.*, *Monatshefte für Chemie*, **1967**, 98, (3), 564-578.
- [329] M. Zia-Ebrahimi und G.W. Huffman, *Synthesis*, **1996**, (02), 215-218.
- [330] Y. Sun *et al.*, *Eur. J. Med. Chem.***2011**, 46, (10), 5146-5153.
- [331] R. E. Ford *et al.*, *J. Med.Chem.***1986**, 29, (4), 538-549.

10 Strukturverzeichnis

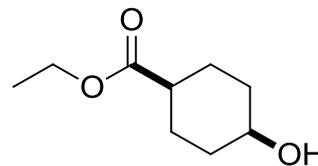
10.1 Rapamycin Starteinheiten



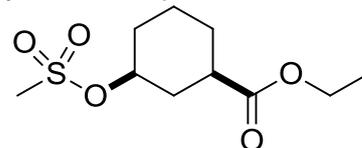
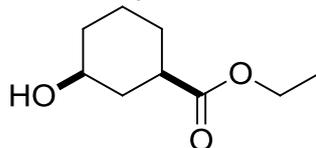
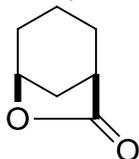
Verbindung: 52 (SK193)
Diskussion: Kap.4.2.3
Synthese: Kap.7.1



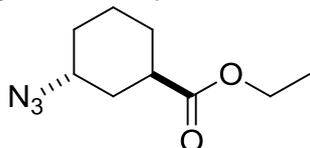
Verbindung: 51 (SK215)
Diskussion: Kap.4.2.3
Synthese: Kap.7.2



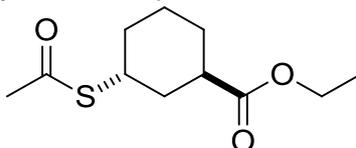
Verbindung: 29 (SK081)
Diskussion: Kap.4.2.3
Synthese: Kap.7.3



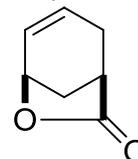
Verbindung: 33 (SK084)
Diskussion: Kap.4.2.3
Synthese: Kap.7.5.1



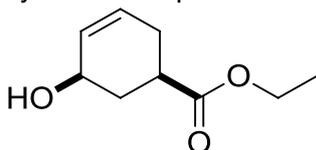
Verbindung: 34 (SK096)
Diskussion: Kap.4.2.3
Synthese: Kap.7.5.2



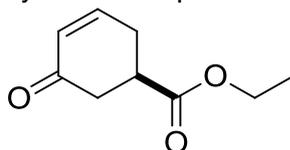
Verbindung: 35 (SK098)
Diskussion: Kap.4.2.3
Synthese: Kap.7.5.3



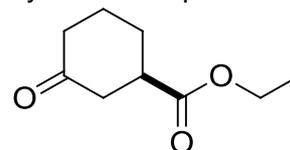
Verbindung: 37 (SK099)
Diskussion: Kap.4.2.3
Synthese: Kap.7.5.4



Verbindung: 36 (SK167)
Diskussion: Kap.4.2.3
Synthese: Kap.7.5.5



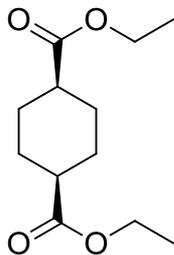
Verbindung: 30 (SK182)
Diskussion: 4.2.3
Synthese: Kap.7.6.1



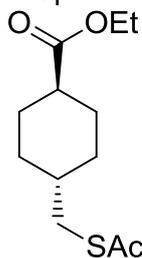
Verbindung: 31 (SK183)
Diskussion: Kap.4.2.3
Synthese: Kap.7.6.2

Verbindung: 32 (SK184)
Diskussion: Kap.4.2.3
Synthese: Kap.7.6.3

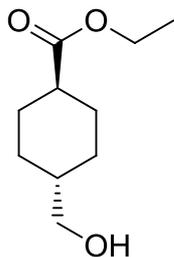
Verbindung: 41 (SK117)
Diskussion: Kap.4.2.3
Synthese: Kap.7.4



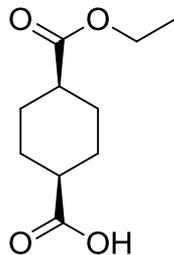
Verbindung: 43 (SK150)
 Diskussion: Kap.4.2.3
 Synthese: Kap.7.7.1



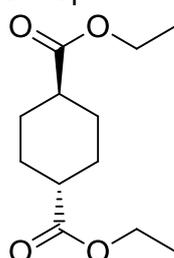
Verbindung: 49 (SK149)
 Diskussion: Kap.4.2.3
 Synthese: Kap.7.8.5



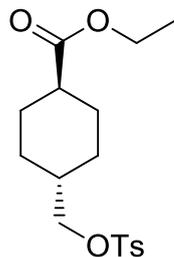
Verbindung: 47 (SK070)
 Diskussion: Kap.4.2.3
 Synthese: Kap.7.8.3



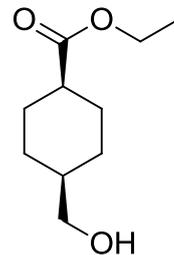
Verbindung: 45 (SK154)
 Diskussion: Kap.4.2.3
 Synthese: Kap.7.7.2



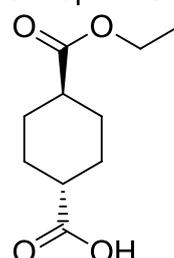
Verbindung: 42 (SK066)
 Diskussion: Kap.4.2.3
 Synthese: Kap.7.8.1



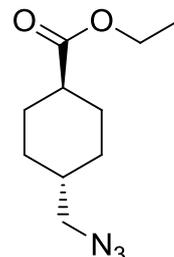
Verbindung: 48 (SK144)
 Diskussion: Kap.4.2.3
 Synthese: Kap.7.8.4



Verbindung: 47 (SK157)
 Diskussion: Kap.4.2.3
 Synthese: Kap.7.7.3

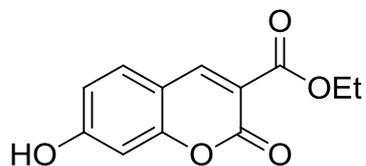


Verbindung: 44 (SK67)
 Diskussion: Kap.4.2.3
 Synthese: Kap.7.8.2

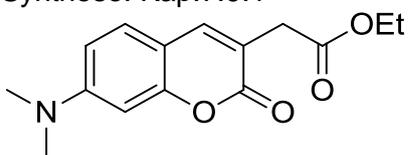


Verbindung: 50 (SK145)
 Diskussion: Kap.4.2.3
 Synthese: Kap.7.8.6

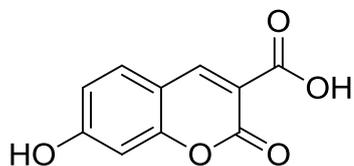
10.2 Cumarine



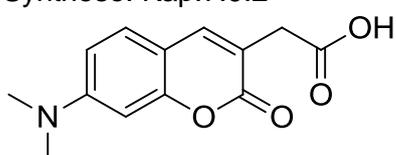
Verbindung: 75 (SK082)
 Diskussion: Kap.4.6.3
 Synthese: Kap.7.9.1



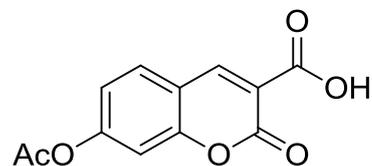
Verbindung: 215 (SK233)
 Diskussion: Kap.4.6.7
 Synthese: Kap.7.10.1



Verbindung: 70 (SK100)
 Diskussion: Kap.4.6.3
 Synthese: Kap.7.9.2

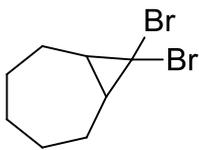


Verbindung: 89 (SK238)
 Diskussion: Kap.4.6.7
 Synthese: Kap.7.10.2

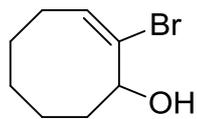


Verbindung: 76 (SK156)
 Diskussion: Kap.4.6.3
 Synthese: Kap.7.9.3

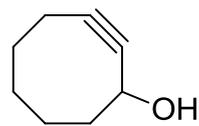
10.3 Cyclooctin



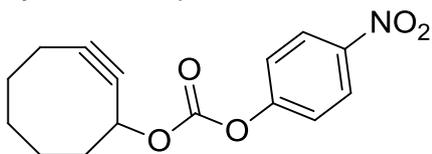
Verbindung: 77 (SK095)
Diskussion: Kap.4.6.4
Synthese: Kap.7.14.1



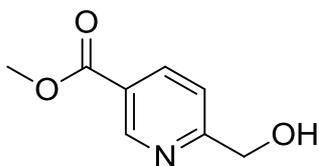
Verbindung: 78 (SK097)
Diskussion: Kap.4.6.4
Synthese: Kap.7.14.2



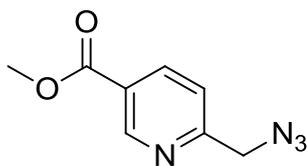
Verbindung: 72 (SK103)
Diskussion: Kap.4.6.4
Synthese: Kap.7.14.3



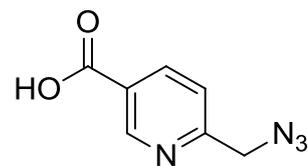
Verbindung: 92 (SK342)
Diskussion: Kap.4.6.8
Synthese: Kap.7.14.4

10.4 Nicotinsäureazid

Verbindung: 100 (SK211)
Diskussion: Kap.4.6.10
Synthese: Kap.7.11.1

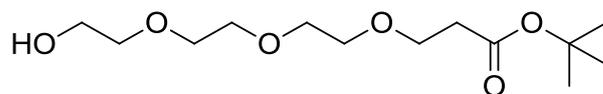


Verbindung: 102 (SK277)
Diskussion: Kap.4.6.10
Synthese: Kap.7.11.2



Verbindung: 98 (SK306)
Diskussion: Kap.4.6.10
Synthese: Kap.7.11.3

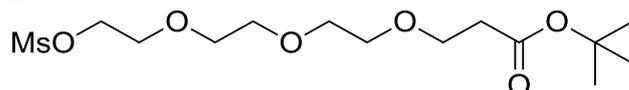
10.5 Linker



Verbindung: 80 (SK106)

Diskussion: Kap.4.6.5

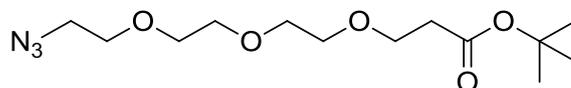
Synthese: Kap.7.12.1



Verbindung: 81 (SK105)

Diskussion: Kap.4.6.5

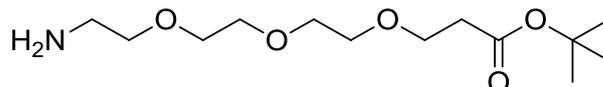
Synthese: Kap.7.12.2



Verbindung: 82 (SK104)

Diskussion: Kap.4.6.5

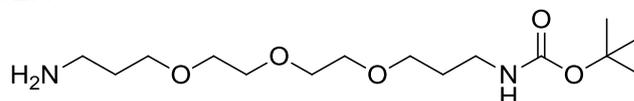
Synthese: Kap.7.12.3



Verbindung: 71 (SK101)

Diskussion: Kap.4.6.5

Synthese: Kap.7.12.4

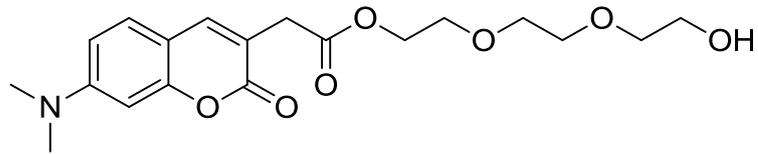


Verbindung: 90 (SK222)

Diskussion: Kap.4.6.8

Synthese: Kap.7.15.1

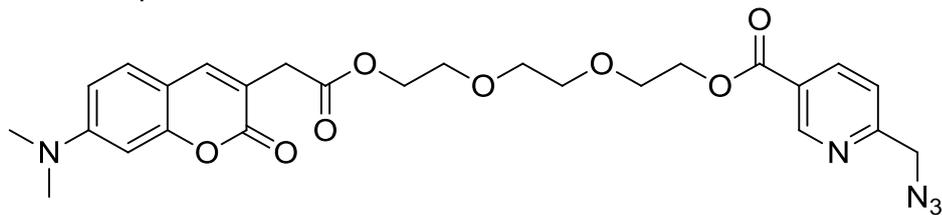
10.6 Reporter-molekül



Verbindung: 97 (SK295)

Diskussion: Kap.4.6.10

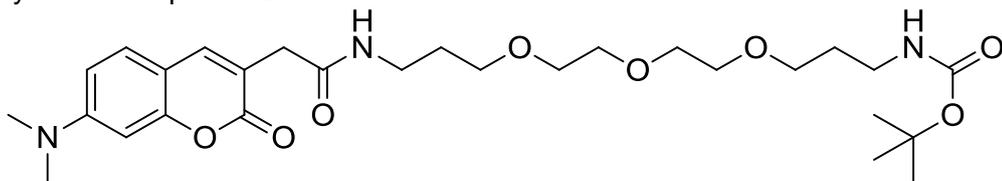
Synthese: Kap.7.13.1



Verbindung: 99 (SK307)

Diskussion: Kap.4.6.10

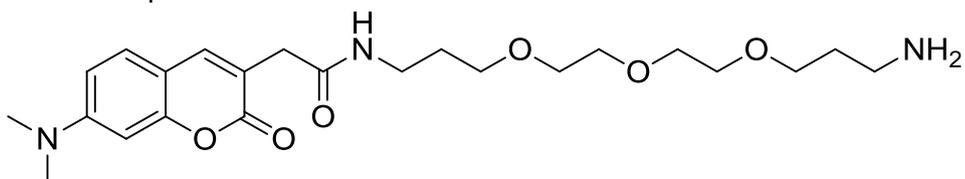
Synthese: Kap.7.13.2



Verbindung: 94 (SK325)

Diskussion: Kap.4.6.8

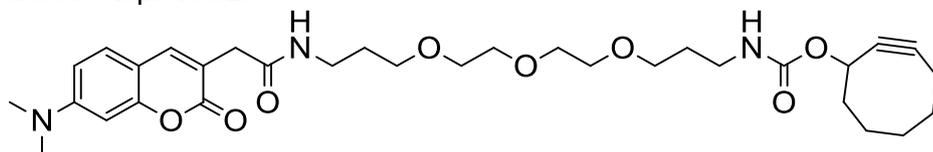
Synthese: Kap.7.15.1



Verbindung: 91 (SK249)

Diskussion: Kap.4.6.8

Synthese: Kap.7.15.2

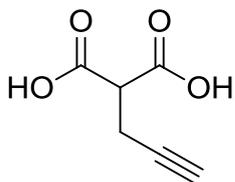


Verbindung: 93 (SK349)

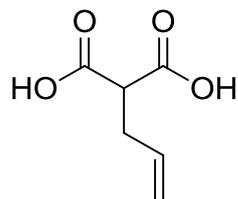
Diskussion: Kap.4.6.8

Synthese: Kap.7.15.3

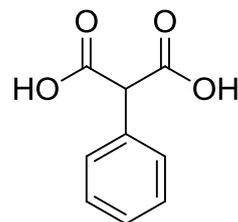
10.7 Malonsäurederivate



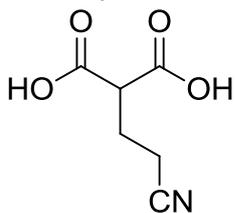
Verbindung: 116 (SK301)
Diskussion: Kap.4.7.2.3
Synthese: Kap.7.23



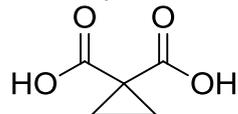
Verbindung: 118 (SK258)
Diskussion: Kap.4.7.2.3
Synthese: Kap.7.23



Verbindung: 122 (SK334)
Diskussion: Kap.4.7.2.3
Synthese: Kap.7.23

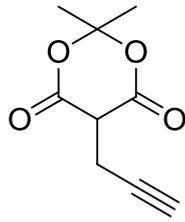


Verbindung: 160 (SK312)
Diskussion: Kap.4.7.2.6
Synthese: Kap.7.23

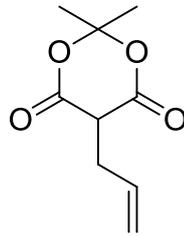


Verbindung: 155 (SK364)
Diskussion: Kap.4.7.2.6
Synthese: Kap.7.24

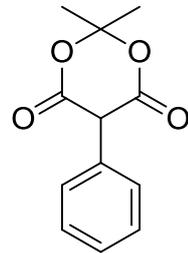
10.8 Meldrums Säurederivate



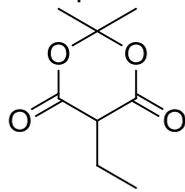
Verbindung: 117 (SK302)
 Diskussion: Kap.4.7.2.3
 Synthese: Kap.7.25



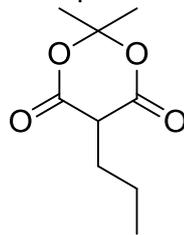
Verbindung: 119 (SK260)
 Diskussion: Kap.4.7.2.3
 Synthese: Kap.7.25



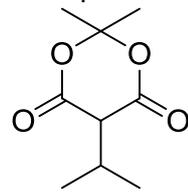
Verbindung: 123 (SK339)
 Diskussion: Kap.4.7.2.3
 Synthese: Kap.7.25



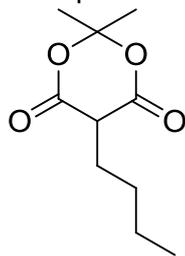
Verbindung: 126 (SK286)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.27



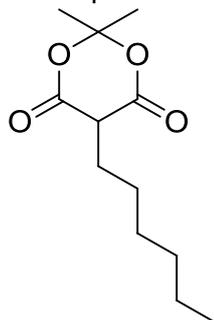
Verbindung: 127 (SK287)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.27



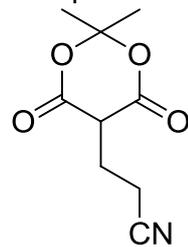
Verbindung: 128 (SK285)
 Diskussion: Kap. 4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.28



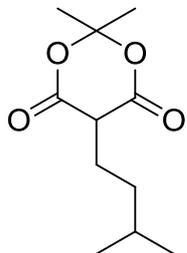
Verbindung: 129 (SK288)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.27



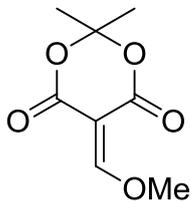
Verbindung: 130 (SK291)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.27



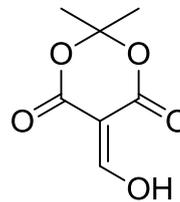
Verbindung: 161 (SK326)
 Diskussion: Kap.4.7.2.6
 Synthese: Kap.7.26



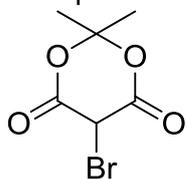
Verbindung: 131 (SK290)
Diskussion: Kap.4.7.2.4
Synthese: Kap.7.27



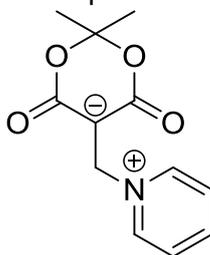
Verbindung: 229 (SK237)
Diskussion: -
Synthese: Kap.7.30.1



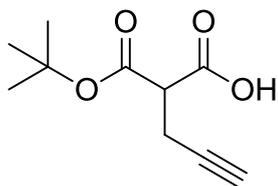
Verbindung: 230 (SK245)
Diskussion: -
Synthese: Kap.7.30.2



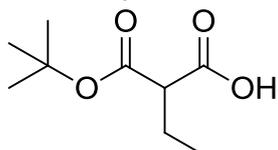
Verbindung: 178 (SK216)
Diskussion: Kap.4.7.2.6
Synthese: Kap.7.29



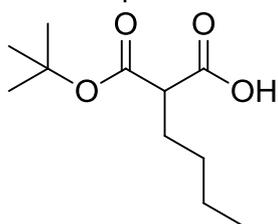
Verbindung: 231 (SK367)
Diskussion: -
Synthese: Kap.7.31

10.9 *Tert.*-Butylmalonsäurederivate

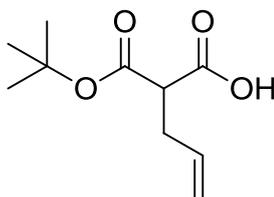
Verbindung: 107 (SK061)
 Diskussion: Kap.4.7.2.3
 Synthese: Kap.7.32



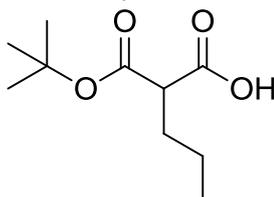
Verbindung: 132 (SK317)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.32



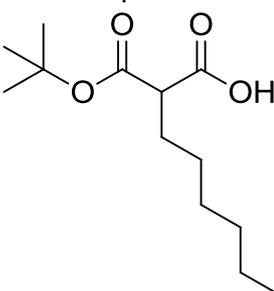
Verbindung: 135 (SK319)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.32



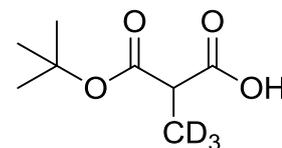
Verbindung: 122 (SK298)
 Diskussion: Kap.4.7.2.3
 Synthese: Kap.7.32



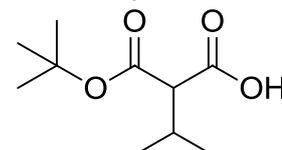
Verbindung: 133 (SK318)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.32



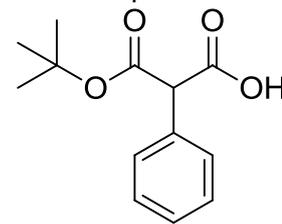
Verbindung: 136 (SK321)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.32



Verbindung: 105 (SK088)
 Diskussion: Kap.4.7.1.1
 Synthese: Kap.7.22.1

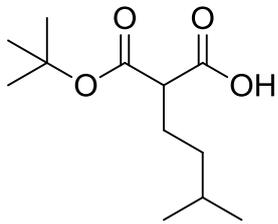


Verbindung: 134 (SK316)
 Diskussion: Kap.4.7.2.3
 Synthese: Kap.7.32

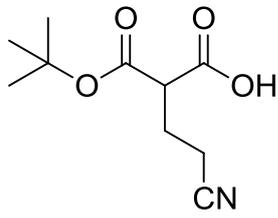


Verbindung: 124 (SK343)
 Diskussion: Kap.4.7.2.3
 Synthese: Kap.7.32

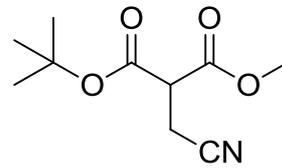
Strukturverzeichnis



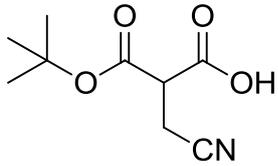
Verbindung: 143 (SK320)
Diskussion: Kap.4.7.2.4
Synthese: Kap.7.32



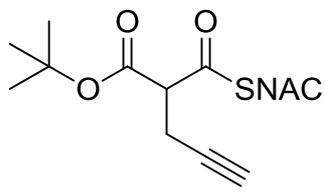
Verbindung: 162 (SK348)
Diskussion: Kap.4.7.2.6
Synthese: Kap.7.33



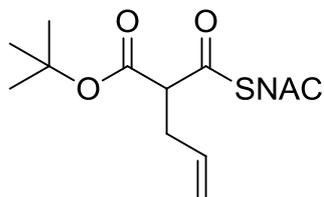
Verbindung: 151 (SK314)
Diskussion: Kap.4.7.2.6
Synthese: Kap.7.34.1



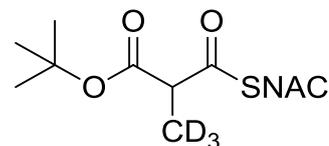
Verbindung: 152 (SK335)
Diskussion: Kap.4.7.2.6
Synthese: Kap.7.34.1

10.10 *Tert.*-Butylmalonsäure-SNACester

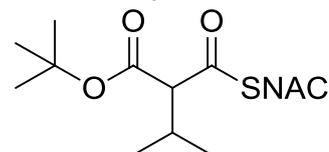
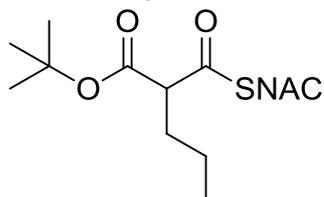
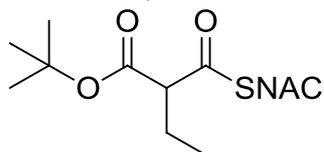
Verbindung: 108 (SK086)
 Diskussion: Kap.4.7.2.3
 Synthese: Kap.7.35



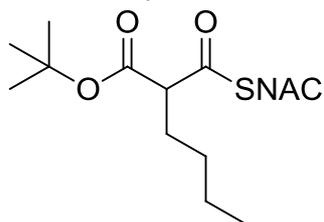
Verbindung: 121 (SK331)
 Diskussion: Kap.4.7.2.3
 Synthese: Kap.7.35



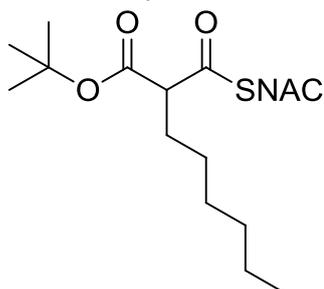
Verbindung: 106 (SK091)
 Diskussion: Kap.4.7.1.1
 Synthese: Kap.7.22.2



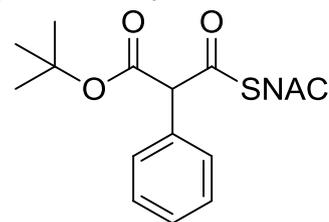
Verbindung: 138 (SK341)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.35



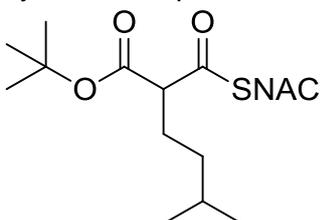
Verbindung: 139 (SK328)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.35



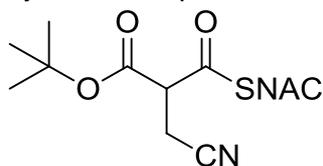
Verbindung: 140 (SK338)
 Diskussion: Kap.4.7.2.3
 Synthese: Kap.7.35



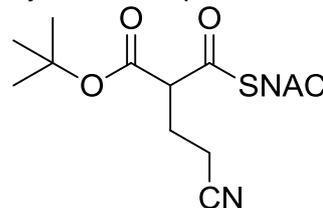
Verbindung: 141 (SK329)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.35



Verbindung: 142 (SK333)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.35



Verbindung: 125 (SK346)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.35

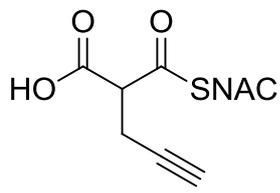


Verbindung: 143 (SK332)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.35

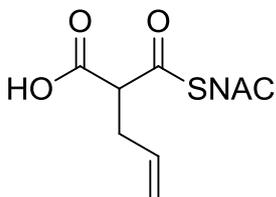
Verbindung: 153 (SK347)
 Diskussion: Kap.4.7.2.6
 Synthese: Kap.7.35

Verbindung: 163 (SK362)
 Diskussion: Kap.4.7.2.6
 Synthese: Kap.7.35

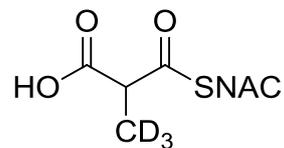
10.11 Malonsäure-SNACester



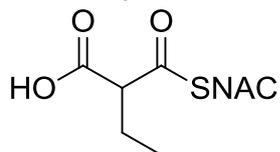
Verbindung: 109 (SK107)
 Diskussion: Kap.4.7.2.1
 Synthese: Kap.7.36



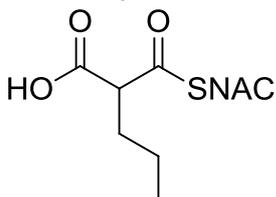
Verbindung: 144 (SK350)
 Diskussion: Kap.4.7.2.3
 Synthese: Kap.7.36



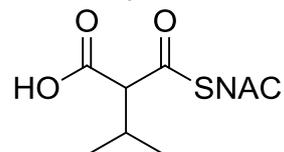
Verbindung: 103 (SK094)
 Diskussion: Kap.4.7.1.1
 Synthese: Kap.7.36



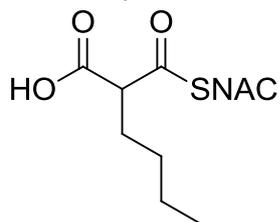
Verbindung: 145 (SK351)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.36



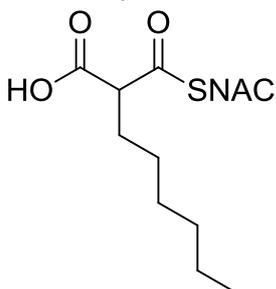
Verbindung: 146 (SK352)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.36



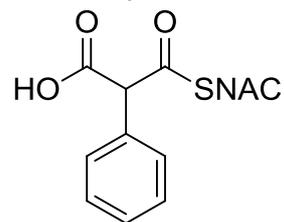
Verbindung: 147 (SK355)
 Diskussion: Kap.4.7.2.5
 Synthese: Kap.7.36



Verbindung: 148 (SK353)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.36

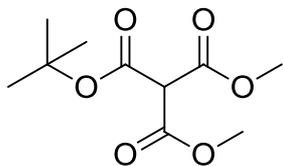


Verbindung: 149 (SK354)
 Diskussion: Kap.4.7.2.4
 Synthese: Kap.7.36

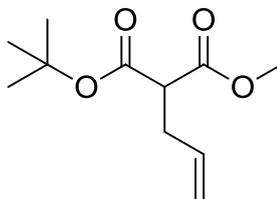


Verbindung: 150 (SK377)
 Diskussion: Kap.4.7.2.3
 Synthese: Kap.7.36

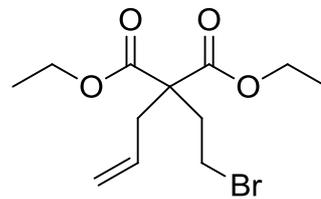
10.12 Andere Malonsäurederivate



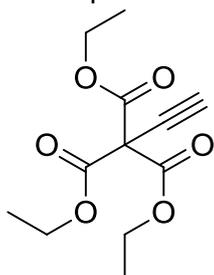
Verbindung: 169 (SK188)
 Diskussion: Kap.4.7.2.6
 Synthese: Kap.7.38



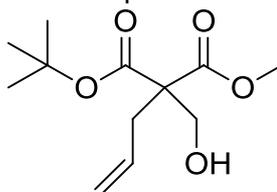
Verbindung: 173 (SK261)
 Diskussion: Kap.4.7.2.6
 Synthese: Kap.7.39.1



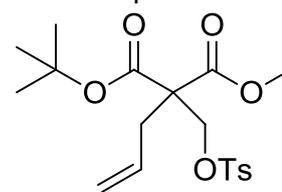
Verbindung: 233 (SK313)
 Diskussion: -
 Synthese: Kap.7.40



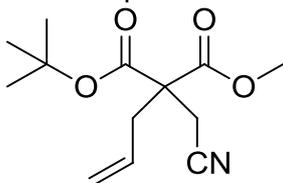
Verbindung: 166 (SK374)
 Diskussion: Kap.4.7.2.6
 Synthese: Kap.7.37



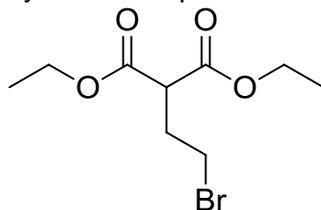
Verbindung: 174 (SK262)
 Diskussion: Kap.4.7.2.6
 Synthese: Kap.7.39.2



Verbindung: 175 (SK284)
 Diskussion: Kap.4.7.2.6
 Synthese: Kap.7.39.3

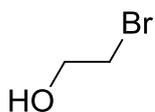


Verbindung: 232 (SK309)
 Diskussion: -
 Synthese: Kap.7.39.4

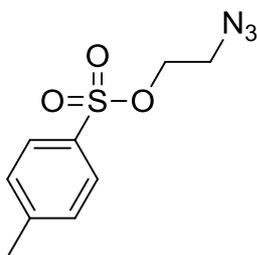


Verbindung: 234 (SK327)
 Diskussion: -
 Synthese: Kap.7.41

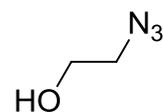
10.132-Bromethanolderivate und TMS-EBX



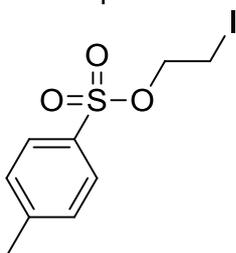
Verbindung: SK006
 Diskussion: Kap.4.7.2.6
 Synthese: Kap. 7.18.1



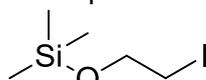
Verbindung: 224 (SK058)
 Diskussion: Kap.4.7.2.6
 Synthese: Kap. 7.18.2



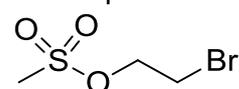
Verbindung: 223 (SK069)
 Diskussion: Kap.4.7.2.6
 Synthese: Kap. 7.18.3



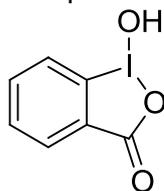
Verbindung: 227 (SK132)
 Diskussion: 4.7.2.6
 Synthese: Kap. 7.20



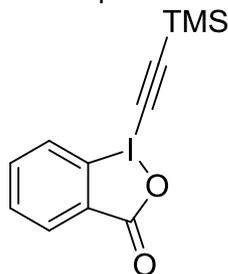
Verbindung: 228 (SK170)
 Diskussion: Kap. 4.7.2.6
 Synthese: Kap. 7.21



Verbindung: 226 (SK108)
 Diskussion: Kap.4.7.2.6
 Synthese: Kap. 7.19

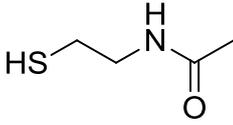


Verbindung: 216 (SK268)
 Diskussion: Kap.4.7.2.6
 Synthese: Kap.7.16.1

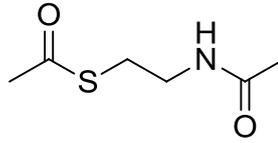


Verbindung: 217 (SK273)
 Diskussion: Kap.4.7.2.6
 Synthese: Kap.7.16.2

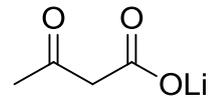
10.14 CoA-Mimetika



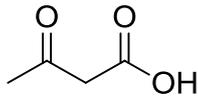
Verbindung: 218 (SK080)
 Diskussion: -
 Synthese: Kap.7.17.1



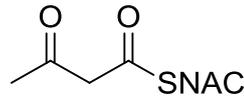
Verbindung: 219 (SK079)
 Diskussion: -
 Synthese: Kap.7.17.2



Verbindung: 220 (SK440)
 Diskussion: -
 Synthese: Kap.7.17.3.1

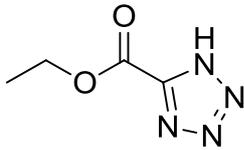


Verbindung: 221
 Diskussion: -
 Synthese: Kap.7.17.3.2

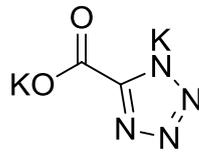


Verbindung: 228 (SK441)
 Diskussion: -
 Synthese: Kap.7.17.3.3

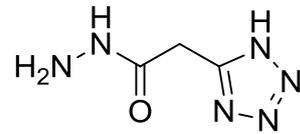
10.15 Tetrazole



Verbindung: 235 (SK366)
Diskussion: -
Synthese: Kap. 7.43

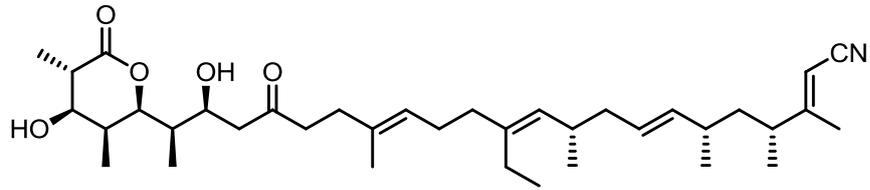


Verbindung: 236 (SK413)
Diskussion: -
Synthese: Kap. 7.44



Verbindung: 192 (SK434)
Diskussion: -
Synthese: Kap. 7.42

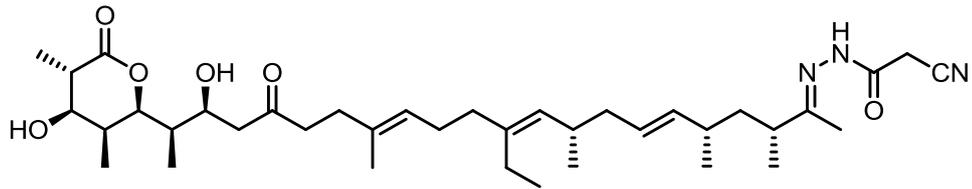
10.16 Testreaktionen Premonensinderivate



Verbindung: 195 (SK404)

Diskussion: Kap.4.9.1

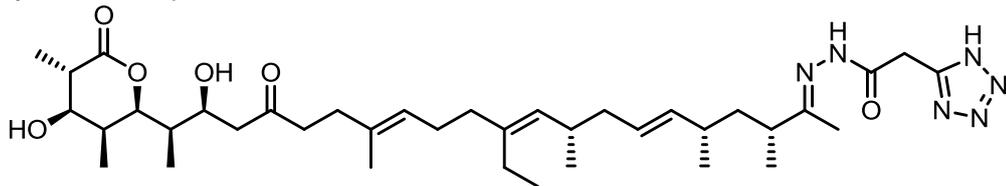
Synthese: Kap.7.45.1



Verbindung: 191 (SK405)

Diskussion: Kap.4.9.1

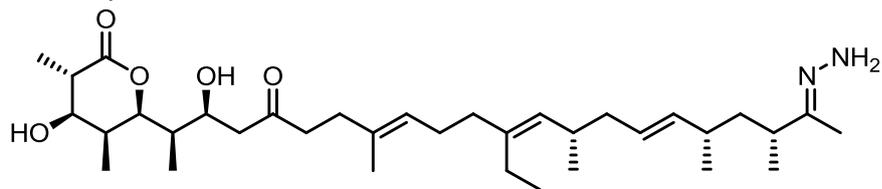
Synthese: Kap.7.45.2



Verbindung: 192 (SK411)

Diskussion: Kap.7.45.3

Synthese: Kap.



Verbindung: 195

Diskussion: -

Synthese: Kap.7.45.4

Eidesstattliche Erklärung

11 Eidesstattliche Erklärung

Klopries, Stephan

0118844

Name, Vorname

Matr.-Nr.

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „**Neue Methoden zur synthetischen und mikrobiellen Naturstoffderivatisierung**“ selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erbracht habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Kirchhellen, den 08.10.2014

Stephan Klopries

Ort, Datum

Unterschrift

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt und/oder eine falsche eidesstattliche Versicherung abgibt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden. (§ 63 Abs. 5 Hochschulgesetz - HG -)

Die Technische Universität Dortmund wird gfls. elektronische Vergleichswerkzeuge (wie z.B. die Software „turnitin“) zur Überprüfung von Ordnungswidrigkeiten in Prüfungsverfahren nutzen.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Kirchhellen, den 08.10.2014

Stephan Klopries

Ort, Datum

Unterschrift

12 Curriculum vitae

Persönliches

Geburtsdatum/ort: 18.11.1984 in Dorsten

Nationalität: deutsch

Methoden und Kenntnisse

Präparative Synthese kleiner Moleküle verschiedener Substanzklassen (Aminosäuren und Peptide, Fluorophore als Reportermoleküle, Polyketidfragmente); Partialsynthese von Naturstoffderivaten (Polyketide und Terpenoide); Isolation von Naturstoffen aus mikrobiellen Fermentationen; Strukturaufklärung und Charakterisierung von Naturstoffen und ihren Derivaten.

Ausbildung

- 11/2010 – 10/2014 Doktorarbeit, Thema: *Chemische und biosynthetische Derivatisierung polyketidischer und terpenoider Naturstoffe*; Max Planck Institut für Molekulare Physiologie und Technische Universität Dortmund, seit 2013: Ruhr-Universität Bochum. Betreuer: Prof. Dr. Frank Schulz.
- 03/2010 – 07/2010 Masterarbeit, Titel: *Die Synthese von Bausteinen für die Mutasynthese neuer Rapamycin-Analoga*; Max Planck Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund. Betreuer: Prof. Dr. F. Schulz
- 09/2008 – 07/2010 Technische Universität Dortmund, Studium der Chemischen Biologie
Abschluss: Master of Science
- 04/2008 – 09/2008 Bachelorarbeit; Titel: *Beiträge zur Synthese des Depsipeptids RA-VII*
Max Planck Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund.
Betreuer: Prof. Dr. Hans-Dieter Arndt
- 10/2005 – 09/2008 Technische Universität Dortmund, Studium der Chemischen Biologie
Abschluss: Bachelor of Science
- 06/2004 Abitur am Heisenberg-Gymnasium, Gladbeck.

13 Anhang

13.1 Fragmentierungsmuster

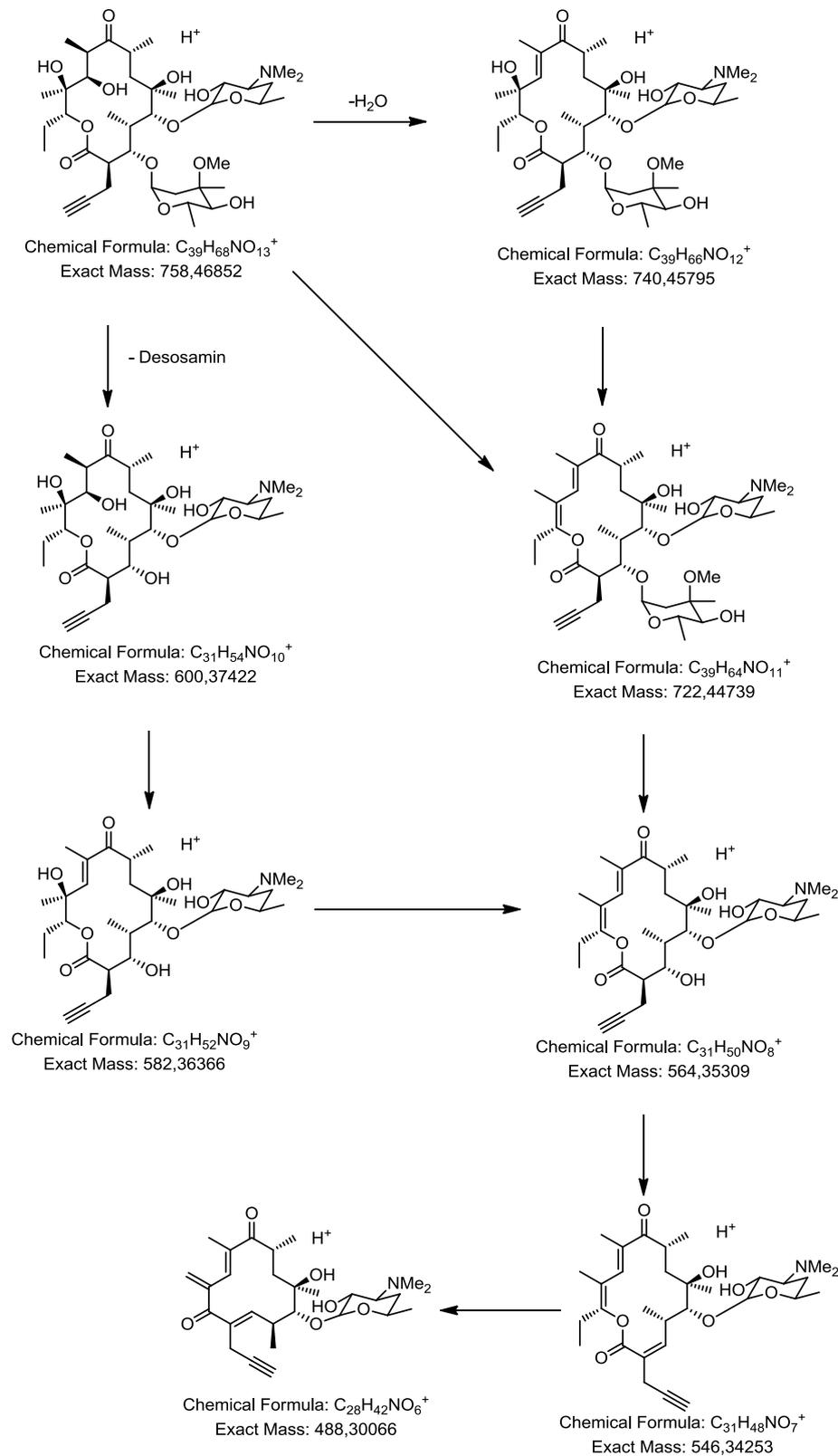
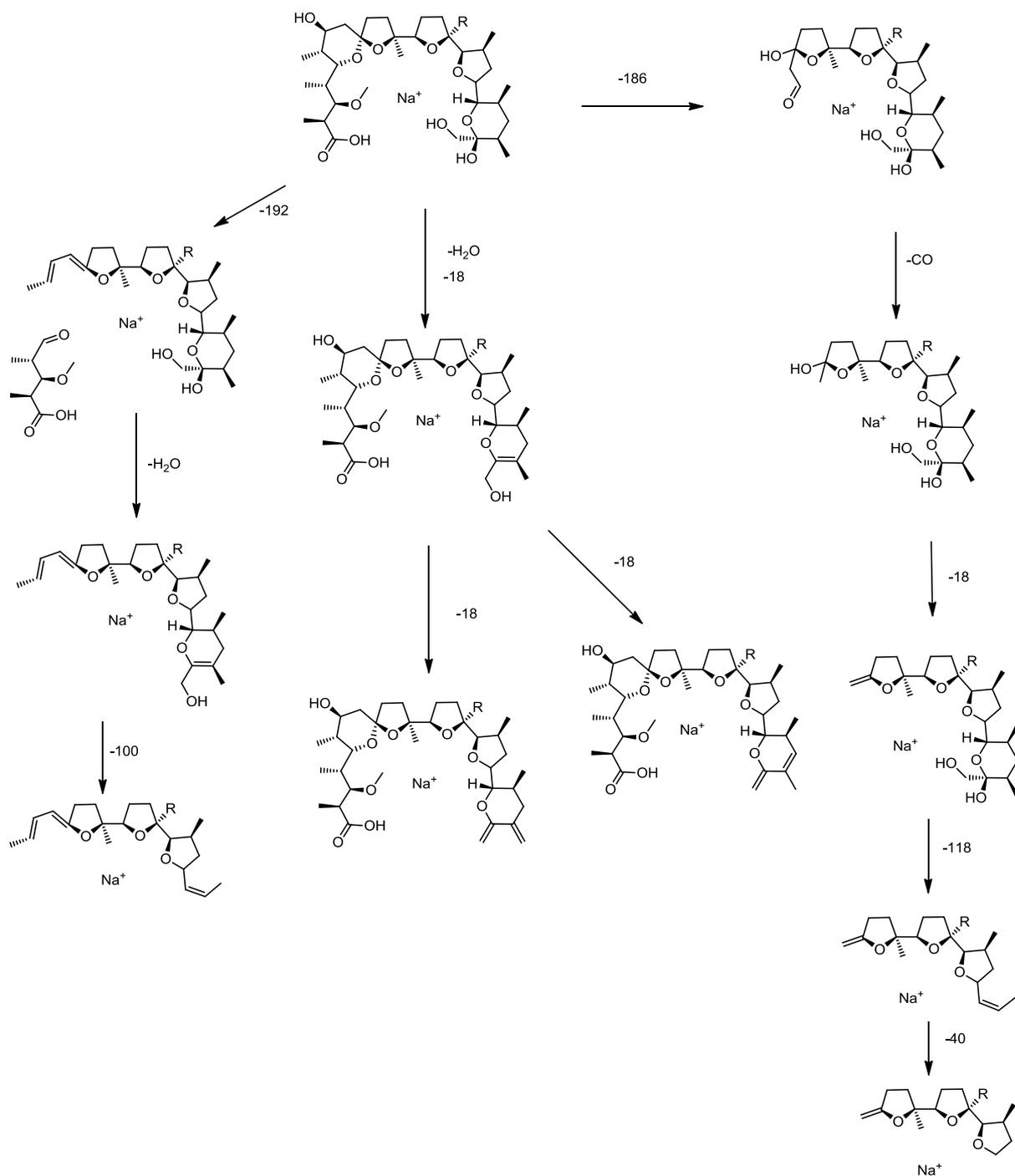
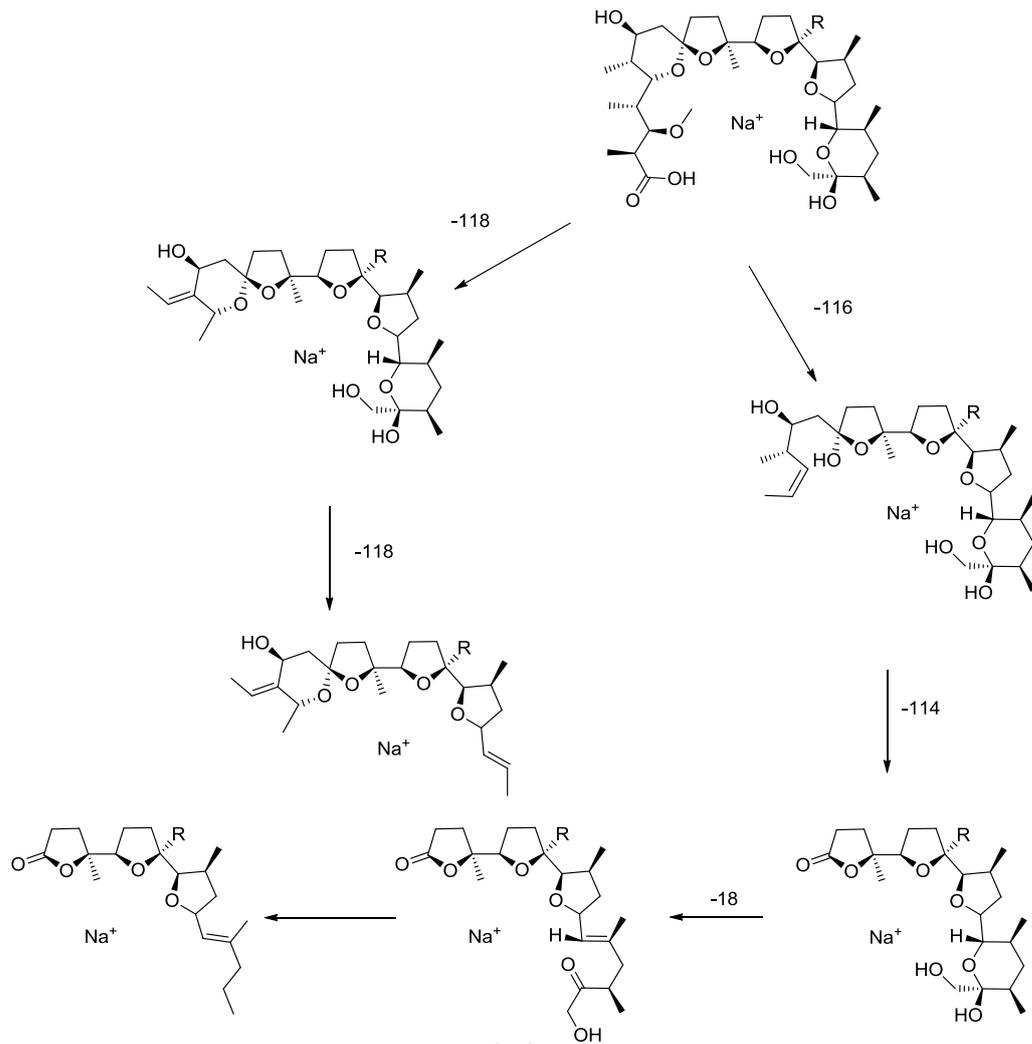
13.1.1 Fragmentierungsmuster von Propargylerythromycin^[212]

Abbildung 56: MS/MS-Fragmentierung von 2-Propargylerythromycin analog zu dem Fragmentierungsmuster von Erythromycin.^[212]

13.1.2 Fragmentierungsmuster von Monensinderivaten^[232]

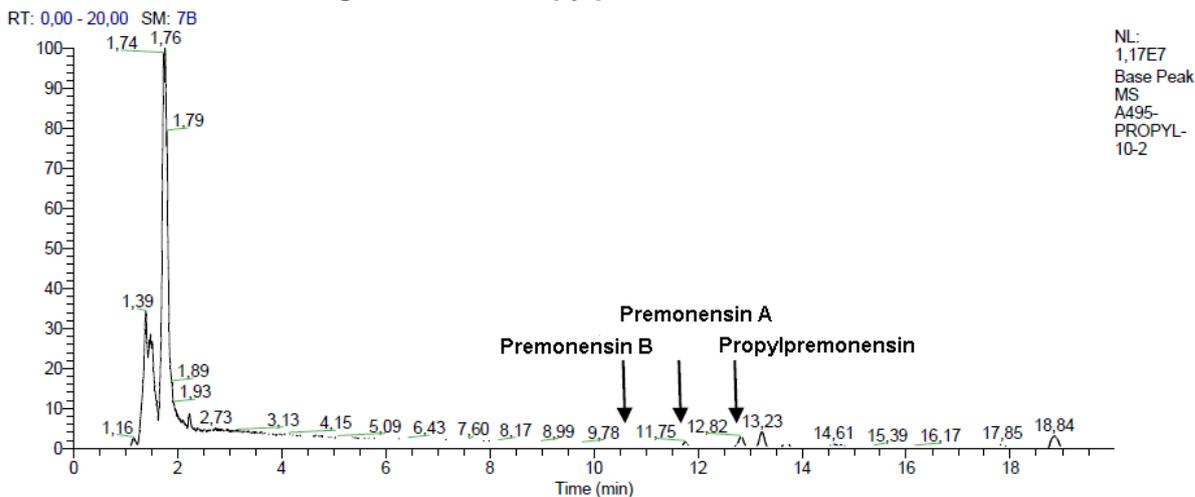
Schema 76: Monensinfragmentierungsmuster.^[232] Der Rest R steht hier für Propyl, Allyl und Propargyl.



Schema 77: Monensinfragmentierungsmuster.^[232] Der Rest R steht hier für Propyl, Allyl und Propargyl.

13.2 LC-ESI-MS-Chromatogramme der Verbindungen

13.2.1 LC-MS-Chromatogramm von Propylpremonensin



A495-PROPYL-10-2 #3846 RT: 12.84 AV: 1 NL: 3,22E5
T: ITMS + c ESI Full ms [150,00-2000,00]

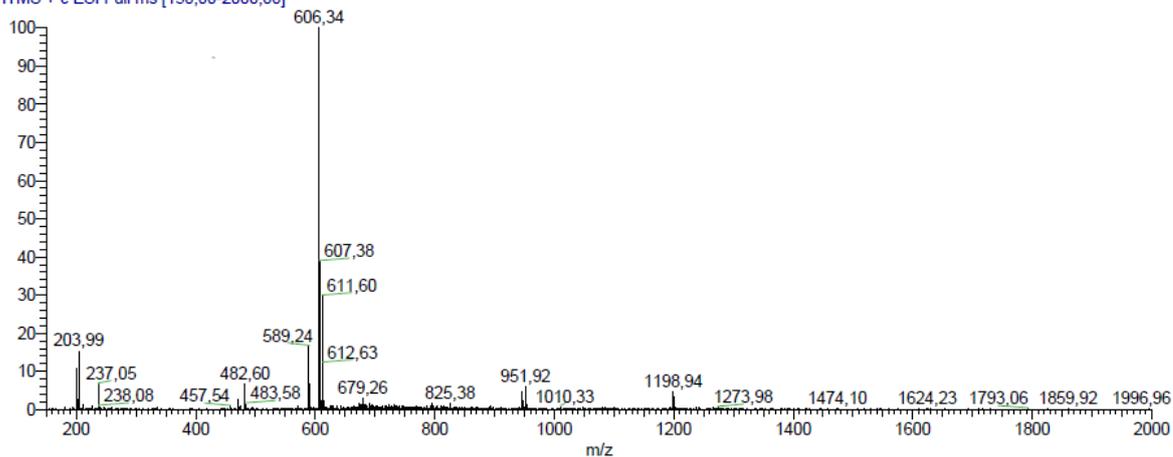


Abbildung 57: ESI-MS-Spektrum von Propylpremonensin. Zusehen ist der Basepeak des Fermentationsextraktes. Die Massenspur zeigt Propylpremonensin als m/z : 589 $[M+H]^+$, 606 $[M+NH_4]^+$, 611 $[M+Na]^+$.

13.2.2 LC-MS-Chromatogramm von Butylpremonensin

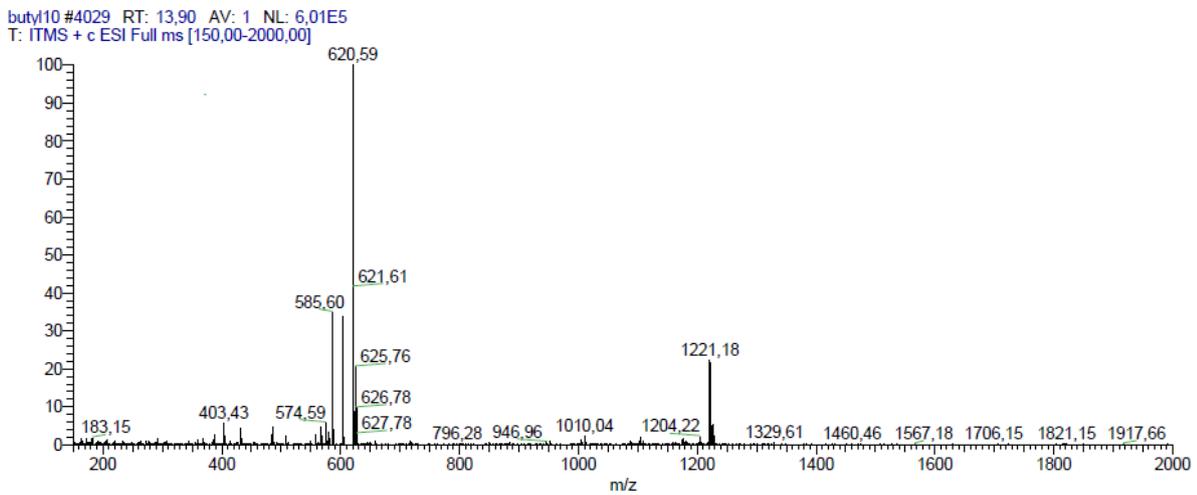
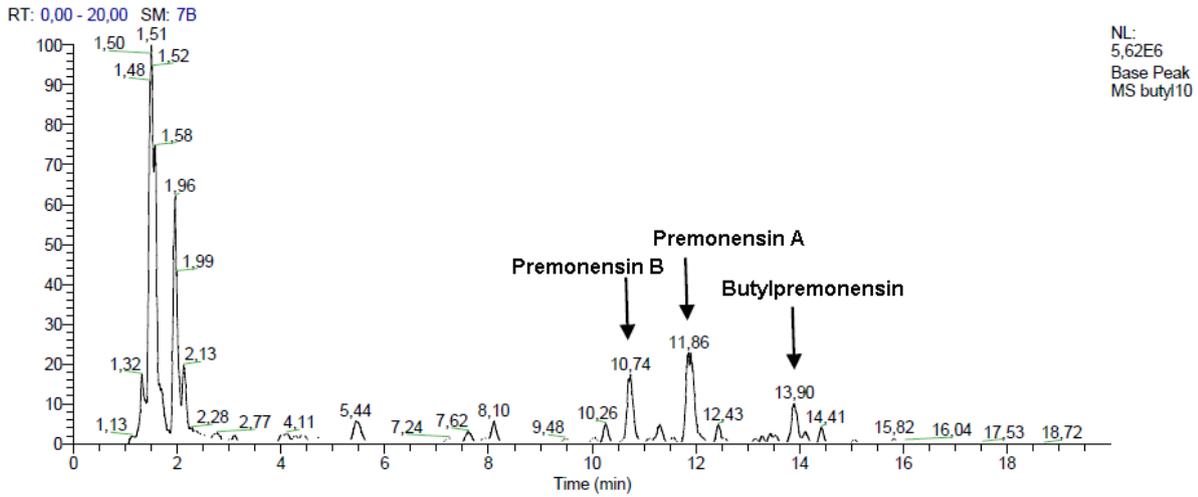
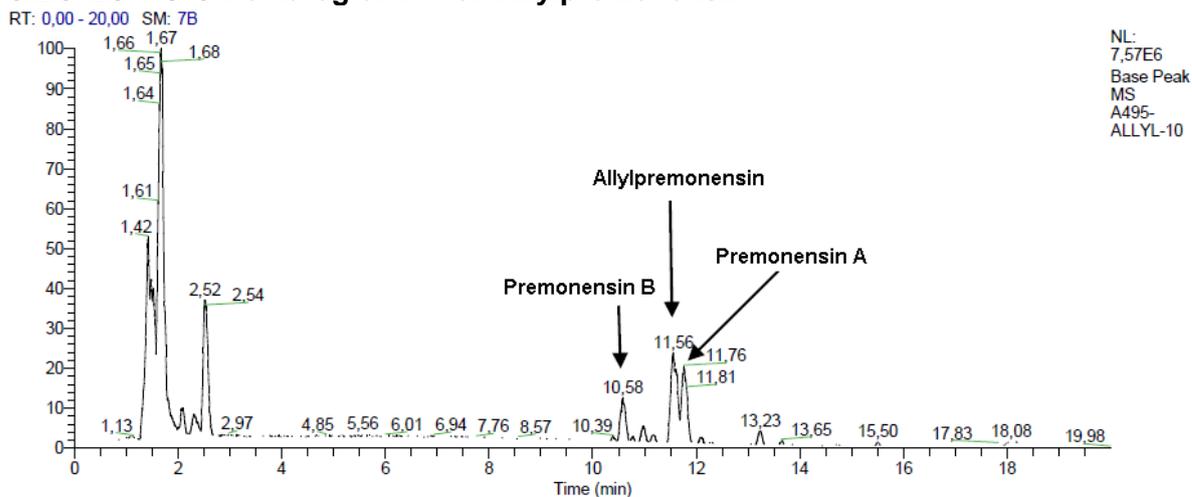


Abbildung 58: ESI-MS-Spektrum von Butylpremonensin. Zusehen ist der Basepeak des Fermentationsextraktes. Die Massenspur zeigt Butylpremonensin als m/z : 603 $[M+H]^+$, 620 $[M+NH_4]^+$, 625 $[M+Na]^+$.

13.2.3 LC-MS-Chromatogramm von Allylpremonensin



A495-ALLYL-10 #3450 RT: 11,55 AV: 1 NL: 1,44E6
T: ITMS + c ESI Full ms [150,00-2000,00]

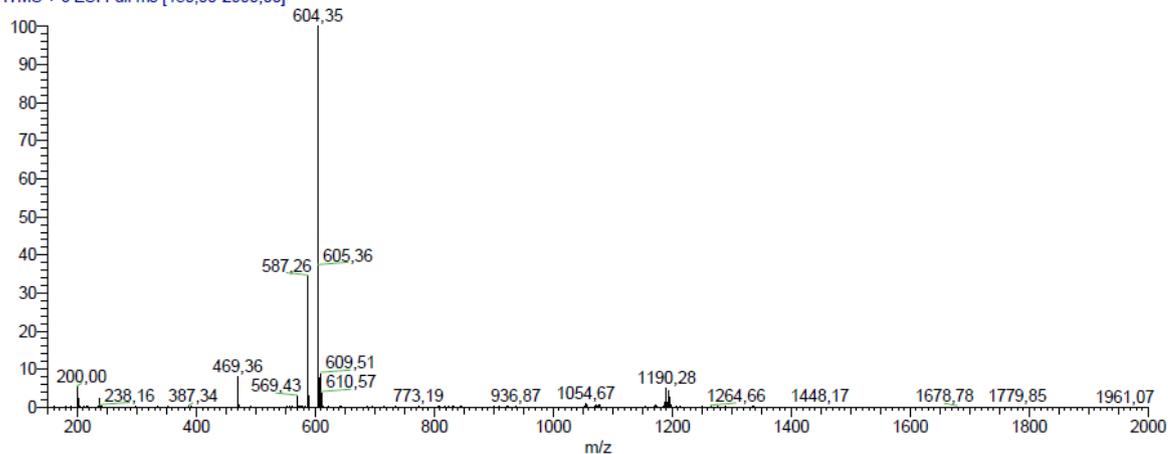
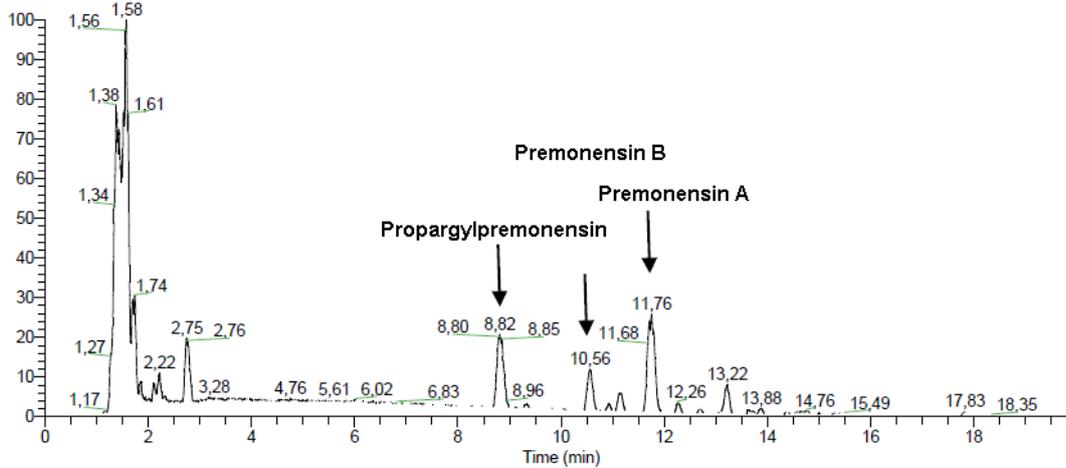


Abbildung 59: ESI-MS-Spektrum von Allylpremonensin. Zusehen ist der Basepeak des Fermentationsextraktes. Die Massenspur zeigt Allylpremonensin als m/z : 587 $[M+H]^+$, 604 $[M+NH_4]^+$, 609 $[M+Na]^+$.

13.2.4 LC-MS-Chromatogramm von Propargylpremonensin

RT: 0,00 - 20,00 SM: 7B



NL:
7,32E6
Base Peak
MS
A495-PG-
10

A495-PG-10 #2650 RT: 8,80 AV: 1 NL: 1,36E6
T: ITMS + c ESI Full ms [150,00-2000,00]

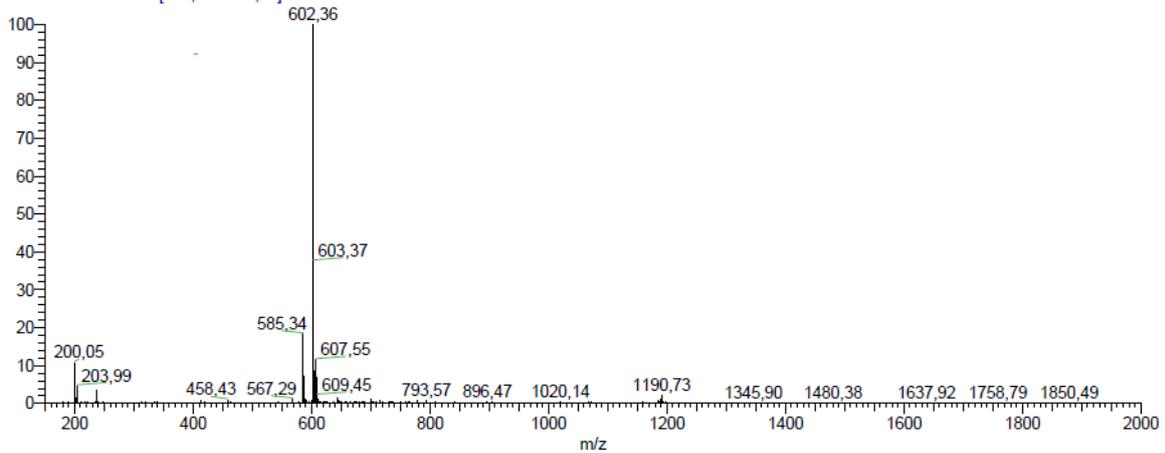
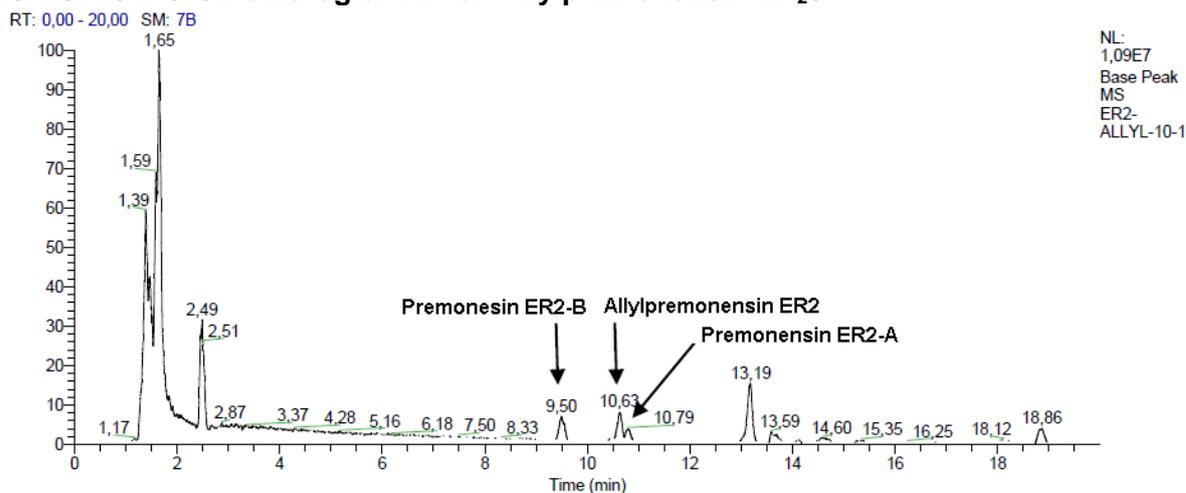


Abbildung 60: ESI-MS-Spektrum von Propargylpremonensin. Zusehen ist der Basepeak des Fermentationsextraktes. Die Massenspur zeigt Propargylpremonensin als m/z : 585 $[M+H]^+$, 602 $[M+NH_4]^+$, 607 $[M+Na]^+$.

13.2.5 LC-MS-Chromatogramm von Allylpremonensin ER₂O



ER2-ALLYL-10-1 #3221 RT: 10,63 AV: 1 NL: 8,92E5
T: ITMS + c ESI Full ms [150,00-2000,00]

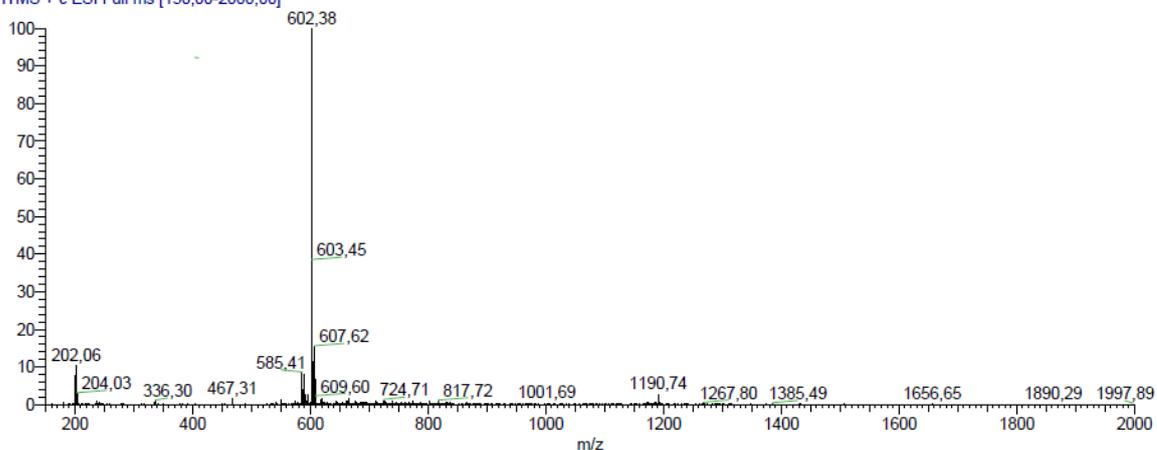
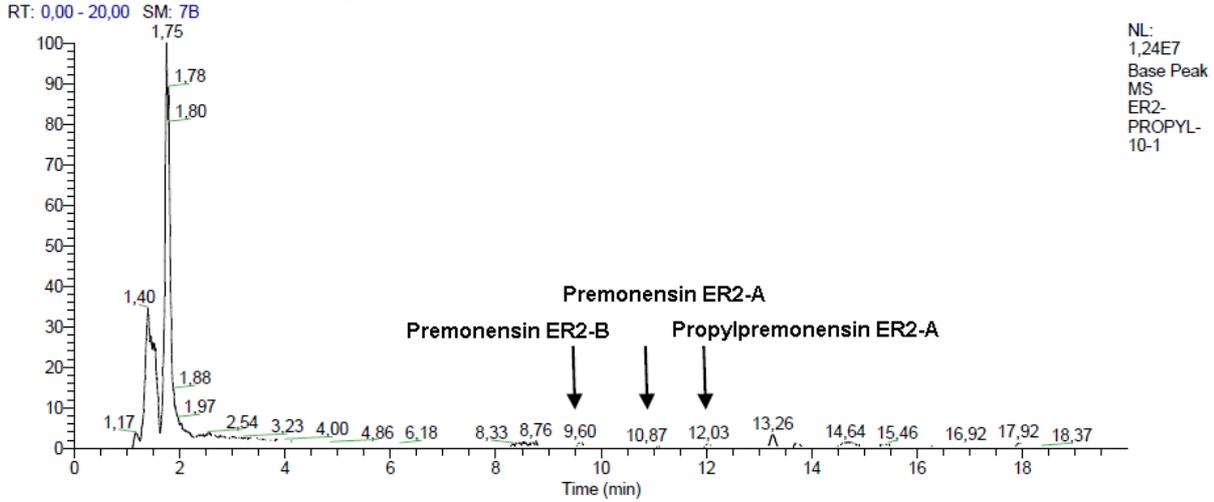


Abbildung 61: ESI-MS-Spektrum von Allylpremonensin ER₂O. Zusehen ist der Basepeak des Fermentationsextraktes. Die Massenspur zeigt Allylpremonensin als m/z: 585 [M+H]⁺, 602 [M+NH₄]⁺, 607 [M+Na]⁺.

13.2.6 LC-MS-Chromatogramm von Propylpremonensin ER₂0



ER2-PROPYL-10-1 #3606 RT: 12,05 AV: 1 NL: 1,43E5
T: ITMS + c ESI Full ms [150,00-2000,00]

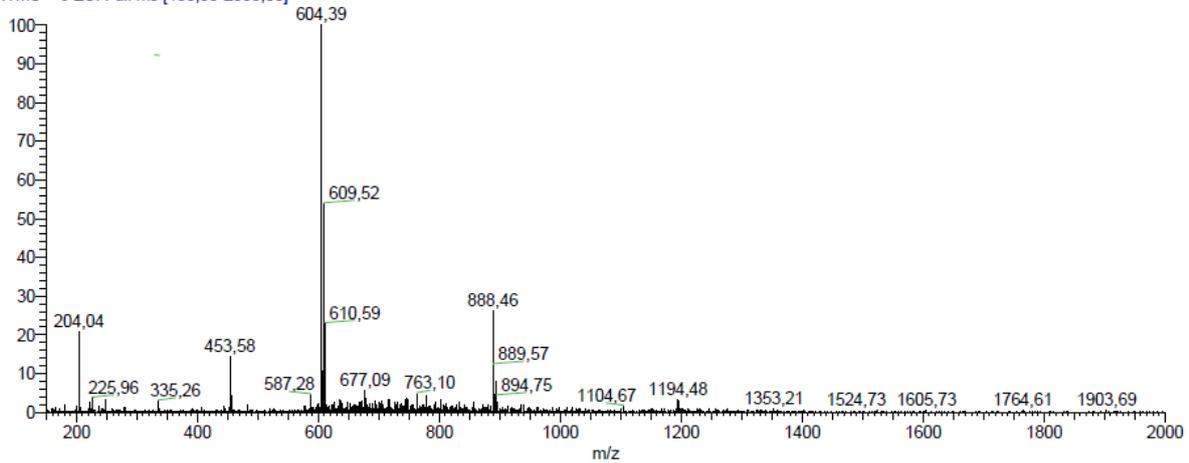


Abbildung 62:ESI-MS-Spektrum von Propylpremonensin ER₂0. Zusehen ist der Basepeak des Fermentationsextraktes. Die Massenspur zeigt Propylpremonensin als m/z: 587 [M+H]⁺, 604 [M+NH₄]⁺, 609 [M+Na]⁺.

13.2.7 LC-MS-Chromatogramm von Allylmonensin

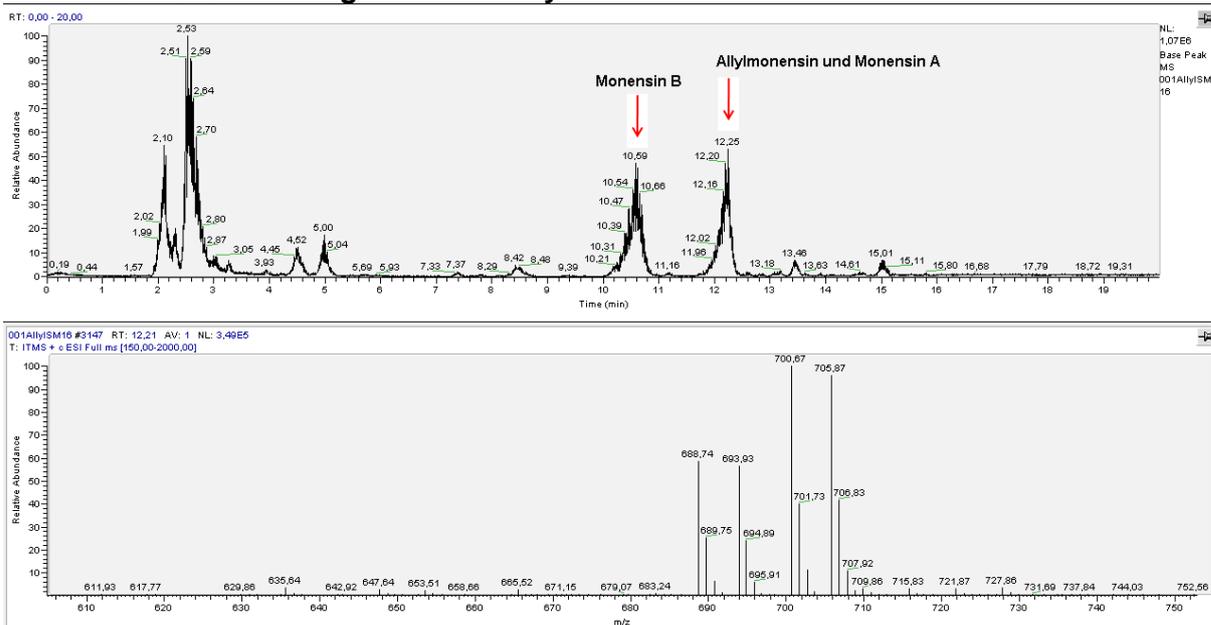


Abbildung 63: ESI-MS-Spektrum von Allylmonensin. Zusehen ist der Basepeak des Fermentationsextraktes. Die Massenspur zeigt Allylmonensin als $m/z: 705 [M+Na]^+$.

13.2.8 LC-MS-Chromatogramm von Propargylmonensin

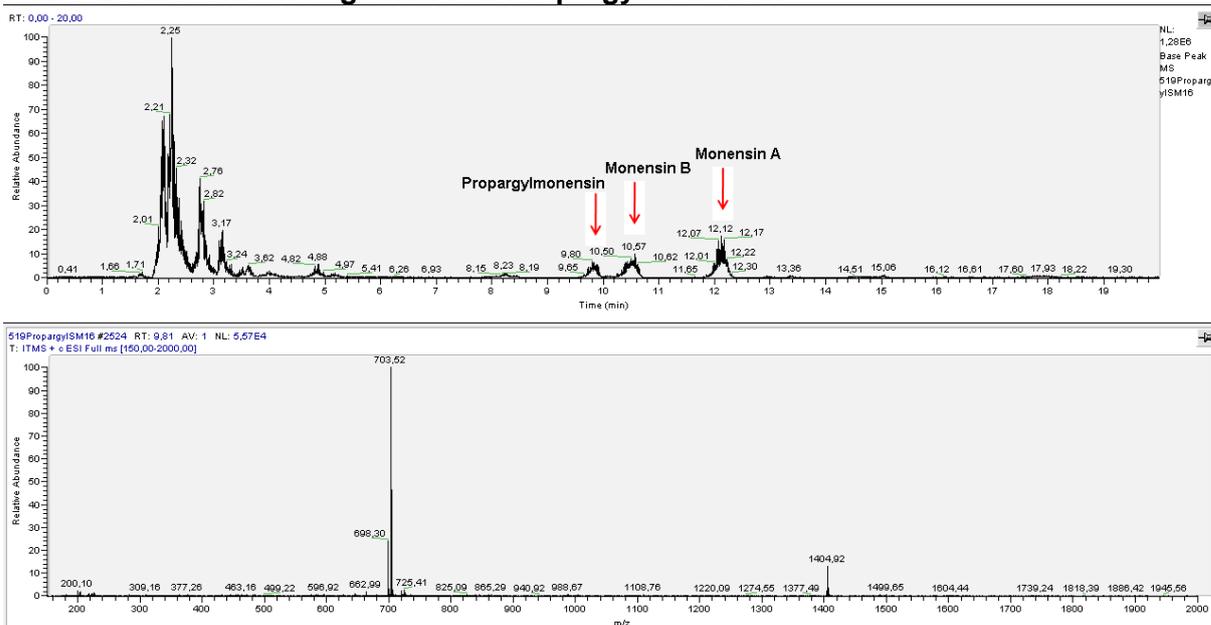


Abbildung 64: ESI-MS-Spektrum von Propargylmonensin. Zusehen ist der Basepeak des Fermentationsextraktes. Die Massenspur zeigt Propargylmonensin als $m/z: 703 [M+Na]^+$.